

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Biología Celular



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

**Estrés oxidativo y muerte celular en la retina
neural y en otros sistemas. Implicación de la
enzima Poli(ADP-ribosa) Polimerasa-1 (PARP-1)**

Programa de Doctorado: Biología Fundamental y de Sistemas

(Universidad de Granada)

TESIS DOCTORAL

Sandra María Martín Guerrero

Granada, 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Sandra María Martín Guerrero
ISBN: 978-84-1306-398-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/58539>

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada por la que suscribe en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, gracias a la concesión de una Beca Predoctoral para la Formación del Profesorado Universitario (FPU) con referencia FPU14/02219 financiada por Ministerio de Educación y Formación Profesional. La investigación desarrollada ha sido parcialmente financiada el Ministerio de Ciencia e Innovación Campus de Excelencia Internacional (CEIBioTic Granada) en el marco de “III Convocatoria de Microproyectos CEI BioTic” en la convocatoria de 2015 (ref. BS9-2015).

Las estancias de investigación predoctorales desarrolladas en el *Centre for Haemato-Oncology, Barts Cancer Institute, Queen Mary University of London* (Londres, Reino Unido) durante el desarrollo de esta Tesis doctoral han sido financiadas por el Ministerio de Educación y Formación Profesional, en el marco de “Ayudas a la movilidad para estancias breves y traslados temporales”, en las convocatorias de 2016 (ref. EST16/00301) y 2017 (ref. EST17/00231).

Parte de los resultados de esta Tesis doctoral han sido publicados en los siguientes artículos científicos:

- Martín-Guerrero, S.M., Casado, P., Muñoz-Gámez, J.A., Carrasco, M.C., Navascués, J., Cuadros, M.A., López-Giménez, J.F., Cutillas, P.R., Martín-Oliva, D., 2019. Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 inhibition potentiates cell death and phosphorylation of DNA damage response proteins in oxidative stressed retinal cells. *Experimental Eye Research* 188, 107790. doi: 10.1016/j.exer.2019.107790.
- Martín-Guerrero, S.M., Muñoz-Gámez, J.A., Carrasco, M.C., Salmerón, J., Martín-Estebané, M., Cuadros, M.A., Navascués, J., Martín-Oliva, D., 2017. Poly(ADP-ribose)polymerases inhibitors prevent early mitochondrial fragmentation and hepatocyte cell death induced by H₂O₂. *PLoS One* 12(10), e0187130. doi: 10.1371/journal.pone.0187130. eCollection 2017.
- Martín-Oliva, D., Martín-Guerrero, S.M., Matia-González, A.M., Ferrer-Martín, R.M., Martín-Estebané, M., Carrasco, M.C., Sierra, A., Marín-Teva, J.L., Calvente, R., Navascués, J., Cuadros, M.A., 2015. DNA damage, poly(ADP-Ribose) polymerase activation, and phosphorylated histone H2AX expression during postnatal retina development in C57BL/6 mouse. *Investigative ophthalmology & visual science* 56(2), 1301-1309. doi: 10.1167/iovs.14-15828.

AGRADECIMIENTOS

Toca cerrar un capítulo. Un capítulo de 4 años en los que he podido contar con el apoyo y amistad de personas a las que hoy quiero dedicar estas palabras de agradecimiento. Porque, un doctorado no solo es adquirir una serie de competencias y méritos necesarios para la siguiente etapa, sino también una época de crecimiento personal, en la que se gana confianza y la madurez necesaria para afrontar los problemas, los éxitos y todas aquellas situaciones que el destino nos ponga por delante. Y todo esto se consigue gracias a todas aquellas personas que nos acompañan desde el principio hasta el final del capítulo, que en mi caso llega a su fin.

En primer lugar, a mis directores de Tesis:

A Fco. David Martín, por darme la oportunidad de iniciar la carrera investigadora bajo su dirección. Por su empeño y dedicación constante que han permitido que hoy se cierre esta etapa. Gracias por enseñarme a ser autónoma y resolutiva. Por la confianza depositada en mí durante estos años y la paciencia demostrada, así como por todos los consejos profesionales y personales que siempre has estado dispuesto a ofrecer.

A José Antonio Muñoz, por haber estado siempre dispuesto a ayudar para que esta Tesis saliera adelante. Por tu constancia e implicación con el trabajo. Por todo tu conocimiento, especialmente en citometría, que siempre intentabas transmitir y que ha sido de gran ayuda.

A mis compañeros del Departamento de Biología Celular:

Gracias a todos y a cada uno de vosotros por haberme acogido durante todos estos años, por vuestra amabilidad y vuestra disposición a ayudar siempre que lo he necesitado. Por vuestros ánimos y por haberme aportado valores que me han ayudado a crecer profesional y personalmente durante todo este tiempo. Gracias a Julio Navascués y a José Luis Marín por aceptarme a formar parte del grupo de investigación, y por la cercanía que habéis demostrado en todo momento. También quiero agradecer a Ramón Carmona su disposición a ayudar en lo que fuese necesario. A Francisco

Abadía por su ayuda durante este último año y su interés en nuestros proyectos. Gracias Miguel Ángel Cuadros por estar siempre dispuesto a ayudarnos con las tareas de revisión, por tu trabajo minucioso que tanto nos ha ayudado. Gracias a Mari Carmen y Juanjo por vuestra cercanía y por los momentos de risas que hemos compartido. A Cristina, Esperanza, Alma y José Ángel por vuestros consejos consejos y por tenerme siempre presente para realizar actividades de divulgación. A Verónica, por tu compañía en estos últimos meses. Y, por último, quiero darle mi más profundo agradecimiento a Chary. Has sido un gran apoyo tanto a nivel profesional como personal durante estos años. Gracias por escucharme cada vez que me surgían dudas o simplemente buscaba consejo. Gracias por animarme a seguir aprendiendo, a confiar en mí misma y no dejar que mis dudas fueran un obstáculo. De todo corazón, gracias.

Quiero agradecer también la ayuda prestada por el Servicio de Instrumentación Científica, en concreto a David Porcel, responsable del servicio de Microscopía, y a Jaime Lazuén, responsable del servicio de Citometría, por las horas compartidas y los consejos recibidos.

Una de las experiencias más enriquecedoras que he tenido la oportunidad de disfrutar durante estos años ha sido mis estancias en Londres. Me han permitido ver el mundo desde otra perspectiva, crecer y enseñarme que no hay nada imposible, que por muy abrumados que nos veamos al principio, al final somos capaces de superarlos y seguir adelante. Quiero agradecer al Dr. Pedro Cutillas por brindarme la oportunidad de realizar las estancias en su grupo de investigación bajo su supervisión. Gracias a todo el grupo por haberme acogido y haberme tratado como una más durante aquellos meses. Gracias Vinni por estar dispuesta siempre a ayudarme con todo lo que necesitaba. Gracias Maru por compartir tus conocimientos conmigo sin pedir nada a cambio, por toda tu ayuda. Ha sido un placer tenerte como compañero. Gracias Ana y Beatriz por acogirme con los brazos abiertos, por vuestro cariño y por vuestros consejos. Gracias a todos, formáis parte de una de las etapas más bonitas de este doctorado.

Quiero también agradecer a toda la gente que ha compartido conmigo los días de rutina y duro trabajo en el laboratorio, aunque fuera por breve tiempo. A Alana por tu alegría y esa positividad con la que siempre llenabas el laboratorio, eres una persona muy trabajadora y nada puede pararte. Gracias Laura, por las horas compartidas y los cafés de desconexión. A Aysha, que durante este último año me has acompañado tanto haciendo que los días fueran más amenos. Siempre dispuesta a escucharme. Gracias de todo corazón. Y, por último, a mi querida María. Has sido un pilar fundamental durante estos años, siempre has estado cuando lo he necesitado, dispuesta a aconsejarme como una hermana. Sabes que eres grande, no solo como investigadora, sino también como persona. Tu gran corazón y esa fuerza que te caracterizan te van a llevar muy lejos.

Muchas gracias a mis bioquímicos: Rocío, Natividad, Laura, Nieves, Francisco y María del Carmen. Empezamos en el mundo de la ciencia en 2010 en el Aulario C de la Facultad de Ciencias, y aquí seguimos prácticamente 10 años después igual de unidos, ayudándonos y compartiendo grandes momentos. A mis chicas de Microbiología, Fadwa y María, por compartir tantos buenos momentos conmigo, por ser tan generosas y transmitir esa alegría que os caracteriza. Gracias Pablo, por estar siempre ahí para escucharme y por las horas de consejos con las que me has brindado todo este tiempo. La distancia no ha sido excusa para demostrarme que siempre voy a tener un buen amigo cuando lo necesite. Gracias Antonio, por todo tu apoyo, por esa amistad incondicional que siempre me has brindado, por ayudarme en los momentos más difíciles y por aguantar mis regañinas. Y finalmente, quiero agradecerte a ti Cristina por todos estos años de apoyo incondicional y tu amistad sincera. Me has entendido como nadie, siempre dispuesta a ayudarme y no dejar que nada hiciera que abandonara mis objetivos. Gracias por estar siempre ahí y por el cariño que me demuestras. Tuve la suerte de que el doctorado nos uniera al principio de este camino, y te has convertido en alguien importante para mí. Gracias de corazón.

No puedo olvidar que si hoy estoy escribiendo estas palabras es gracias a aquellas personas que han dedicado toda su vida y que han dado todo su esfuerzo para que pudiera llegar hasta aquí, mis padres. Sin vosotros, sin los

valores con los que nos habéis educado tanto a mi hermano como a mí, esto no hubiera sido posible. Nos habéis enseñado que todo en esta vida se consigue con trabajo y constancia. Sois mi ejemplo de superación, porque a pesar de todo siempre habéis salido a flote, nunca os habéis rendido. Porque a pesar de algunos momentos complicados, nunca habéis dejado de estar ahí apoyándome. Podéis sentir os orgullosos, porque esto también es vuestro, es fruto de vuestra dedicación como padres.

A mi hermano, por estar siempre a mi lado, por el amor desinteresado, por tus abrazos. Gracias por confiar siempre en mí y creer que era capaz de hacerlo todo y que no había nada que me detuviera. A mis abuelos, por vuestro cariño y por estar siempre a mi lado. A mi tía María Eugenia, a la que considero una hermana. Siempre has estado a mi lado, apoyándome en los buenos y malos momentos. Gracias a ti empezó a germinar en mí la semilla de la ciencia cuando me enseñabas todo lo que hacías durante la carrera. Te debo mucho. Gracias a ti y a Juan Luis por haber traído a este mundo a esas dos personitas que han llenado de alegría y risas estos últimos años. Sin ellos esta etapa no hubiera sido igual.

Y a ti, Pedro, por aparecer en mi vida de repente y llenarla de nuevo de ilusión y ganas, por todos los buenos recuerdos que hemos ido creando estos años, y que espero que sigan aumentando. Sobre todo, gracias por tu paciencia infinita al no dejar que mis flaquezas ganaran la batalla, por creer en mí y por hacer que yo también lo haga. No sé cómo agradecerle que siempre estés intentando sacarme una sonrisa, incluso en los momentos de más desánimo con esa positividad que te hacen único. Sencillamente, gracias por querer ser mi compañero de viaje, de este viaje que es la vida.

ÍNDICE

RESUMEN / ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. El estrés oxidativo como inductor de daños en la célula	13
1.1.1. Relación del estrés oxidativo con el desarrollo de patologías en la retina e hígado.....	17
1.2. Las enzimas Poli(ADP-ribosa) Polimerasas (PARPs)	21
1.2.1. Estructura de PARP-1.....	25
1.3. Metabolismo de la poli-ADP-ribosa	27
1.3.1. Síntesis de la poli-ADP-ribosa.....	28
1.3.2. Degradación de la poli-ADP-ribosa.....	29
1.4. Funciones de PARP-1	31
1.4.1. Reparación del ADN.....	31
1.4.1.1. Mecanismos de reparación de roturas de cadena simple.....	32
1.4.1.2. Mecanismos de reparación de roturas de cadena doble.....	35
1.4.1.3. Respuesta al daño en el ADN y papel de PARP-1.....	38
1.4.2. Papel de PARP-1 en los procesos de muerte celular.....	41
1.4.2.1. Apoptosis.....	41
1.4.2.2. Necrosis.....	43
1.4.2.3. Autofagia.....	46
1.4.2.4. <i>Parthanatos</i>	48
1.4.3. Transcripción génica.....	51
1.4.4. División celular.....	53
1.4.5. Inflamación.....	53
1.5. Inhibidores de PARP-1	55
2. OBJETIVOS	59
3. MATERIAL Y MÉTODOS	63
3.1. Animales	65
3.2. Aislamiento y cultivo organotípico de retina	65
3.3. Cultivos celulares	67
3.4. Inducción de estrés oxidativo: tratamiento con peróxido de hidrógeno	68
3.5. Bloqueo de la actividad de PARP-1	69
3.5.1. Inhibición farmacológica de PARP-1.....	69
3.5.2. Silenciamiento de PARP-1 mediante ARN pequeño de interferencia.....	69
3.6. Administración de NAD⁺	70
3.7. Determinación de especies reactivas de oxígeno mediante citometría de flujo ..	70
3.8. Determinación de la viabilidad celular mediante derivados de tetrazolio	71
3.9. Medida de la proliferación celular mediante sulforrodamina B	72

3.10. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo	72
3.11. Detección de daño en el ADN mediante 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.....	73
3.12. Análisis de la muerte celular.....	74
3.12.1. Determinación de la muerte celular mediante citometría de flujo.....	74
3.12.2. Cuantificación de los niveles de lactato deshidrogenasa	76
3.13. Determinación del contenido celular de ATP	77
3.14. Determinación de la actividad de PARP-1 mediante ELISA	78
3.15. Análisis de la morfología mitocondrial.....	80
3.15.1. Cuantificación de la morfología mitocondrial mediante el programa MicroP	80
3.15.2. Análisis de la ultraestructura mitocondrial mediante microscopía electrónica de transmisión	82
3.16. Inmunodetección de proteínas por <i>Western Blot</i>.....	83
3.17. Obtención de criosecciones	86
3.18. Obtención de secciones semifinas	87
3.19. Inmunocitoquímica en criosecciones.....	87
3.20. Inmunohistoquímica TUNEL	89
3.21. Inmunocitoquímica de cultivos celulares.....	91
3.22. Análisis cuantitativo del fosfoproteoma celular.....	92
3.22.1. Extracción y digestión proteica	92
3.22.2. Enriquecimiento de fosfopéptidos mediante TiO ₂	94
3.22.3. Análisis mediante espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).....	96
3.22.4. Identificación y cuantificación de fosfopéptidos.....	98
3.22.5. Análisis bioinformático.....	99
3.22.6. Análisis de enriquecimiento de sustratos de quinasa (KSEA).....	100
3.22.7. Análisis de ontología de genes	101
3.23. Análisis estadístico	103
4. RESULTADOS.....	105
4.1. Análisis de la actividad de PARP-1 y de su relación con el daño en el ADN y la muerte celular durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón.....	107
4.1.1. Durante el desarrollo postnatal de la retina se producen daños de tipo oxidativo.....	107
4.1.2. El incremento del daño oxidativo coincide con el periodo de disminución de la actividad de PARP-1	108
4.1.3. En la retina postnatal también se producen daños en el ADN de doble cadena que inducen muerte celular	109
4.2. La inhibición de PARP-1 potencia la muerte celular y la fosforilación de proteínas implicadas en la respuesta al daño en el ADN inducido por el estrés oxidativo en la retina de ratón	121

4.2.1. El inhibidor de PARP-1 PJ34 potencia la muerte celular en los cultivos organotípicos de retina de ratón sometidos a estrés oxidativo.....	121
4.2.2. PJ34 incrementa la expresión del marcador de daño en el ADN γ -H2AX en la capa de fotorreceptores de retinas sometidas a estrés oxidativo.....	124
4.2.3. El tratamiento con H ₂ O ₂ modifica el fosfoproteoma de la línea celular 661W....	125
4.2.4. La inhibición de PARP-1 incrementa la fosforilación de proteínas en motivos SQ tras el tratamiento oxidativo	128
4.2.5. El inhibidor PJ34 reduce la proliferación celular de la línea 661W tras el tratamiento oxidativo	130
4.2.6. La inhibición de PARP-1 incrementa la fosforilación de los sustratos de ATM/ATR en la línea celular retiniana y en los explantes sometidos a estrés oxidativo.....	131
4.3. La inhibición de PARP-1 previene la fragmentación mitocondrial y la muerte celular de hepatocitos sometidos a estrés oxidativo	153
4.3.1. El estrés oxidativo reduce la viabilidad celular de la línea celular hepática WRL68.....	153
4.3.2. El tratamiento con H ₂ O ₂ induce la activación de PARP-1 en las células hepáticas... ..	154
4.3.3. Los inhibidores de PARP-1 y el sustrato NAD ⁺ incrementan la viabilidad de las células hepáticas sometidas a estrés oxidativo	156
4.3.4 La muerte celular inducida en las células hepáticas mediante el tratamiento oxidativo posee características de apoptosis y es contrarrestada por el inhibidor PJ34.....	157
4.3.5. El tratamiento oxidativo induce una fragmentación mitocondrial en las células hepáticas que es revertida con la inhibición de PARP-1 y con la administración de NAD ⁺	158
4.3.6. La inhibición de PARP-1 evita la caída de los niveles intracelulares de ATP inducida por el tratamiento oxidativo.....	163
4.4. Análisis de los cambios inducidos por el estrés oxidativo en el fosfoproteoma de las células hepáticas: implicaciones de PARP-1	185
4.4.1. La inhibición de PARP-1 o la administración de NAD ⁺ modifica la expresión de fosfoproteínas inducidas por el estrés oxidativo	185
4.4.2. El silenciamiento de PARP-1 en las células hepáticas sometidas a estrés oxidativo genera cambios en la fosforilación de proteínas	188
4.4.3. El silenciamiento de PARP-1 disminuye en las células hepáticas sometidas a estrés oxidativo la actividad de ciertas quinasas, entre ellas la proteína quinasa activada por AMP (AMPK).....	189

4.4.4. El silenciamiento de PARP-1 incrementa la viabilidad celular en las células WRL68 sometidas a tratamiento oxidativo.....	192
5. DISCUSIÓN.....	205
5.1. Activación de PARP-1 y daño oxidativo durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón.....	208
5.2. Inhibición de PARP-1, daños en el ADN y muerte celular en la retina sometida a estrés oxidativo	212
5.3. Activación de PARP-1, agotamiento energético y fragmentación mitocondrial en las células hepáticas sometidas a tratamiento oxidativo	219
5.4. PARP-1, estrés energético y cambios en el fosfoproteoma.....	225
6. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	233
7. REFERENCIAS.....	241
8 ANEXOS.....	275
8.1. ANEXO I: Listado de abreviaturas.....	277
8.2. ANEXO II: Índice de figuras.....	283
8.3. ANEXO III: Tablas	287

RESUMEN / ABSTRACT

Nuestro organismo se encuentra expuesto constantemente a diversos agentes genotóxicos, tanto de origen externo como interno. Uno de estos agentes, las especies reactivas de oxígeno (ROS) originadas principalmente a causa del metabolismo oxidativo, pueden inducir importantes daños en el ADN. Si la presencia de ROS se mantiene de forma prolongada, o estos radicales no son neutralizados por los sistemas de defensa antioxidante, puede derivar en una situación conocida como estrés oxidativo, nociva para la célula. El enzima Poli(ADP-ribosa) Polimerasa 1 (PARP-1) es crucial para la detección y posterior reparación del daño oxidativo en el ADN generado por la acción de las ROS. Para ello, PARP-1 modifica y activa una serie de proteínas nucleares involucradas en los mecanismos de reparación del ADN a las que añade un polímero de ADP-ribosa en un proceso conocido como poli-ADP-ribosilación. En determinadas circunstancias, sin embargo, PARP-1 puede desencadenar procesos de muerte celular, bien por el agotamiento energético causado por el consumo excesivo del NAD⁺, sustrato de PARP-1, o bien por la inducción de la traslocación del Factor Inductor de Apoptosis (AIF) desde la mitocondria al núcleo.

En la presente Tesis doctoral se ha estudiado el papel de la enzima PARP-1 en la respuesta al daño oxidativo inducido por las ROS, tanto en un modelo murino como humano. Como modelo murino se ha utilizado la retina de ratón, estructura nerviosa que consume grandes cantidades de oxígeno durante el proceso de fototransducción; en concreto, se han usado retinas postnatales en desarrollo, cultivos organotípicos de retina y una línea celular derivada de fotorreceptores. Por otro lado, se ha utilizado también una línea celular de hepatocitos humanos, dado que el hígado es un órgano sometido a un alto consumo de oxígeno durante el proceso de detoxificación. Ambos modelos han sido utilizados como ejemplos de estructuras sometidas a una alta presencia de ROS *in vivo*, y en los que el estrés oxidativo parece tener un papel importante en el desarrollo de ciertas patologías asociadas con estos órganos.

En primer lugar, esta Tesis muestra que el daño oxidativo se incrementa progresivamente durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón: es bajo

durante las primeras semanas de desarrollo, pero aumenta a partir del día 14 de desarrollo postnatal (P14). Al mismo tiempo, la actividad de PARP-1 resultó ser elevada durante la primera semana de desarrollo postnatal (desde P0 a P7), para disminuir rápidamente en estadios posteriores. Curiosamente, los niveles reducidos de daño oxidativo en la retina durante la primera semana de desarrollo postnatal coinciden con un periodo de actividad de PARP-1 elevada. La expresión de la forma fosforilada de la histona H2AX (γ -H2AX) es considerada como un marcador de daño de doble cadena en el ADN; la presencia de γ -H2AX se incrementa durante la segunda semana de desarrollo postnatal, con un pico de mayor expresión en P14, cuando la actividad de PARP-1 era más baja. Por tanto, los datos anteriores sugieren que PARP-1 juega un papel en el control del daño en el ADN durante las etapas tempranas del desarrollo postnatal de la retina.

En segundo lugar, para evaluar el papel de PARP-1 en la respuesta al daño oxidativo inducido sobre la retina de ratón se sometieron cultivos organotípicos de explantes de retina de ratón y la línea celular murina 661W (modelo *in vitro* de fotorreceptores de ratón) a un tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2), agente generador de daños oxidativos. La inhibición farmacológica de PARP-1 con el inhibidor PJ34 en explantes de retina tratados con H_2O_2 incrementó la cantidad de células en proceso de muerte; al mismo tiempo se observaba un aumento de γ -H2AX, más notorio en la capa nuclear externa, donde se localizan los núcleos de los fotorreceptores. El análisis de fosfoproteómica realizado sobre la línea celular 661W tras el tratamiento oxidativo mostró que la inhibición de PARP-1 potenció la fosforilación, y consiguiente activación, de proteínas relacionadas con la respuesta al daño en el ADN, concretamente en motivos SQ. La fosforilación en motivos SQ se ha relacionado con la activación de las quinasas ATM/ATR, implicadas en la respuesta celular al daño en el ADN. Además, la inhibición de PARP-1 tras el tratamiento oxidativo redujo la proliferación de la línea celular retiniana y potenció la parada del ciclo celular en fase G_2/M . Finalmente, la inhibición de PARP-1 potenciaba la fosforilación de los sustratos de ATM/ATR tras el tratamiento oxidativo, tanto en explantes de retina como en la línea celular

661W, lo que indicaba un incremento de la actividad de estas quinasas. Estos resultados indican que la inhibición de PARP-1 potencia los efectos adversos inducidos por el tratamiento oxidativo en la retina de ratón, especialmente sobre las células de los fotorreceptores.

En tercer lugar, se estudió el papel de PARP-1 en las células hepáticas sometidas a estrés oxidativo ya que el hígado es otro órgano susceptible de ser dañado por la acción de las ROS, y además el estrés oxidativo parece estar involucrado en la progresión de diversas enfermedades hepáticas. Para evaluar el papel de PARP-1 y su relación con la respuesta al daño oxidativo en el hígado se utilizó la línea celular hepática humana WRL68 (modelo *in vitro* de hepatocitos), que fue también tratada con H₂O₂. Dicho tratamiento produjo un descenso de la viabilidad celular e incrementó la actividad de PARP-1 de manera dosis dependiente. En cambio, la inhibición de la actividad de PARP-1 mediante los inhibidores PJ34 y AG14361 incrementó la viabilidad en estas células y redujo la muerte tras el tratamiento oxidativo. Además, la inhibición de PARP-1 contrarrestó los cambios observados en la morfología mitocondrial tras el tratamiento oxidativo: redujo el número de mitocondrias globulares (asociadas a procesos de fragmentación mitocondrial), incrementó el número de mitocondrias con morfología tubular, así como su área y el número de crestas. La administración de NAD⁺ también incrementó la viabilidad celular y mostró el mismo efecto que los inhibidores de PARP-1 en cuanto a la preservación de la morfología mitocondrial tras el tratamiento oxidativo. Por último, la activación de PARP-1 tras el tratamiento con H₂O₂ produjo un agotamiento en los niveles de ATP, situación que fue revertida en presencia de los inhibidores de PARP-1 o mediante la administración de NAD⁺. Todo lo anterior indica que la inhibición de PARP-1, gracias en parte a la preservación del sustrato NAD⁺, tiene un papel protector en las células hepáticas sometidas a estrés oxidativo, ya que incrementa la viabilidad celular, preserva los niveles de ATP intracelulares, reduce la fragmentación mitocondrial y disminuye la muerte celular.

Por último, y en cuarto lugar, el análisis de fosfoproteómica realizado en la línea celular hepática mostró que el bloqueo de la actividad de PARP-1, bien

mediante el uso del inhibidor PJ34 o mediante el silenciamiento de PARP-1, era capaz de contrarrestar parte de los cambios observados en la fosforilación de las proteínas tras el tratamiento oxidativo. Además, la administración de NAD⁺ mostró efectos similares al producido por el inhibidor PJ34 o por el silenciamiento de PARP-1. En concreto, los ensayos de fosfoproteómica revelaron que la quinasa AMPK (proteína quinasa activada por AMP), implicada en la respuesta celular inducida por un estrés energético, presenta mayor activación tras el tratamiento con H₂O₂, tal vez en respuesta al descenso de los niveles de ATP como consecuencia de la sobreactivación de PARP-1 tras el tratamiento oxidativo.

Sin embargo, el silenciamiento de PARP-1 redujo la actividad de AMPK y disminuyó el estado de fosforilación de ciertos sustratos de AMPK, como el enzima Acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1) o la proteína activadora de GTPasas TBC1D1. La administración de NAD⁺ en las células sometidas a tratamiento oxidativo mostró resultados análogos, indicando que el agotamiento energético causado por la sobreactivación de PARP-1 podría ser responsable de los cambios observados en el patrón de fosforilación y en la actividad de AMPK. Por último, el silenciamiento de PARP-1 también incrementó la viabilidad celular de la línea celular WRL68 tras el tratamiento oxidativo.

En resumen, en esta Tesis doctoral se muestra que la inhibición del enzima PARP-1 puede tener un efecto diferente dependiendo del tipo de célula afectada por el estrés oxidativo; la inhibición de PARP-1 podría tener un efecto negativo en el tratamiento de enfermedades retinianas en las que el estrés oxidativo esté involucrado, mientras que la inhibición de PARP-1 puede ser una posible diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades hepáticas asociadas con el estrés oxidativo.

Our organism is continuously exposed to genotoxic agents, either exogenous or endogenous. One of these agents, known as reactive oxygen species (ROS), which are mainly originated during oxidative metabolism, may cause severe damage to DNA. If this situation prolongs or is not counteracted by the antioxidant defence system, it may originate a harmful situation for the cells known as oxidative stress. The enzyme Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 (PARP-1) has a relevant role in signalling and repairing of the DNA damage caused by ROS. For that, PARP-1 modifies and activates nuclear proteins involved in DNA repair by adding polymers of ADP-ribose to target proteins in a process known as poly-ADP-ribosylation. However, PARP-1 may promote cell death processes in certain conditions due to an excessive consume of NAD⁺ or by the translocation of the Apoptosis Inducing Factor (AIF) from the mitochondria to the nucleus.

In the present work we have studied the role of PARP-1 enzyme in the response to oxidative damage induced by ROS, both in murine and human models. As murine model, we have used mouse retina, a nervous system structure that consumes high levels of oxygen during phototransduction processes; specifically, we have used developing postnatal retinas, organotypic cultures of retinal explants and a photoreceptor-derived cell line. On the other hand, we also used a human hepatic cell line, since liver is an organ with high oxygen consumption during the processes of detoxification. Both models have been used as examples of structures with high levels of ROS *in vivo*, and in which oxidative stress is thought to be involved in disease development.

Firstly, this Thesis shows that oxidative damage increases progressively during the postnatal development of the retina: it is low during the first weeks of life, but increases after the 14th day of postnatal development (P14). At the same time, PARP-1 activity was high during the first week (from P0 to P7) and decreased quickly in later stages. Interestingly, low levels of oxidative damage during early postnatal development stages concurred with the period in which PARP-1 activity was high. The expression of the phosphorylated histone H2AX (γ -H2AX), a marker of double strand breaks, also increases during the second week of postnatal development, with high levels of γ -H2AX at P14, when PARP-

1 activity was low. Therefore, these results suggest that PARP-1 plays a key role in controlling the damage of DNA during the early postnatal development of the retina.

Second, the role of PARP-1 in the cellular response to oxidative damage in mouse retina was evaluated using organotypic cultures of mouse retinal explants and cultures of the murine cell line 661W (*in vitro* model of mouse photoreceptors), both treated with hydrogen peroxide (H₂O₂), an agent which induces oxidative damage. The pharmacological inhibition of PARP-1 with PJ34 in retinal explants increased the cell death and the expression of γ -H2AX, mostly in the outer nuclear layer (ONL), where the nuclei of the photoreceptors are located. Phosphoproteomics analysis performed on the cell line 661W showed that the inhibition of PARP-1 potentiated the phosphorylation of proteins involved in the DNA damage response, mainly at SQ motifs. The phosphorylation at SQ motifs has been related to the activity of ATM/ATR kinases, which are involved in the DNA damage response. In addition, the inhibition of PARP-1 decreased the cell proliferation and potentiated the cell cycle arrest at G₂/M phase in retinal cell line after oxidative treatment. Finally, PARP-1 inhibition increases the phosphorylation of the substrates of ATM/ATR, in both retinal explants and 661W cells, after oxidative treatment. These results indicate that PARP-1 inhibition potentiates the negative effects produced by an oxidative treatment in mouse retina, mainly in the photoreceptors cells.

Third, we evaluated the role of PARP-1 in hepatic cells suffering from oxidative stress, since liver is also susceptible of damage by ROS and oxidative stress is involved in the progression of many liver diseases. In order to evaluate the role of PARP-1 and its relationship with the cellular response to oxidative damage in the liver we used the human hepatic cell line WRL68 (*in vitro* model of human hepatocytes), which was also treated with H₂O₂. Such treatment produced a decrease in the cell viability and increased PARP-1 activity in a dose dependent-manner. However, the inhibition of PARP-1 using the inhibitors PJ34 and AG14361 increased the cell viability and reduced the cell death in these cells after the oxidative treatment. In addition, the inhibition of PARP-1 reduced the morphological changes observed in mitochondria after oxidative

treatment: it diminished the number of globular mitochondria (associated with mitochondrial fragmentation processes), increased the number of tubular mitochondria, as well as the area and the number of cristae. Supplementation with NAD⁺ also increased the cell viability in the cultures and showed the similar protective effects on preserving mitochondrial morphology after oxidative treatment. Finally, the activation of PARP-1 after H₂O₂ treatment induced a depletion in ATP levels, which could be counteracted using PARP-1 inhibitors or NAD⁺ supplementation. All these results indicate that PARP-1 inhibition, mainly due to the preservation of NAD⁺, has a protective role in hepatic cells suffering from oxidative stress, since it increases cell viability, maintains intracellular ATP levels, reduces mitochondrial fragmentation and decreases cell death processes.

And lastly, phosphoproteomics analysis performed on the hepatic cell line showed that blockade of PARP-1 activity, either by using PJ34 inhibitor or by PARP-1 silencing, reduced the changes observed in protein phosphorylation after the oxidative treatment. NAD⁺ supplementation had a similar effect to that produced by PJ34 inhibitor or by the PARP-1 silencing. Specifically, phosphoproteomics analysis showed that the activity of kinase AMPK (AMP-activated protein kinase), which are involved in the cellular responses to energy stress, was increased after H₂O₂ treatment, perhaps in response to the decrease in ATP levels resulting from the overactivation of PARP-1 after oxidative treatment.

However, the silencing of PARP-1 reduced the activity of AMPK and reduces the phosphorylation of its substrates, such as Acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1) or GTPase-activating protein TBC1D1. NAD⁺ supplementation in cells subjected to oxidative stress showed similar results, which indicates that the depletion of energy induced by the overactivation of PARP-1 may be responsible of the changes observed in the phosphorylation pattern and AMPK activity. Finally, the silencing of PARP-1 increased the cell viability of WRL68 cells after oxidative treatment.

Abstract

In summary, we have observed that the inhibition of PARP-1 may have different effects depending on the type of cell affected by oxidative stress; the inhibition of PARP-1 may have a negative effect on the treatment of retinal diseases in which oxidative stress is involved, while the inhibition of PARP-1 may be a valuable therapeutic approach for the treatment of liver diseases associated with oxidative stress.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El estrés oxidativo como inductor de daños en la célula

Los organismos aerobios utilizan el oxígeno molecular (O_2) como un elemento clave para su supervivencia, dado que es necesario para la respiración, y para la obtención de energía. No obstante, como consecuencia de las reacciones de oxido-reducción que ocurren en las mitocondrias durante la respiración celular aeróbica y debido a que el O_2 es el último aceptor de electrones en la cadena de transporte electrónico, se pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) potencialmente perjudiciales para el organismo.

Las ROS más habituales son el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($OH\cdot$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), aunque también existen otras como el oxígeno singlete (1O_2), el ácido hipocloroso (HClO), el radical peroxilo ($ROO\cdot$) y el radical hidroperoxilo ($HOO\cdot$) (Birben et al., 2012). Es importante destacar que el término ROS es usado de manera genérica para denominar a todos los intermediarios reactivos del oxígeno, tanto a los radicales libres como a los no radicales. Los radicales libres son átomos o moléculas que poseen uno o varios electrones desapareados, haciendo que posean una alta inestabilidad y puedan reaccionar con otras moléculas (Kalyanaraman, 2013; Li et al., 2015c); dentro de este grupo encontramos a los radicales superóxido, hidroxilo e hidroperoxilo. El resto de ROS, no se consideran radicales libres al no poseer electrones desapareados (por ejemplo, el H_2O_2 y el ácido hipocloroso), aunque pueden dar lugar a radicales libres, y por tanto se consideran como ROS no radicales. Además de las ROS, también se pueden generar especies reactivas a partir del nitrógeno, denominadas especies reactivas de nitrógeno (RNS, del inglés *Reactive Nitrogen Species*) como el óxido nítrico (NO), el peroxinitrito ($ONOO^-$) y el dióxido de nitrógeno (NO_2), con efectos tóxicos para las células si se presentan en concentraciones elevadas (Ye et al., 2015).

Tanto las ROS como las RNS pueden generarse como consecuencia del propio metabolismo celular (fuente endógena) o tener una procedencia exógena (humo del tabaco, fármacos, radiación ionizante, etc.). En cuanto al origen endógeno, la gran mayoría de las ROS se originan en la mitocondria

como consecuencia de la actividad de la cadena de transporte electrónico, aunque también se pueden originar en reacciones que se producen en otros orgánulos (por ejemplo, en el retículo endoplasmático y en los peroxisomas) (Ye et al., 2015). Así, el radical superóxido se origina como subproducto de las reacciones de transporte de electrones entre los complejos III y IV en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria y durante la actuación de las enzimas NADPH oxidasa (sistema NOX) y xantina oxidasa (Birben et al., 2012; Ye et al., 2015) (Figura 1). Los radicales superóxido son eliminados mediante reacciones que producen H_2O_2 debido a la actividad de diversas enzimas como la xantina oxidasa, la amino ácido oxidasa, la NADPH oxidasa, las peroxidases en los peroxisomas y, a nivel mitocondrial, en la detoxificación del ión superóxido. Este peróxido puede cruzar las membranas biológicas, y aunque es relativamente poco reactivo, en presencia de metales de transición como Fe^{+2} y Cu^+ , y por medio de las reacciones de Haber-Weiss y de Fenton se transforma en el radical hidroxilo, considerado uno de los radicales libres más reactivos y perjudiciales para los organismos (Figura 1) (Birben et al., 2012; Lushchak, 2014).

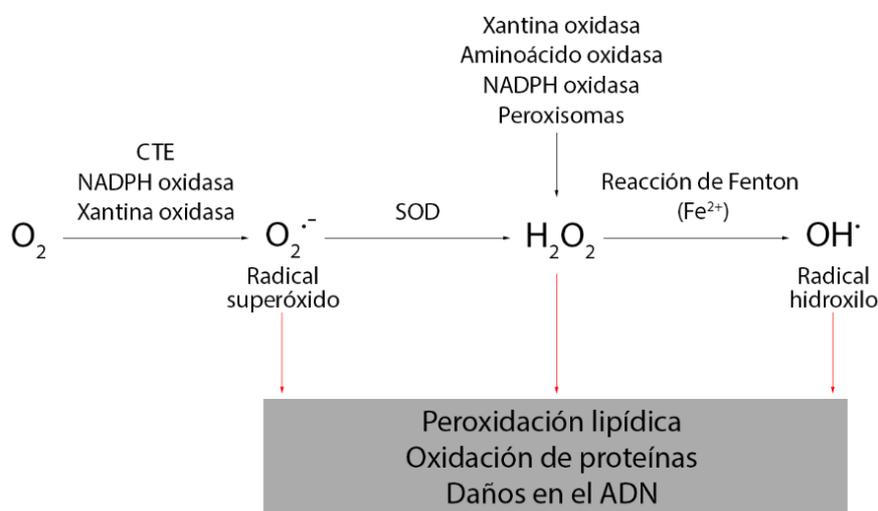


Figura 1. Generación y consecuencias de las ROS. El metabolismo del oxígeno puede dar lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) entre las que encontramos radicales libres (por ejemplo, el radical superóxido y el radical hidroxilo) y no-radicales libres (peróxido de hidrógeno, H_2O_2). Las ROS pueden producir la oxidación de lípidos (peroxidación lipídica) y proteínas, y dañar la estructura del ADN, teniendo efectos perjudiciales para la célula (CTE, cadena de transporte electrónico; SOD, superóxido dismutasa).

Los organismos han desarrollado un sistema de defensa antioxidante complejo para contrarrestar la producción o presencia de ROS/RNS, y minimizar los efectos negativos que estas puedan tener. Dentro de las defensas antioxidantes desarrolladas por las células nos encontramos dos modalidades: el sistema de defensa antioxidante enzimático y el sistema de defensa antioxidante no enzimático (Birben et al., 2012).

En el sistema antioxidante enzimático encontramos enzimas cuya actividad produce la degradación de las ROS, como los enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa. En concreto, la SOD, de la que existen tres isoformas en humanos: citosólica (Cu o Zn-SOD), mitocondrial (MnSOD) y extracelular (EC-SOD), convierte el radical superóxido en H_2O_2 . Por su parte, la catalasa y GPX reaccionan con el H_2O_2 produciendo H_2O y O_2 (Lubrano y Balzan, 2015).

El sistema antioxidante no enzimático está formado por compuestos de bajo peso molecular, tales como la vitamina A, la vitamina E (α -tocoferol) y el ácido ascórbico (vitamina C), que interaccionan con las ROS y las bloquean (Lubrano y Balzan, 2015). Por ejemplo, la vitamina E es capaz de reducir radicales peroxilo e incluso el oxígeno singlete, eliminando su efecto tóxico (Grune et al., 2004).

Aunque las ROS/RNS son altamente reactivas y puedan llegar a tener efectos perjudiciales para los componentes celulares, a concentraciones bajas o moderadas cumplen un papel importante dentro de los organismos, formando parte de la respuesta inmunitaria (como en la defensa frente a patógenos) o participando en la regulación de rutas de señalización celular. Por ejemplo, a concentraciones entre 0 y 1 mM, el H_2O_2 puede promover la activación de la isoforma $I\alpha$ de la proteína-quinasa dependiente de cGMP (PKGI $I\alpha$) favoreciendo la relajación de la vasculatura coronaria (Burgoyne et al., 2007). Asimismo, el H_2O_2 generado tras la exposición a factores de crecimiento puede oxidar e inactivar a la fosfatasa PTEN (regulador negativo de la vía de señalización de Akt), permitiendo la activación de esta ruta (Kwon et al., 2004) implicada en la proliferación celular.

En cambio, concentraciones elevadas de ROS/RNS pueden tener efectos perjudiciales para el organismo si el sistema de defensa antioxidante no puede contrarrestar su presencia. En esta situación las ROS/RNS pueden reaccionar de manera indiscriminada con diversos componentes celulares alterando la estructura y la función celular, ocasionando un daño celular que puede llegar a ser irreparable, produciéndose en este caso la muerte de la célula (Figura 1). Los principales objetivos de las ROS son los dobles enlaces de los lípidos, los residuos de cisteína y metionina en las proteínas y las bases nitrogenadas de la guanina para formar 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) (Mailloux y Harper, 2012). La formación de 8-OHdG es el producto más común tras la reacción de ROS con el ADN, con alta capacidad mutagénica y usado como marcador de daño oxidativo en los tejidos (Nishida et al., 2013; Valavanidis et al., 2013). Además de las lesiones en las bases nitrogenadas del ADN, los radicales libres pueden interaccionar con el ADN produciendo roturas que ocasionan mutaciones e inestabilidad genómica, e incluso ocasionando la muerte celular por un daño excesivo e irreparable en el ADN. Por otro lado, las proteínas también pueden ser modificadas por las RNS, como el peroxinitrito o el NO₂, mediante la nitración de residuos de tirosina, generando 3-nitrotirosina (3-NT), cuya presencia se considera un marcador de estrés nitrosativo (Ahsan, 2013).

En condiciones normales existe un equilibrio entre la producción de ROS/RNS y su eliminación por parte del sistema de defensa antioxidante. Sin embargo, en ocasiones puede originarse un desequilibrio entre la cantidad de ROS/RNS y los mecanismos encargados de eliminarlos, generando una situación denominada estrés oxidativo. Esta situación de estrés oxidativo puede causar alteraciones en diversos componentes celulares, como se ha mencionado anteriormente, culminando en muchos de los casos con la muerte de las células. El término “estrés oxidativo” se formuló por primera vez en 1985, y se definía como “una perturbación en el equilibrio prooxidante-antioxidante a favor del primero” (Sies, 1985). Este desequilibrio puede originarse como consecuencia de: a) un incremento en la producción endógena o exógena de ROS/RNS; b) por deficiencias en los sistemas de defensa antioxidante no

enzimáticos; c) inactivación de las enzimas antioxidantes; d) disminución de la síntesis de las enzimas o compuestos antioxidantes; o e) por la combinación de varias de estas causas (Lushchak, 2014).

La presencia de ROS o RNS también se ha relacionado con el envejecimiento celular. En 1956, Denham Harman propuso la llamada “Teoría de los radicales libres en el envejecimiento”, que postulaba que el envejecimiento estaba asociado con la acumulación de daño oxidativo en macromoléculas (ADN, lípidos y proteínas) originado por la presencia de ROS o RNS (Harman, 1956). De hecho, se ha observado que con la edad se incrementan los radicales libres, por ejemplo el radical superóxido, y la peroxidación lipídica asociada con la edad (Sawada y Carlson, 1987). Asimismo, la deficiencia en SOD1 reduce en un 30% la esperanza de vida de los ratones deficientes para este enzima (Elchuri et al., 2005), mientras que la sobreexpresión de los enzimas SOD o catalasa incrementan la esperanza de vida (Orr y Sohal, 1994; Schriener et al., 2005). Sin embargo, otras observaciones contradicen que el estrés oxidativo sea una de las causas de envejecimiento. Así, la deficiencia en MnSOD en ratones heterocigóticos no está ligada a cambios significativos en la esperanza de vida media, a pesar de que sus células presentan mayor daño oxidativo (Van Remmen et al., 2003); de igual forma la sobreexpresión de enzimas antioxidantes tales como SOD2 o catalasa, que reduce el daño oxidativo, no siempre resulta en un incremento de la esperanza de vida (Perez et al., 2009). Estos resultados ponen en cuestión el papel del estrés oxidativo en el proceso de envejecimiento celular. En cualquier caso, se necesitan más estudios para esclarecer el papel de las ROS durante el envejecimiento.

1.1.1. Relación del estrés oxidativo con el desarrollo de patologías en la retina e hígado

Una situación crónica de estrés oxidativo puede ser responsable del desarrollo y progresión de diversos trastornos y enfermedades. En este sentido, se ha relacionado al estrés oxidativo con diversas enfermedades

cardiovasculares, neurológicas (Parkinson, Alzheimer, depresión o pérdida de memoria), respiratorias (asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica), artritis reumatoide, enfermedad del riñón (fallo renal, proteinuria y uremia) y cáncer (Pizzino et al., 2017).

La retina representa uno de los tejidos con mayores tasas de consumo de oxígeno dentro del organismo (Yu y Cringle, 2005) y además, está expuesta a una alta radiación lumínica. Estos factores, junto a que la retina contiene gran cantidad de ácidos grasos polinsaturados, sustratos ideales para la peroxidación lipídica, hace que la retina tenga un ambiente favorable al daño oxidativo (Khandhadia y Lotery, 2010).

La retina de vertebrados es una estructura del Sistema Nervioso Central (SNC) sensible a estímulos visuales y capaz de transformar una señal lumínica en una señal nerviosa. En ella encontramos cinco tipos de células neuronales (fotorreceptores, células bipolares, amacrinas, horizontales y ganglionares) y células gliales (sobre todo células de Müller) dispuestas en diferentes estratos (Willermain et al., 2014), dando lugar a capas celulares y plexiformes. De esta forma se pueden distinguir en la retina estratos o capas definidos, que desde el exterior del globo ocular hacia el interior son: el epitelio pigmentario (EP), capa de los fotorreceptores (CFR, o capa de los segmentos externos de los fotorreceptores), capa nuclear externa (CNE), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme interna (CPI), capa de células ganglionares (CCG) y la capa de fibras nerviosas (CFN); además la CFR y la CNE se encuentran separadas por la membrana limitante externa (MLE), mientras que la membrana limitante interna (MLI) separa la CFN del vítreo. Un esquema de esta organización aparece en la Figura 2.

Aunque el desarrollo de la retina de mamíferos comienza en etapas embrionarias, se completa durante el periodo postnatal (P) (Santos et al., 2008). La retina de ratones P0 es fundamentalmente neuroblástica, compuesta de progenitores retinianos indiferenciados, aunque también se pueden distinguir ya la CCG y una CPI estrecha. Al final de la primera semana postnatal (P7), se pueden distinguir casi todas las capas retinianas, ya que la

capa neuroblástica primitiva ha comenzado a subdividirse mediante el desarrollo de la CPE para dar la CNE y la CNI. Por tanto, durante la segunda semana postnatal la estratificación de la retina está prácticamente completa, aunque el estado adulto definitivo no se alcanzará hasta unas semanas después cuando las células retinianas completen su diferenciación y establezcan sus conexiones definitivas (Nguyen-Ba-Charvet y Chedotal, 2014).

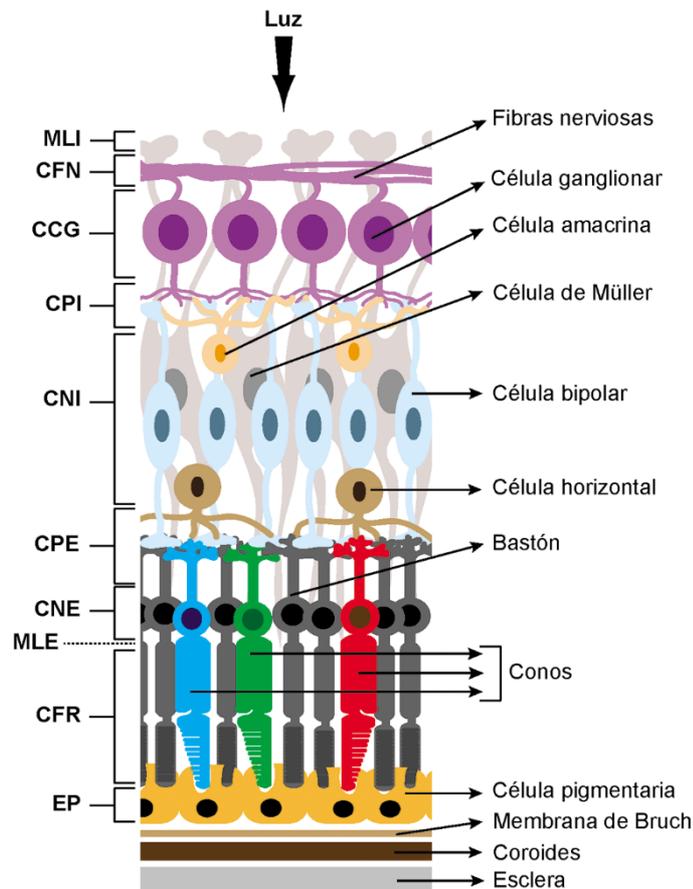


Figura 2. Estructura de la retina de vertebrados. La retina de vertebrados está formada por cinco tipos neuronales (células ganglionares, fotorreceptores, células horizontales, células amacrinas y células bipolares), así como por células gliales, todas ellas distribuidas en 10 capas o estratos: capa limitante interna (MLI), capa de fibras nerviosas (CFN), capa de células ganglionares (CCG), capa plexiforme interna (CPI), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear externa (CNE), membrana limitante externa (MLE), capa de fotorreceptores (CFR) y epitelio pigmentario (EP).

Numerosas observaciones sugieren que los fenómenos de estrés oxidativo están relacionados con el desarrollo de algunos procesos de

degeneración celular que ocurren en diversas patologías retinianas (Masuda et al., 2017). Por ejemplo, la retinitis pigmentosa (RP) se desencadena por la degeneración de los bastones (un tipo de fotorreceptor) causadas por mutaciones, lo que produce ceguera nocturna y disminución gradual de la visión periférica (O'Neal y Luther, 2019); en fases más avanzadas de la RP, hay también degeneración de los conos (el otro tipo de fotorreceptor) lo que acentúa la discapacidad visual y puede llegar a producir una ceguera total. Se ha propuesto que la degeneración de los conos (no afectados directamente por las mutaciones que producen RP) es producida por un estrés oxidativo: la degeneración inicial de los bastones origina un ambiente de hiperoxia en la retina debido a una menor tasa de consumo de oxígeno, y, como consecuencia, un incremento de la generación de ROS en las células que quedan, lo que daña progresivamente los conos (Campochiaro y Mir, 2018).

Otro órgano que está sometido a grandes cantidades de ROS es el hígado. Este órgano está organizado en estructuras denominadas lobulillos hepáticos, de forma hexagonal y formados por láminas de hepatocitos dispuestas alrededor de la vena central. Los hepatocitos se distribuyen a lo largo del lobulillo en láminas de organización radial limitando con capilares de luz amplia denominados sinusoides. Además de los hepatocitos, también podemos encontrar otros tipos celulares, tales como las células de von Kupffer, células estrelladas, colangiocitos y células endoteliales (Trefts et al., 2017).

Dada su función en el mantenimiento de la homeostasis y el metabolismo de compuestos endógenos y exógenos; durante estos procesos se liberan radicales libres, ROS y RNS, que pueden afectar a las células hepáticas. Si la producción de radicales libres no es contrarrestada por el sistema de defensa antioxidante se puede producir una desregulación de la homeostásis hepática que desencadene daño hepático (Muriel, 2009). De hecho, se considera que el estrés oxidativo es una de las causas implicadas en el inicio de enfermedades hepáticas tales como la fibrosis, cirrosis, el carcinoma hepatocelular (HCC), la enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD, del inglés *Non-alcoholic Fatty Liver Disease*) y la enfermedad de

hígado graso de tipo alcohólico (AFLD, del inglés *Alcoholic Fatty Liver Disease*) (Muriel, 2009).

Como sugiere su nombre, en las dos formas de la enfermedad de hígado graso se acumula grasa en el hígado, lo que afecta a su función. Mientras que la acumulación de grasa en AFLD estaría desencadenada por un consumo excesivo de alcohol (Osna et al., 2017); en NAFLD dicha acumulación se produce en pacientes sin consumo excesivo de alcohol y puede ser debida a una infección viral o a la presencia de hepatotoxinas (Li et al., 2015c). En ambos casos el estrés oxidativo parece tener un papel importante para el desarrollo y progresión de estas enfermedades. Así, pacientes con NAFLD muestran mayor cantidad de productos derivados de la peroxidación lipídica, como productos reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBARs), en comparación con individuos sanos (Madan et al., 2006); y la administración de resveratrol (que posee propiedades antioxidantes) en un modelo *in vivo* de hígado graso de tipo alcohólico reduce los depósitos de grasa y la producción de ROS mitocondrial, aliviando la lesión hepática inducida por el alcohol (Ma et al., 2017).

1.2. Las enzimas Poli(ADP-ribosa) Polimerasas (PARPs)

Las Poli(ADP-ribosa) Polimerasas (PARPs), conocidas también como Poli(ADP-ribosa) sintetasas o Poli(ADP-ribosa) transferasas, son una familia de 17 enzimas que llevan a cabo la modificación postraduccional de diversas proteínas diana mediante la adición de una única unidad de ADP-ribosa (proceso conocido como mono-ADP-ribosilación) o por la unión de polímeros formados por la repetición de hasta 200 unidades de ADP-ribosa (proceso conocido como poli-ADP-ribosilación) (Ame et al., 2004). De los 17 miembros que componen esta familia al menos cinco de ellas llevan a cabo poli-ADP-ribosilación y cuatro mono-ADP-ribosilación, mientras que el resto de miembros se consideran catalíticamente inactivos o se desconoce las condiciones necesarias para que lleven a cabo ADP-ribosilación (Gibson y Kraus, 2012). PARP-1 es el miembro fundador de esta familia de enzimas y es responsable de gran parte de los fenómenos de ADP-ribosilación (Schreiber et al., 2006).

Introducción

Los miembros que componen esta familia comparten cierta similitud en sus dominios catalíticos, responsables de la generación de la ADP-ribosa (Hottiger et al., 2010).

Los diferentes miembros de esta familia se pueden clasificar en 5 subgrupos en función de sus similitudes estructurales o funcionales (Gibson y Kraus, 2012) (Figura 3):

Miembro	Nombre alternativo	Subgrupo	Actividad	Dominios representativos
PARP-1	ARTD1	ADN-Dependiente	P	
PARP-2	ARTD2	ADN-Dependiente	P	
PARP-3	ARTD3	ADN-Dependiente	M	
PARP-5a	Tankirasa 1, ARTD5	Tankirasa	P	
PARP-5b	Tankirasa 2, ARTD6	Tankirasa	P	
PARP-7	TiPARP, ARTD14	CCCH	M‡	
PARP-12	ZC3HDC1, ARTD12	CCCH	M‡	
PARP-13	ZC3HAV1, ARTD13	CCCH	I	
PARP-9	BAL1, ARTD9	MacroPARP	I	
PARP-14	BAL2, ARTD8	MacroPARP	M	
PARP-15	BAL3, ARTD7	MacroPARP	M‡	
PARP-4	vPARP-4, ARTD4	Otras PARP	P‡	
PARP-6	ARTD17	Otras PARP	M‡	
PARP-8	ARTD16	Otras PARP	M‡	
PARP-10	ARTD10	Otras PARP	M	
PARP-11	ARTD11	Otras PARP	M‡	
PARP-16	ARTD15	Otras PARP	M‡	

Figura 3. Familia PARP. Representación esquemática de los miembros que forman parte de la familia de Poli(ADP-ribosa) Polimerasas (PARPs) agrupados según sus dominios estructurales más representativos. Se indica la denominación alternativa para cada uno de los miembros, el subgrupo en el que se integran y la actividad de tipo transferasa demostrada o propuesta, así como una representación esquemática de los dominios estructurales o motivos proteicos más llamativos de cada miembro. ANK, dominio anquirina; BCRT, motivo de interacción proteína-proteína; CAT, dominio catalítico; CCCH, dedos de zinc; I, inactiva; M, mono-ADP-ribosilación; P, poli-ADP-ribosilación; WGR, motivo rico en triptófano (W), glicina (G) y arginina (R); WWE, motivo rico en triptófano (W) y glutámico (E); Zn1/2/3, motivos de dedos de zinc (Zn); ‡ actividad catalítica propuesta. La figura se ha elaborado a partir de la información obtenida de Gibson y Kraus (2012), y Hottiger et al. (2010).

PARPs dependientes de ADN. Este subgrupo está constituido por PARP-1, PARP-2 y PARP-3. Estos miembros se localizan fundamentalmente en el núcleo celular (Ame et al., 2004; Hassa y Hottiger, 2008; Schreiber et al., 2006). Su activación se desencadena por la presencia de roturas en el ADN y participan en la reparación de dicho daño (Gibson y Kraus, 2012; Hakme et al., 2008b). De este subgrupo, PARP-1 fue descrita por primera vez por el Dr. Chambon y colaboradores en la década de los 60 (Chambon et al., 1963) y se la considera el miembro fundador de la familia PARP. PARP-1 lleva a cabo la transferencia de polímeros de unidades de ADP-ribosa a diversos aceptores nucleares en respuesta fundamentalmente a roturas de cadena simple (SSBs, del inglés *Single Strand Breaks*), pero también de cadena doble (DSBs, del inglés *Double Strand Breaks*). Además, la formación de entrecruzamientos en el ADN y de horquillas de replicación tienen la capacidad de activar a PARP-1 (Gibson y Kraus, 2012; Hakme et al., 2008b). PARP-2 posee una similitud del 69% con PARP-1 y también se activa por la presencia de roturas en el ADN (Ame et al., 1999; Shieh et al., 1998). Las células deficientes en PARP-1 y PARP-2 exhiben una marcada inestabilidad cromosómica y una reparación defectuosa del ADN (Schreiber et al., 2002). PARP-3 presenta una alta similitud con PARP-1 y PARP-2, preservando un dominio catalítico semejante con el aminoácido glutámico en la posición 188 y puede verse activada por roturas en el ADN, fundamentalmente DSBs (Rulten et al., 2011); sin embargo, en vez de catalizar poli-ADP-ribosilaciones, como hacen PARP-1 y -2, cataliza mono-ADP ribosilaciones (Hottiger et al., 2010).

Tankirasas. Tankirasa-1 (PARP-5a) y Tankirasa-2 (PARP-5b) presentan una alta homología entre ellas (85%), tienen un dominio ankirina (formado por la repetición de varios motivos de ankirina) que intervienen en interacciones proteína-proteína, un dominio SAM (del inglés *sterile alpha motif*) implicado en la auto-oligomerización de la enzima (Gibson y Kraus, 2012; Hsiao y Smith, 2008; Smith et al., 1998) y un dominio catalítico que presenta una similitud del 94% con PARP-1 (Hsiao y Smith, 2008). Una característica diferencial de la tankirasa-1 respecto de la tankirasa-2 es la presencia de una región HPS (caracterizada por la existencia de tramos homopoliméricos compuestos por los

aminoácidos histidina [H], prolina [P] y serina [S]) en la región N'-terminal (Li y Chen, 2014). A pesar de estas diferencias, las tankirasas-1 y 2 llevan a cabo funciones muy similares, encontrándose asociadas con el mantenimiento de los telómeros (Sbodio et al., 2002), la señalización Wnt (Riffell et al., 2012), la regulación de la mitosis (Chang et al., 2005a; Chang et al., 2005b; Kim et al., 2012; Kim y Smith, 2014) y el metabolismo de la glucosa (Guo et al., 2012; Yeh et al., 2006). Recientemente, se han detectado nuevas funciones de las tankirasas relacionadas con la regulación del crecimiento tumoral, ya que la inhibición de las tankirasas inhibe la actividad pro-oncogénica del coactivador transcripcional YAP1, implicado en el control del crecimiento celular y el tamaño de los tejidos (Wang et al., 2015). Asimismo, la inhibición de las tankirasas evita la degradación de la fosfatasa PTEN, que a su vez impide la activación del enzima Akt (Li et al., 2015b), enzima que estimula el crecimiento celular y está implicada en el desarrollo de algunos tipos de tumores. Por todo esto se ha propuesto a las tankirasas como posibles dianas en el tratamiento de algunos tipos de cáncer.

PARPs tipo CCCH. Dentro de este grupo encontramos a las PARP-7, PARP-12 y PARP-13. Todas ellas poseen una organización similar entre ellas, presentando estructuras de dedos de zinc del tipo Cx8-Cx5-Cx3 y un dominio WWE (dominio de interacción proteína-proteína que presenta un motivo conservado formado por dos residuos de triptófano [W] y glutámico [E]) (Schreiber et al., 2006). PARP-7 posee actividad mono-ADP-ribosil transferasa y está regulada por el receptor AHR (del inglés *Aryl hydrocarbon receptor*) (MacPherson et al., 2013); PARP-12 participa en la replicación del virus de la encefalitis equina (VEEV) (Atasheva et al., 2012) y PARP-13 es catalíticamente inactiva.

MacroPARPs. Dentro de este grupo se encuentran las proteínas PARP-9, PARP-14 y PARP-15. Este grupo se caracteriza por la presencia de 1 a 3 macrodominios, estructuras también presentes en variantes de la histona H2A, asociada con la inhibición de la transcripción y la inactivación del cromosoma X (Angelov et al., 2003; Hakme et al., 2008a). PARP-9 y PARP-14 parecen actuar

como reguladores del proceso de transcripción (Juszczynski et al., 2006; Mehrotra et al., 2011), mientras que se desconoce la actividad de PARP-15.

Otras PARPs. En este grupo se encuentran todos aquellos miembros que no comparten ningún dominio estructural con los miembros anteriores. En este grupo encontramos a las PARP-4, PARP-6, PARP-8, PARP-10, PARP-11 y PARP-16 (Li y Chen, 2014). PARP-4 es el miembro con mayor número de aminoácidos de la familia PARP, está asociado a un complejo ribonucleoproteico presente en el citoplasma celular (Raval-Fernandes et al., 2005), y puede estar implicada en la supresión tumoral (Raval-Fernandes et al., 2005). A diferencia de PARP-4, el resto de miembros de este subgrupo poseen actividad mono-ADP-ribosil transferasa (Gibson y Kraus, 2012). En cuanto a sus funciones fisiológicas, PARP-6 parece regular negativamente la proliferación celular (Tuncel et al., 2012), PARP-10 interacciona con el factor de transcripción *c-myc* (Yu et al., 2005) y PARP-16 parece intervenir en la activación de las proteínas PERK e IRE1 α en situaciones de estrés del retículo endoplasmático (Jwa y Chang, 2012). Se desconoce la función del resto de miembros de este grupo.

1.2.1. Estructura de PARP-1

Dado que el objetivo de esta Tesis doctoral es el estudio del papel de PARP-1 en la muerte celular inducida por estrés oxidativo en las siguientes secciones se hace una revisión de las características y funciones más destacadas. PARP-1 es una proteína nuclear de 116 kDa con una estructura modular distribuida en varios dominios que a su vez albergan diferentes subdominios o regiones (Krishnakumar y Kraus, 2010) (Figura 4):

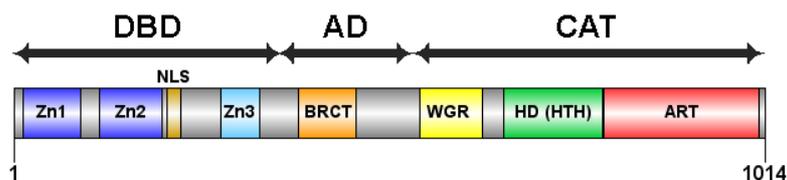


Figura 4. Estructura de la proteína PARP-1. Representación esquemática de la estructura de la proteína PARP-1, compuesta por 3 dominios: a) el dominio de unión al ADN (DBD) en la región N-terminal que contiene tres motivos de dedos de zinc (Zn1, Zn2, Zn3), además de la secuencia NLS; b) el dominio de automodificación (AD) que contiene la región BRCT; c) el dominio catalítico (CAT) en el extremo C-terminal, que contiene la zona de unión del NAD⁺ (ART) y la región rica en motivos HTH o HD. Imagen elaborada a partir de la información obtenida de Hassa y Hottiger (2008); Krishnakumar y Kraus (2010).

Dominio de unión al ADN (DBD). Está localizado en la región N-terminal, posee un tamaño de 46 kDa, y media la unión de la proteína al ADN (Kim et al., 2005; Kraus y Lis, 2003; Kurosaki et al., 1987; Virag, 2005). Presenta dos motivos de dedos de zinc, Zn1 y Zn2, de estructura Cys-Cys-His-Cys (CCHC), que permiten el reconocimiento de roturas o estructuras en las cadenas de ADN, y su unión al ADN (Langelier y Pascal, 2013; Langelier et al., 2011; Lindahl et al., 1995). En los últimos años se ha identificado un nuevo motivo de dedos de zinc, denominado Zn3, que estaría implicado en la comunicación entre dominios necesaria para la activación de PARP-1 tras el reconocimiento de daños o estructuras en el ADN (Langelier et al., 2010; Langelier et al., 2008; Martin-Hernandez et al., 2017; Pascal y Ellenberger, 2015).

Finalmente, en este dominio podemos encontrar una secuencia de localización nuclear (NLS, del inglés *Nuclear Localization Signal*), responsable de la localización nuclear de la proteína (Piao et al., 2018) así como un sitio proteolítico para las caspasas 3 y 7 (Kaufmann et al., 1993; Lazebnik et al., 1994).

Dominio de automodificación (AD). Este dominio central de 22 kDa se caracteriza por la presencia de los aminoácidos glutámico, aspártico y lisina; aminoácidos a los que la propia enzima adicionará residuos de ADP-ribosa para controlar su actividad. En este dominio también se puede encontrar una

cremallera de leucina (LZ, del inglés *Leucine Zipper*) responsable de la interacción de la proteína PARP-1 con proteínas nucleares en procesos de homo- y heterodimerización. Por último, cabe destacar la presencia de un motivo BCRT (del inglés *Breast Cancer Associated Protein C-Terminal Motif*), común a muchas proteínas implicadas en la reparación del ADN y ciclo celular (D'Amours et al., 1999; Diefenbach y Burkle, 2005), encargado de mediar interacciones proteína-proteína (Langelier y Pascal, 2013).

Dominio catalítico (CAT). Este dominio localizado en la región C-terminal, con un tamaño de 54 kDa, representa la región más conservada dentro la familia de proteínas PARPs (Kim et al., 2005; Kraus y Lis, 2003; Kurosaki et al., 1987; Virag, 2005). Dentro de este dominio encontramos la región que contiene la actividad ADP-ribosil transferasa (ART) donde se producirá la unión del NAD⁺, molécula donadora de las unidades de ADP-ribosa. En esta región se lleva a cabo tres actividades distintas: a) la unión de la primera unidad de ADP-ribosa a la secuencia aminoacídica de la proteína aceptora, b) la elongación por adición de nuevas unidades de ADP-ribosa a la ADP-ribosa anterior, y c) la generación de ramificaciones en la cadena de ADP-ribosa principal (Langelier y Pascal, 2013). Además, el dominio catalítico de PARP-1 también contiene una región caracterizada por la presencia de dos motivos hélice-giro-hélice (HTH o HD, del inglés *Helix-Turn-Helix*) (Babiychuk et al., 2001); cerca de ella hay otra región, denominada WGR, rica en los aminoácidos triptófano (W), glicina (G) y arginina (R) que participa en el reconocimiento de los daños de doble cadena junto con los motivos Zn1 y Zn2 del dominio DBD y media en las interacciones entre los distintos dominios (Altmeyer et al., 2009).

1.3. Metabolismo de la poli-ADP-ribosa

La actividad catalítica de PARP-1 consiste en la modificación postraduccional de diversas proteínas aceptoras, o incluso de ella misma, mediante la unión de polímeros ramificados formados distintas unidades de ADP-ribosa, denominados comúnmente polímeros PAR (del inglés *Poly-ADP-*

ribose) o polímeros de poli-ADP-ribosa a través de un proceso denominado poli-ADP-ribosilación (en inglés *PARylation*). Los polímeros de poli-ADP-ribosa pueden tener una longitud variable, aproximadamente de unas 200 unidades de ADP-ribosa, con ramificaciones cada 20-50 reacciones de elongación (Gibson y Kraus, 2012); con microscopía electrónica o por microscopía de fuerza atómica los polímeros PAR aparecen con forma estrellada y altamente ramificados (de Murcia et al., 1983; Hayashi et al., 1983; Sukhanova et al., 2016).

1.3.1. Síntesis de la poli-ADP-ribosa

La generación de los polímeros PAR es llevada a cabo por el dominio catalítico de la enzima PARP-1, utilizando al cofactor NAD^+ , que también es preciso para la síntesis de ATP, como donador de las unidades de ADP-ribosa (Figura 5). El proceso se puede dividir en tres fases principales (Burkle, 2005; Gibson y Kraus, 2012; Hassa y Hottiger, 2008):

a) **Iniciación.** La primera unidad de ADP-ribosa se une a la proteína aceptora mediante un enlace éster con el grupo carboxilo de los aminoácidos glutámico, aspártico o lisina gracias a la actividad ADP-ribosa transferasa de PARP-1. La unidad de ADP-ribosa proviene de una molécula de NAD^+ que además produce una molécula de nicotinamida.

b) **Elongación.** Para la formación de las cadenas lineales del polímero PAR se produce la unión de una nueva unidad de ADP-ribosa a la ADP-ribosa terminal mediante enlaces O-glicosídicos $\alpha(1\rightarrow 2)$.

c) **Ramificación.** Los puntos de ramificación se generan cada 20-50 reacciones de elongación mediante la unión de dos unidades de ADP-ribosa proximales.

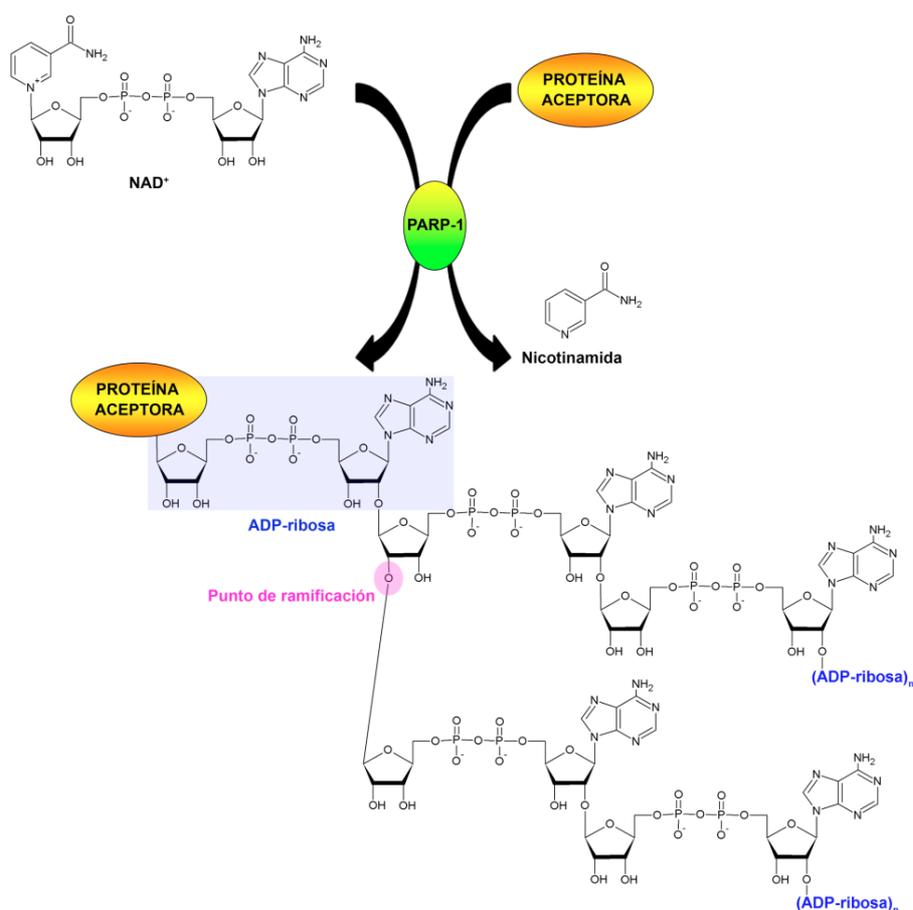


Figura 5. Estructura de la poli-ADP-ribosa. PARP-1 usa como sustrato el cofactor NAD⁺ para obtener una molécula de ADP-ribosa y otra de nicotinamida. La ADP-ribosa es unida mediante un enlace éster a los aminoácidos glutámico (Glu), aspártico (Asp) o lisina (Lys) de la proteína aceptora. La poli-ADP-ribosa o polímero PAR se obtiene mediante la unión de diversas unidades de ADP-ribosa en un proceso de elongación y ramificación. Las estructuras químicas mostradas en esta imagen se han elaborado con la herramienta ACD/ChemSketch Freeware, versión 11.02, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, On, Canada, www.acdlabs.com, 2019.

1.3.2. Degradación de la poli-ADP-ribosa

La poli-ADP-ribosilación es una modificación postraduccional, que al igual que otras modificaciones postraduccionales como la fosforilación es reversible. Aunque el polímero PAR se produce en gran cantidad como consecuencia de daño en el ADN, también se forma una cierta cantidad de polímero en ausencia de daño (D'Amours et al., 1999). La vida media del

polímero PAR sintetizado en respuesta al daño en el ADN es relativamente corta ($t_{1/2} < 1$ minuto), en comparación con el tiempo de vida del polímero sintetizado en ausencia de daño ($t_{1/2}$ de 7.7 horas) (Alvarez-Gonzalez y Althaus, 1989; D'Amours et al., 1999). El hecho de que la vida media de PAR sea corta permite que PARP-1 quede disponible para nuevos ciclos de detección, señalización y reparación del daño (Gibson y Kraus, 2012; Kim et al., 2005). De hecho, si no se degrada el polímero PAR se producen con frecuencia reparaciones defectuosas del ADN y un incremento de la muerte celular (Shirai et al., 2013).

Una de las enzimas encargadas de la eliminación y reciclado de PAR es la enzima Poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa (PARG), que presenta actividad endo- y exo-glicohidrolasa. PARG cataliza la hidrólisis de los enlaces glicosídicos que unen a las unidades de ADP-ribosa entre sí (Barkauskaite et al., 2013; Lin et al., 1997; Slade et al., 2011), aunque no es capaz de eliminar la unidad de ADP-ribosa unida a la proteína diana mediante enlace éster.

La eliminación de la unidad de ADP-ribosa unida a la proteína diana es llevada cabo por diferentes enzimas dependiendo de la naturaleza del enlace químico: en el caso de la hidrólisis de la ADP-ribosa unida a serina es llevada a cabo por la enzima ADP-ribosilhidrolasa-3 (ARH3) (Abplanalp et al., 2017; Fontana et al., 2017), mientras que la enzima ARH1 media la hidrólisis de la ADP-ribosa unida a arginina. Asimismo, se ha descrito un grupo de enzimas que poseen macrodominios que también llevarían a cabo la hidrólisis de la ADP-ribosa unida a la proteína. En este grupo encontramos a las enzimas MacroD1, MacroD2 y TARG-1 que mediarían la hidrólisis de la ADP-ribosa unida a glutámico y aspártico (Jankevicius et al., 2013; Rack et al., 2016; Rosenthal et al., 2013; Sharifi et al., 2013). Recientemente, se han descrito otras enzimas que actuarían como hidrolasas al llevar a cabo la ruptura enlace pirofosfato, dejando unida una unidad de ribosa-5-fosfato a la proteína. Estas enzimas son las enzimas NUDIX (del inglés *Nucleoside Diphosphate linked to other moieties X*) y ENPP (del inglés *Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase*); no obstante, estas enzimas no están del todo caracterizadas (Daniels et al., 2015; Palazzo et al., 2016; Palazzo et al., 2015).

1.4. Funciones de PARP-1

El enzima PARP-1 participa en diferentes funciones celulares. En las secciones siguientes se tratará acerca de esta participación en diferentes procesos.

1.4.1. Reparación del ADN

Una de las funciones más estudiadas en relación a la actividad de PARP-1 es su implicación en los procesos de reparación del daño en el ADN (Langelier et al., 2012). PARP-1 puede detectar SSBs y DSBs (Gibson y Kraus, 2012; Langelier et al., 2011). Tras la unión a los sitios de daño, proceso en que intervienen los motivos en dedos de zinc Zn1 y Zn2, se reorganizan el motivo Zn3 y la región WGR para promover la comunicación entre los diferentes dominios y facilitar la activación de la enzima (Langelier et al., 2012). Asimismo, la unión al ADN genera cambios en la región HD del dominio catalítico para permitir la unión del NAD⁺ (Dawicki-McKenna et al., 2015; Steffen et al., 2016). Esta activación culmina con la poli-ADP-ribosilación de la propia proteína, así como de histonas y otras proteínas implicadas en las rutas de reparación del ADN (Gibson y Kraus, 2012). La poli-ADP-ribosilación de histonas permite la relajación de la cromatina, y, por consiguiente, el acceso al ADN de la maquinaria de reparación. Por tanto, PARP-1 favorece la reparación mediante la modificación de la organización de la cromatina. Recientemente se ha identificado un co-regulador de PARP-1 denominado HPF1 (del inglés *Histone PARylation Factor 1*) que evita una excesiva automodificación (poli-ADP-ribosilación) de la misma PARP-1, mientras que promueve la poli-ADP-ribosilación de las histonas (Gibbs-Seymour et al., 2016); en ausencia de este factor se produce un exceso de poli-ADP-ribosilación de PARP-1, una menor poli-ADP-ribosilación de histonas, y una menor tasa de reparación del ADN (Gibbs-Seymour et al., 2016). Además, la activación de PARP-1 también promueve la remodelación de la cromatina mediante el reclutamiento de la deacetilasa CHD4 (del inglés *chromodomain helicase DNA-binding protein 4*) (Chou et al., 2010).

Por otro lado, la generación de los polímeros PAR concentra las proteínas implicadas en la reparación del daño en los sitios de lesión (Gibson y Kraus, 2012), gracias a la presencia en estas proteínas de regiones o dominios de unión a polímero PAR (Li y Chen, 2014; Teloni y Altmeyer, 2016). Existen diferentes regiones o dominios implicados en el reconocimiento del polímero PAR: motivos PBMs (del inglés *PAR-Binding Consensus Motifs*), PBZs (del inglés, *PAR-Binding Zinc Finger Motifs*), macrodominios, regiones WWE y BRCT (Li y Chen, 2014).

En resumen, PARP-1 tiene un papel crucial en la reparación del daño en el ADN bien a través de la modificación de la organización de la cromatina o mediante la modificación y reclutamiento de proteínas implicadas en los procesos de reparación del ADN. A continuación, se describen los principales procesos de reparación conocidos y la participación de PARP-1 en ellos.

1.4.1.1. Mecanismos de reparación de roturas de cadena simple

Las SSBs son detectadas rápidamente por PARP-1, y su activación permite el reclutamiento, agrupamiento y estabilización de proteínas reparadoras en la zona del daño. Uno de los factores clave en las etapas iniciales de la reparación de las SSBs, es el factor XRCC1 (del inglés *X-ray repair cross-complementing protein 1*), que es rápidamente reclutado a la zona de la lesión gracias a la activación de PARP-1 (Caldecott et al., 1994; El-Khamisy et al., 2003; Polo et al., 2019) (Figura 6). XRCC1 actúa entonces como sitio de anclaje para las proteínas reparadoras, como las enzimas ADN ligasa III, la fosfatasa PNKP (del inglés *Polynucleotide kinase 3'-phosphatase*) y la ADN polimerasa β (Caldecott et al., 1994; Marintchev et al., 2000; Whitehouse et al., 2001). Las mutaciones en XRCC1 reducen la tasa de reparación de daño; como el daño en el ADN no se repara, se produce una hiperactivación de PARP-1 que a su vez ocasiona una caída de los niveles de NAD^+ celular y la muerte celular debido a la falta de ATP (Hoch et al., 2017).

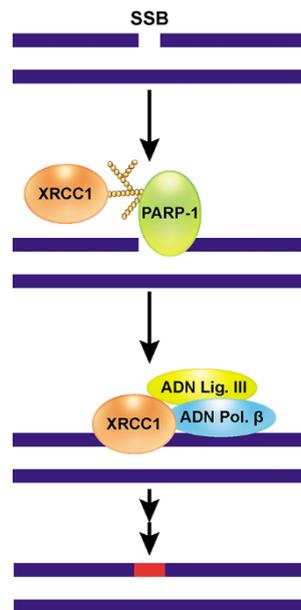


Figura 6. Papel de PARP-1 en la reparación de roturas de cadena simple. PARP-1 es necesaria en las etapas iniciales en el proceso de reparación directa de roturas de cadena simple (SSBs). PARP-1 se activa cuando detecta y se une a una de estas roturas. El factor XRCC1 se une a los polímeros de PAR generados, siendo reclutado hacia la zona dañada. XRCC1 localizado en la zona de daño permite el reclutamiento de las proteínas reparadoras tales como la enzima ADN ligasa III (ADN Lig. III), la quinasa PNKP y la ADN Polimerasa β (ADN Pol. β), culminando con la reparación del daño.

PARP-1 también tiene un papel importante en la reparación de las roturas en el ADN generadas como consecuencia de la inhibición de la actividad de la enzima Topoisomerasa I (Das et al., 2014). La inhibición de la actividad de la Topoisomerasa I, genera roturas en una de las cadenas del ADN, así como la formación de un complejo Topoisomerasa I-ADN (Pommier, 2006; Pouliot et al., 1999; Yang et al., 1996) que impide que las roturas sean reparadas. La reparación de estas mellas necesita la previa disociación de la Topoisomerasa I del ADN, disociación que es llevada a cabo por la fosfodiesterasa TDP1 (Pommier, 2006; Pouliot et al., 1999; Yang et al., 1996). La poli-ADP-ribosilación de TDP1 favorece la actuación de TDP1 y la disociación de estos, y por consiguiente, la exposición de la rotura en el ADN (Das et al., 2014). Esta rotura simple podría desencadenar entonces el reclutamiento de XRCC1 y de toda la maquinaria de reparación directa de las SSBs.

En algunos casos no se produce la rotura completa de la cadena de ADN, sino solo modificaciones puntuales de las bases, como son la formación de sitiosapurínicos o apirimidínicos, la alquilación de bases o el daño generado en las bases por las ROS. Estos daños se reparan mediante el sistema de reparación por escisión de bases (BER): la base dañada se escinde de la cadena de ADN mediante la ADN glicosilasa y la endonucleasa AP (del inglés *Apurinic/apyrimidinic endonuclease*) (Bokhari y Sharma, 2019), generándose en este último paso SSBs, que podrían ser reparadas por la maquinaria de reparación comentada anteriormente. A diferencia de lo que sucede en la reparación directa de SSBs, el papel de PARP-1 en el proceso de BER es controvertido. Por un lado, Danzter y colaboradores (2000) sugieren que PARP-1 sería crucial en el proceso BER ya que células deficientes en PARP-1 muestran una eficiencia menor en la reparación de sitios abásicos. Sin embargo, diversos estudios muestran que la inhibición de PARP-1 o su depleción no genera siempre una mayor sensibilidad a agentes genotóxicos (Pachkowski et al., 2009; Strom et al., 2011; Vodenicharov et al., 2000). Recientemente, Reynolds y colaboradores (2015) han establecido que PARP-1 sería necesaria en un subtipo concreto de reparación BER, la reparación de daños en bases purínicas, mientras que no lo sería en la reparación de daños en bases pirimidínicas. Por tanto, la importancia de PARP-1 en la ruta de reparación BER dependería del tipo de lesión.

Finalmente, los daños generados por agentes mutagénicos, como la radiación ultravioleta, son reparados mediante el sistema conocido como reparación por escisión de nucleótidos (NER, del inglés *Nucleotide Excision Repair*). La ruta NER puede verse iniciada por dos mecanismos, la GG-NER (del inglés *Global Genome Nucleotide Excision Repair*) o la TC-NER (del inglés *Transcription-coupled Nucleotide Excision Repair*). La GC-NER lleva a cabo la reparación de lesiones a lo largo de todo el genoma, mientras que la TC-NER se encarga de la rápida reparación de lesiones localizadas en zonas de transcripción activas (Gillet y Scharer, 2006; Hanawalt y Spivak, 2008). Ambas rutas se diferencian en las etapas iniciales de detección del daño, compartiendo etapas posteriores. La TC-NER, no del todo esclarecida en

eucariotas, es iniciada cuando la enzima ARN polimerasa II se detiene en la zona de la lesión (Hanawalt y Spivak, 2008). Sin embargo, en el caso de la GG-NER, el daño es detectado por las proteínas XPC (del inglés *Xeroderma pigmentosum group C-complementing protein*) y RAD23B (del inglés *RAD23 homologue B*) (Marteijn et al., 2014). Ambas se asocian con el complejo formado por las proteínas DDB1 y DDB2 (del inglés *DNA Damage Binding Protein 1 and 2*) y llevan a cabo la ubiquitinización de histonas, lo que permite la relajación de la cromatina, y por tanto, el acceso a la zona dañada de la maquinaria de reparación (Guerrero-Santoro et al., 2008). La poli-ADP-ribosilación de DDB2 incrementaría la estabilidad de la proteína, así como el reclutamiento del complejo remodelador de cromatina ALC1 (del inglés *Amplified in liver cancer protein 1*) (Pines et al., 2012). El reclutamiento de ALC1 generaría una mayor relajación de la cromatina, permitiendo a su vez una mayor concentración de XPC en la zona de la lesión (Pines et al., 2012).

1.4.1.2. Mecanismos de reparación de roturas de cadena doble

La generación de roturas de doble cadena en el ADN, DSBs, puede deberse a diversas causas, como la acción de agentes genotóxicos (radiación ionizante o agentes quimioterápicos, etc.) o por un colapso en la replicación del ADN (Mehta y Haber, 2014). Independientemente de su origen de las DSBs, este tipo de roturas, son fuertemente tóxicas, ya que pueden generar reorganizaciones importantes en el genoma e incluso desencadenar la muerte celular (Chapman et al., 2012). Para repararlas y evitar estas graves consecuencias, los organismos han desarrollado una serie de mecanismos como la reparación por recombinación homóloga (HR, del inglés *Homologous Recombination*) y la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *Non-homologous End Joining*) (Chapman et al., 2012; Mehta y Haber, 2014).

La HR utiliza una secuencia homóloga, normalmente una cromátida hermana, como molde para la reparación del daño. Aunque existen diferentes tipos de HR, todas ellas necesitan el reconocimiento y procesamiento de las

DSBs para generar extremos 3' protuberantes en el ADN, en un proceso denominado resección que consiste en la degradación de la zona de las cadenas de ADN junto a la rotura DSB en dirección 5' a 3' por nucleasas como la nucleasa Mre11 (del inglés *Meiotic recombination 11*) (Mehta y Haber, 2014; Wright et al., 2018). PARP-1 detecta las DSBs y permite el reclutamiento de Mre11, favoreciendo el proceso de resección y subsiguiente reparación por HR (Bryant et al., 2009) (Figura 7). Las proteínas BRCA1 (del inglés *Breast cancer type 1 susceptibility protein*) y RAP80, entre otras, intervienen en la regulación del proceso de recombinación, evitando una resección excesiva (Coleman y Greenberg, 2011; Hu et al., 2011). Estas proteínas son reclutadas a los sitios de daño por la ubiquitinación de la forma fosforilada de la histona H2AX (γ -H2AX), propia de las regiones dañadas de ADN, y del factor MDC1 (del inglés *Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) (Harper y Elledge, 2007). BRCA1 también puede verse reclutada sin la actuación de γ -H2AX y MDC1: la activación de PARP-1 produce la poli-ADP-ribosilación de BRCA1 (Hu et al., 2014), que a su vez se fija a RAP80 a través del polímero PAR formado (Kim et al., 2007; Mailand et al., 2007; Sobhian et al., 2007) (Figura 7). En este sentido, la poli-ADP-ribosilación defectuosa de BRCA1 conlleva a una HR excesiva e inestabilidad del genoma, lo que permite suponer que la modificación de BRCA1 por parte de PARP-1 es un evento crucial en la regulación de la HR (Hu et al., 2014).

La reparación por unión de extremos no homólogos, NHEJ, a diferencia de la HR, implica la modificación y ligación de los extremos de las zonas dañadas con muy poca o nula homología, generando deleciones e inserciones (Mehta y Haber, 2014). En este sistema de reparación, las DSBs son reconocidas por las proteínas Ku70 y Ku80 que actúan como sitio de anclaje para otras proteínas implicadas en la NHEJ, como la quinasa DNA-PKcs (del inglés *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*), la proteína XRCC4 (del inglés *X-ray cross complementing protein 4*), el factor XLF (del inglés *XRCC4-like factor*), el factor APLF (del inglés *Aprataxin-and-PNK-like factor*) y la ADN ligasa IV (Chang et al., 2017; Davis y Chen, 2013; Gell y Jackson, 1999; Singleton et al., 1999). PARP-1 podría regular la actividad de la quinasa DNA-

PKcs, estimulando su actividad (Ruscetti et al., 1998), y se ha visto que ambas enzimas son necesarias para la reparación de las DSBs (Mitchell et al., 2009) (Figura 7). Se ha propuesto que PARP-1 también puede modular la ruta NHEJ mediante cambios en la organización de la cromatina (Luijsterburg et al., 2016).

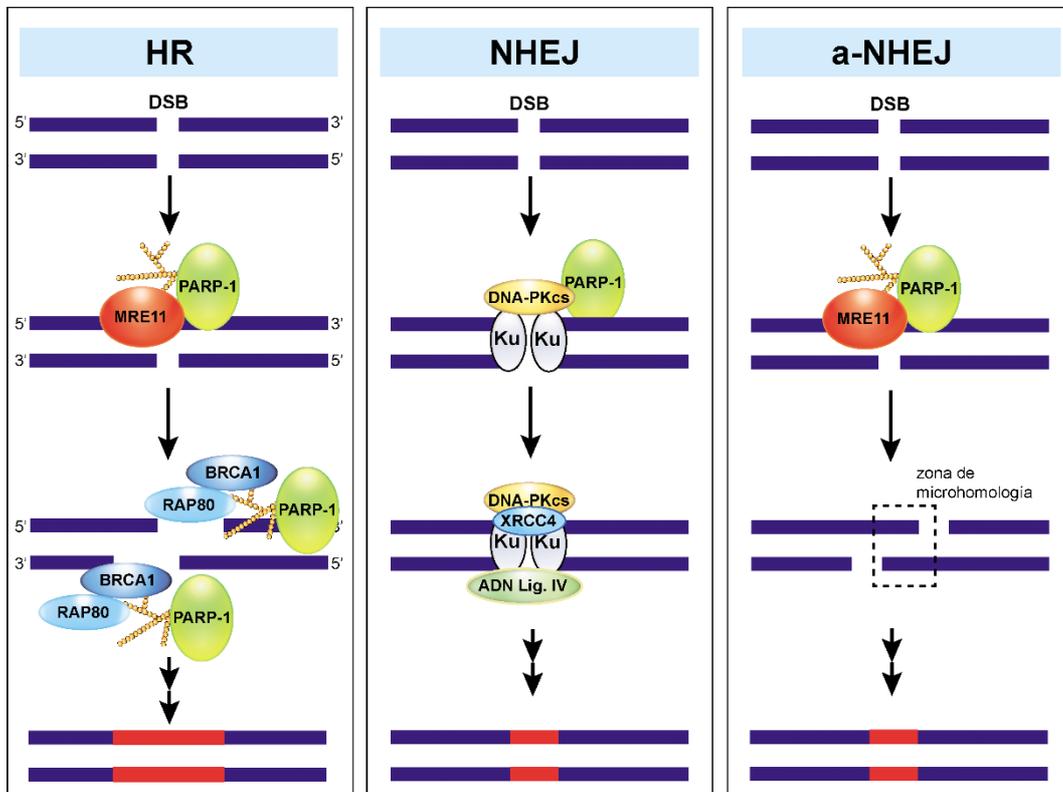


Figura 7. Papel de PARP-1 en la reparación de roturas de cadena doble. PARP-1 ante roturas de cadena doble, DSBs, lleva a cabo el reclutamiento de la nucleasa Mre11, necesaria para el proceso de resección de la recombinación homóloga (HR). Asimismo, PARP-1 también permite el reclutamiento del complejo formado por BRCA1 y RAP80, gracias a la poli-ADP-ribosilación de BRCA1. Este complejo regula la HR, evitando una excesiva resección y la aparición de inestabilidad genómica. Por otro lado, PARP-1 también puede regular los procesos de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ), permitiendo el reclutamiento de la quinasa DNA-PKcs. Finalmente, PARP-1 también podría intervenir en la ruta alternativa de la NHEJ (a-NHEJ). En este caso, PARP-1 mediaría el anclaje de la nucleasa Mre11, que llevaría a cabo un proceso de resección. En esta ruta alternativa, se procedería a la ligación y reparación de los extremos por la presencia de microhomologías de los extremos. (ADN Lig. IV, ADN ligasa IV; Ku: complejos Ku70-Ku80).

Finalmente, PARP-1 también ha sido relacionada con la ruta alternativa de NHEJ, denominada a-NHEJ. Esta ruta se basa en la existencia de microhomologías entre los extremos de ADN contiguos a la lesión, y en ella intervienen proteínas implicadas en el proceso de resección, como la nucleasa Mre11 (Betermier et al., 2014; Truong et al., 2013). Esta vía genera frecuentemente inserciones y deleciones, por lo que es altamente mutagénica (Betermier et al., 2014). PARP-1 puede unirse a la zona de lesión y mediar el anclaje de la nucleasa Mre11 (Cheng et al., 2011) (Figura 7). Además hay indicios de que PARP-1 podría estar relacionada también con la ADN polimerasa θ , implicada en la ruta a-NHEJ (Ceccaldi et al., 2015; Mateos-Gomez et al., 2015; Yoshimura et al., 2006; Yousefzadeh et al., 2014).

1.4.1.3. Respuesta al daño en el ADN y papel de PARP-1

Los organismos eucariotas han desarrollado una ruta de señalización celular encargada de detectar daños en el ADN, ya sea SSBs o DSBs, o estrés en el proceso de replicación del ADN, y generar una respuesta para proteger a la célula en la que intervienen un amplio espectro de enzimas (nucleasas, polimerasas, helicasas, ligasas, etc.), organizadas en diferentes rutas de reparación. El resultado de esta respuesta será la reparación del daño o la eliminación de aquellas células con daños irreparables (Marechal y Zou, 2013). Por tanto, existe tanto una detección del daño, descrita en la sección anterior, como una respuesta al daño. Entre ambas fases ha de haber un sistema de señalización que produzca la activación de la maquinaria necesaria en el lugar y momento apropiados.

Al proceso se le denomina globalmente respuesta al daño en el ADN (DDR, del inglés *DNA Damage Response*). La cascada DDR está compuesta por una serie de proteínas que comprenden: sensores del daño en el ADN, proteínas que reciben la información proporcionada por los sensores y proteínas que generan la respuesta. Las proteínas centrales que reciben la información de los sensores y ejecutan la respuesta ante el estímulo son un grupo de enzimas de la familia de quinasas relacionadas con la fosfatidil-

inositol 3 quinasa, PIKK (del inglés *phosphatidylinositol-3-kinase-like kinase family*) (Abraham, 1998); como las quinasas ATM (del inglés *Ataxia-telangiectasia mutated*), ATR (del inglés *ATM-and Rad3-Related*) y DNA-PKcs (Ciccia y Elledge, 2010).

ATM responde a las DSBs (Andegeko et al., 2001; Bekker-Jensen et al., 2006), aunque también puede activarse por estrés oxidativo (Guo et al., 2010) o por cambios en la organización de la cromatina (Olcina et al., 2013), gracias a la interacción con la proteína NSB1, perteneciente al complejo MRN, formado además por la nucleasa Mre11 y Rad50 (Carney et al., 1998; Falck et al., 2005). Independientemente del mecanismo de activación, ATM cataliza la fosforilación de numerosos sustratos (Matsuoka et al., 2007; Mu et al., 2007; Paulsen et al., 2009) en los aminoácidos serina (S) o treonina (T) seguidos de glutamina (Q), denominados motivos SQ y TQ, respectivamente (Kim et al., 1999). Estos sustratos están relacionados no solo con la reparación del daño, sino también con otros procesos celulares tales como control del ciclo celular, apoptosis, senescencia, organización de la cromatina, transcripción o procesamiento de ARN mensajero (ARNm) (Shiloh y Ziv, 2013).

ATR también lleva a cabo la fosforilación de sus sustratos en motivos SQ y TQ (Kim et al., 1999) y puede activarse por DSBs, aunque su activación está más relacionada con la respuesta al estrés replicativo (Marechal y Zou, 2013). Al igual que ATM, ATR fosforila un amplio rango de sustratos en motivos SQ (Matsuoka et al., 2007), en muchos casos relacionados con la regulación del ciclo celular, mediante la fosforilación de la quinasa CHK1 (del inglés *Checkpoint kinase 1*) (Ciccia y Elledge, 2010).

Por último, DNA-PKcs media también la respuesta a las DSBs, pero se encarga de favorecer la reparación del ADN por medio de la maquinaria NHEJ (Jette y Lees-Miller, 2015). Su anclaje a las zonas de lesión está mediada por el complejo Ku70-Ku80 como se comentó anteriormente (Gell y Jackson, 1999; Singleton et al., 1999).

Como se ha expuesto en los epígrafes anteriores PARP-1 interviene en la detección de daños en el DNA e interacciona con proteínas implicadas en la

reparación del daño, participando por tanto en la respuesta al daño en el ADN. Diversos estudios muestran interacciones entre PARP-1 y diversas quinasas de la DDR y en concreto, con ATM. Inicialmente se observó que los embriones de ratón doble mutantes para ATM y PARP-1 (*PARP-1^{-/-} Atm^{-/-}*) muestran letalidad temprana, indicando una acción sinérgica de estas enzimas (Menisser-de Murcia et al., 2001). En este sentido, ATM es activada *in vitro* por el polímero PAR (Goodarzi y Lees-Miller, 2004) y la inhibición de la síntesis del polímero PAR incrementa la sensibilidad a agentes que generan daño en el ADN y al control del ciclo celular (Haince et al., 2007). ATM posee un dominio de unión al polímero PAR, y la interacción entre ambos favorecería la localización de ATM en las zonas de la lesión, cuyo anclaje se vería alterado si la unión de ATM con el polímero PAR se ve modificada (Haince et al., 2007). Además, el polímero PAR co-localiza con la histona H2AX en las zonas de la lesión, histona que es fosforilada por ATM ante daños en el ADN (Haince et al., 2007; Tartier et al., 2003) y PARP-1 co-localiza con ATM con en las zonas dañadas (Aguilar-Quesada et al., 2007). Todos estos resultados sugieren que PARP-1 participa en la respuesta DDR. Recientemente, Li y colaboradores (2018), han mostrado también que la poli-ADP-ribosilación de la histona H1.2, y su posterior desplazamiento de la cromatina, son necesarias para la activación de ATM tras el daño en el ADN.

También se ha propuesto que PARP-1 interviene en la regulación de ATM. Así, la inhibición de PARP-1 estimula la actividad de ATM, debido a que las roturas SSBs no son reparadas correctamente y se transforman en roturas DSBs (Aguilar-Quesada et al., 2007; Bryant y Helleday, 2006), que se intentan reparar por HR (Bryant y Helleday, 2006). Por el contrario, Watanabe y colaboradores (2004), indican que la inhibición de PARP-1 induce un aumento de la actividad de ATM, debido a que PARP-1 regularía de forma negativa la activación de ATM, para evitar una excesiva fosforilación de los sustratos de ATM.

1.4.2. Papel de PARP-1 en los procesos de muerte celular

Los procesos de muerte celular constituyen un evento fundamental junto con la proliferación en el mantenimiento de la homeostasis celular. Dentro de los procesos de muerte celular se consideran (i) eventos fisiológicos controlados por mecanismos celulares, procesos denominados como muerte celular regulada, y (ii) procesos de muerte ocasionados por la exposición a estímulos externos (agentes químicos, físicos, etc.) que generan la muerte de las células en lo que se denomina muerte celular accidental o patológica (Galluzzi et al., 2015; Galluzzi et al., 2018).

Durante décadas los procesos de muerte celular se han clasificado en función de sus características morfológicas en tres procesos principales, a) muerte celular tipo I o apoptosis, b) muerte celular tipo II o autofagia, y c) muerte celular tipo III o necrosis (Schweichel y Merker, 1973). El incremento del conocimiento de muchos de los mecanismos moleculares que intervienen en los distintos tipos de muerte celular ha puesto de manifiesto la limitación de que la clasificación sea únicamente en base a características morfológicas ya que en algunos casos intervienen las mismas moléculas en más de un tipo de muerte. Así, recientemente se ha caracterizado un tipo de muerte celular denominado necroptosis, proceso de muerte regulado morfológicamente semejante a la necrosis y en el que interviene algunos receptores comunes con la apoptosis (Dhuriya y Sharma, 2018). PARP-1 participa en distintos procesos de muerte.

1.4.2.1. Apoptosis

El proceso de apoptosis ha sido ampliamente descrito, y se le ha considerado como el evento de muerte celular programada por excelencia. La apoptosis se caracteriza por una serie de cambios morfológicos tales como la disminución del volumen celular, la condensación de la cromatina (picnosis), la fragmentación celular en cuerpos apoptóticos y el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática durante todo el evento de muerte (Kerr

et al., 1972; Kroemer y Reed, 2000). Los eventos moleculares que producen tales cambios morfológicos se pueden agrupar en dos rutas de señalización: la ruta intrínseca y la ruta extrínseca (ambas ampliamente revisadas en (Galluzzi et al., 2018)). Aunque los eventos iniciales en la señalización de la apoptosis son diferentes en las dos rutas, en ambas, se activan una serie de cisteín-proteasas conocidas como caspasas (Li y Yuan, 2008) de las que hay dos tipos: las caspasas iniciadoras, que producen la activación de otras caspasas, y las caspasa efectoras que hidrolizan numerosos sustratos y producen directamente la muerte celular. En la ruta intrínseca de la apoptosis, el evento fundamental que desencadena la maquinaria necesaria para el reclutamiento y activación de caspasas es la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (Tait y Green, 2010). Esta permeabilización está mediada por proteínas de la familia Bcl2 (del inglés *B-cell lymphoma-2*); en concreto por BAX (del inglés *BCL2 associated X*) y BAK1 (del inglés *BCL2 antagonist/killer 1*) (Gillies y Kuwana, 2014). Esta permeabilización permite la salida de proteínas presentes en el espacio intermembrana tales como el citocromo c y DIABLO (del inglés *diablo IAP-binding mitochondrial protein*) (Galluzzi et al., 2012). La traslocación al citoplasma de estas proteínas induce el ensamble del apoptosoma; un complejo formado por la unión del citocromo c, el factor APAF1 (del inglés *Apoptotic protease activating factor 1*) y la procaspasa 9 (Li et al., 1997). Este complejo media la activación de la caspasa 9, favoreciendo en última instancia la activación proteolítica de las caspasas efectoras 3 y 7 (Julien y Wells, 2017). La acción de la caspasa 3 (principal caspasa efectora) es responsable de la fragmentación del ADN, gracias a la activación de la DNasa CAD (Sakahira et al., 1998), y de la externalización del fosfolípido fosfatidilserina (Segawa et al., 2014), entre otros efectos.

La ruta extrínseca de la apoptosis se ve desencadena por la unión de ligandos a receptores de membrana, como son los receptores de muerte FAS, TNFR1, DR4 y DR5. La activación de esta ruta permite el ensamble del complejo de muerte DISC (del inglés *death-inducing signaling complex*) que media la activación de la caspasa 8. La caspasa 8 puede activar a las

caspasas 3 y 7, o promover la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (Galluzzi et al., 2018).

PARP-1 es uno de los principales sustratos de caspasas efectoras durante la apoptosis. Como se ha comentado en epígrafes anteriores, la presencia de daño en el ADN conlleva a la activación de PARP-1 y la consecuente poli-ADP-ribosilación de sustratos relacionados con la maquinaria de reparación del daño en el ADN. Si el daño generado es leve, PARP-1 mediaría la reparación del daño, lo que se traduciría en supervivencia celular. Sin embargo, ante daños moderados, las caspasas efectoras 3 y 7 proteolizan PARP-1, generando dos fragmentos de 89 y 24 kDa (Ivana Scovassi y Diederich, 2004; Soldani y Scovassi, 2002); el fragmento de 24 kDa (p24) inhibe la actividad catalítica de las unidades de PARP-1 que no hayan sido procesada por las caspasas, con lo que se bloquea la reparación el ADN y se favorece la muerte celular por apoptosis (Ivana Scovassi y Diederich, 2004).

1.4.2.2. Necrosis

Virag y colaboradores, observaron que una hiperactivación de PARP-1 que se producía tras el tratamiento con agentes inductores de ROS, originaba necrosis, sugiriendo que la actividad de PARP-1 está relacionada con este proceso de muerte celular (Virag et al., 1998a; Virag et al., 1998b). Anteriormente, se había visto que el tratamiento con agentes genotóxicos desencadenaba una caída en los niveles intracelulares de NAD^+ y ATP que impedía la realización de funciones celulares dependientes de energía (por ejemplo síntesis de proteínas) y favoreciendo la muerte celular; la caída en los niveles de NAD^+ se relacionó con un incremento en la actividad de PARP-1 consecuencia del daño en el ADN provocado por los genotóxicos empleados, ya que la inhibición de la actividad de PARP-1 evitaba la caída de NAD^+ y de ATP (Berger et al., 1983). PARP-1 se considera una de las principales enzimas catabolizadoras del NAD^+ , sustrato necesario para la síntesis de ATP, siendo capaz de agotar el NAD^+ al 10-20% de los niveles normales (Berger, 1985; Goodwin et al., 1978; Skidmore et al., 1979). Esto hace que célula se vea

obligada a sintetizar continuamente NAD^+ o estimular rutas que restauren sus niveles, produciendo una alteración energética dentro de la célula.

En relación a estas observaciones, diversos estudios han mostrado que una excesiva activación de PARP-1 produce una caída drástica de los niveles de NAD^+ , lo que conlleva una caída drástica en los niveles de ATP y a una alteración del flujo glicolítico, favoreciendo la muerte celular por necrosis; estos efectos se pueden evitar mediante la inhibición o silenciamiento de PARP-1 (Ha y Snyder, 1999; Ying et al., 2002). En base a estas evidencias se considera que la sobreactivación de PARP-1 que se produce ante un daño severo en el ADN, conduciría a una caída de los niveles energéticos celulares y favorece la muerte celular por necrosis; por contra, si el daño en el ADN es leve se produce una cierta activación de PARP-1 que contribuye a la reparación del daño celular; finalmente, un daño moderado del ADN produciría una activación inicial de PARP-1 pero no originaría una depleción energética que impidiese la activación de las caspasas que degradan PARP-1 y finalmente la muerte celular por apoptosis (Andrabi et al., 2008; Elkholi y Chipuk, 2014; Jubin et al., 2016) (Figura 8).

El proceso de muerte celular por necrosis, desde sus primeras descripciones (Kerr et al., 1972), se ha considerado un proceso violento caracterizado por un incremento del volumen celular y la rotura de la membrana plasmática, con la consiguiente liberación del contenido celular al medio circundante. No obstante, diversas evidencias ponen de manifiesto que no siempre se trata de un proceso accidental, y que estaría mediado en ciertas situaciones por la activación de receptores de muerte tales como TNFR1 y FAS, receptores de reconocimiento de patógenos como TLR3, y la proteína ZBP1 (del inglés *Z-DNA binding protein 1*) (Kaiser et al., 2013; Laster et al., 1988; Upton et al., 2012; Vercammen et al., 1998; Vercammen et al., 1997); considerándose actualmente como un proceso regulado, denominado necroptosis. Tras la estimulación del receptor TNFR1 se produce el ensamblaje de un complejo proteico denominado necrosoma, formado por las quinasas RIP1 y RIP3 (del inglés *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*

and 3, respectivamente), que mediaría la necrosis regulada (Galluzzi et al., 2014).

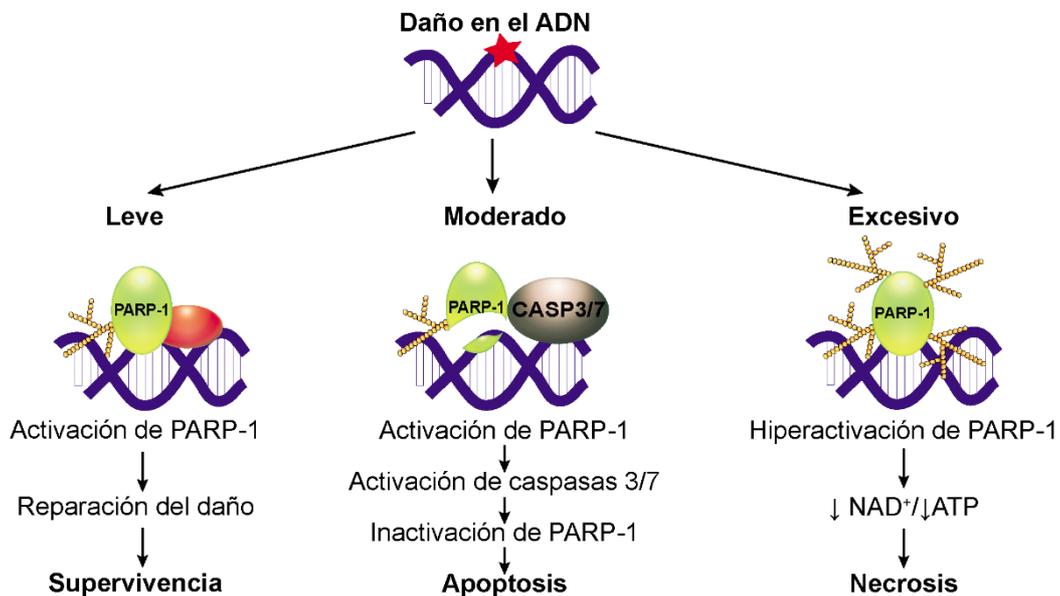


Figura 8. PARP-1 y muerte celular. Tras la generación de daño en el ADN se produce la activación de la enzima PARP-1. Si el daño generado es leve, la activación de PARP-1 permite el reclutamiento de proteínas implicadas en la reparación del ADN, favoreciéndose la supervivencia celular. Si el daño generado es moderado, se produce la activación de las caspasas ejecutoras 3 y 7 que llevan a cabo la escisión proteolítica de PARP-1, impidiendo la reparación del daño y promoviendo la muerte celular por apoptosis. Ante un daño excesivo en el ADN se produce una activación excesiva de la enzima PARP-1, resultando en un consumo excesivo de NAD^+ , lo que ocasiona una caída en los niveles energéticos de la célula, que muere finalmente por necrosis.

PARP-1 también puede favorecer el desarrollo de la necrosis regulada. Xu y colaboradores (2006) han mostrado el papel de PARP-1 en la muerte celular por necrosis, en la que estaría involucrada la quinasa RIP1, así como el receptor TNFR2 (del inglés *tumor necrosis factor receptor [TNFR]-associated factor 2*), donde se conduciría a la activación de la quinasa de Jun (JNK) y a una disfunción mitocondrial.

1.4.2.3. Autofagia

En el proceso de macroautofagia, denominada comúnmente autofagia, los componentes citoplásmicos de la célula son englobados en autofagosomas y degradados por los lisosomas mediante la formación de autolisosomas (Klionsky, 2005; Levine y Klionsky, 2004). Se considera como un mecanismo de adaptación a condiciones de estrés (por ejemplo de privación de nutrientes), aunque también posee funciones relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis (Klionsky, 2005; Yonekawa y Thorburn, 2013). En la mayoría de los casos conocidos la autofagia parece tener un papel protector, pero se ha visto que también podría desencadenar la muerte celular (Galluzzi et al., 2012). El Comité de Nomenclatura Sobre Muerte Celular, NCCD (del inglés *Nomenclature Committee of Cell Death*), define la muerte celular por autofagia como un evento de muerte celular que ocurre sin condensación de la cromatina, y caracterizado por la vacuolización intensa del citoplasma por vesículas de doble membrana o autofagosomas (Galluzzi et al., 2012).

El proceso de autofagia está coordinado por dos quinasas, la serín/treonín quinasa ULK1 (del inglés *unc-51-like autophagy-activating kinase 1*, conocida también como ATG1, del inglés *autophagy-related-1*) y la quinasa VSP34 (del inglés *vacuolar protein sorting-34*) (Itakura y Mizushima, 2010; Russell et al., 2013). La activación secuencial por fosforilación de ULK1 y VPS34 conlleva al reclutamiento adicional de proteínas de la familia ATG para la formación y maduración del autofagosoma (Itakura y Mizushima, 2010; Russell et al., 2013).

En la regulación de la autofagia participan dos quinasas centrales: AMPK (del inglés *AMP-activated protein kinase*) y mTOR (del inglés *mammalian target of rapamycin*). AMPK es considerada el principal sensor energético en las células eucarióticas, y se activa ante situaciones de estrés en las que hay un déficit de producción celular de ATP (caracterizadas por un valor alto de la proporción AMP: ATP en la célula) (Hardie et al., 2003; Kemp et al., 2003). AMPK activada intenta restaurar el balance energético celular inhibiendo los procesos anabólicos que conlleven consumo de ATP (como la

síntesis de lípidos, de carbohidratos y de proteínas), y promoviendo procesos catabólicos que generen ATP (Hardie et al., 2003; Kemp et al., 2003). En situaciones restrictivas de energía, AMPK induce el proceso de autofagia mediante la fosforilación y activación de componentes de la ruta de autofagia (Egan et al., 2011; Kim et al., 2011).

mTOR es una serín/treonín quinasa que forma parte de dos complejos, el complejo mTOR 1 y 2 (mTORC1 y mTORC2, respectivamente), y es capaz de verse activado en presencia de nutrientes (por ejemplo en presencia de glucosa o aminoácidos) o por señales de crecimiento, activando rutas biosintéticas y promoviendo el crecimiento celular (Hay y Sonenberg, 2004). mTORC1 puede inhibir el proceso de autofagia mediante dos mecanismos, a) mediante la fosforilación de la quinasa ULK1 y de la proteína ATG13 (Ganley et al., 2009; Jung et al., 2009; Kim et al., 2011), y b) mediante la desestabilización de ULK1 por medio de la fosforilación de regulador de autofagia AMBRA1 (del inglés *Autophagy/Beclin-1 regulator 1*) (Nazio et al., 2013). En definitiva, AMPK y mTOR tienen efectos contrarios en la regulación de la autofagia. Asimismo, AMPK inhibe el complejo mTORC1 mediante dos mecanismos: a) mediante la fosforilación y activación del regulador negativo de mTORC1, TSC2 (del inglés *tuberous sclerosis complex 2*) (Inoki et al., 2003), y b) mediante la fosforilación e inhibición de la subunidad Raptor (del inglés *regulatory-associated protein of mTOR*) (Gwinn et al., 2008).

Los niveles de activación de PARP-1 podrían ser clave para determinar si se produce autofagia o necrosis. Muñoz-Gámez y colaboradores (2009) muestran que el tratamiento con doxorubicina ocasiona una hiperactivación de PARP-1 y la consiguiente disminución de los niveles de ATP, la caída de los niveles energéticos produce la activación de AMPK que a su vez promueve el fenómeno de autofagia. Por otra parte, la ausencia de la actividad de PARP-1, retrasa el fenómeno de autofagia e incrementa la muerte celular tras el tratamiento con doxorubicina, lo que indica que la autofagia precisa de la actividad de PARP-1 y que tiene un papel protector en condiciones de daño del ADN. En este sentido, se cree que la presencia de actividad PARP-1 es clave

para promover la supervivencia de las células tumorales que presentan daño en su ADN.

En condiciones de privación de nutrientes también se activa AMPK y se estimula el proceso de autofagia (Rodríguez-Vargas et al., 2012). Esto a su vez genera la aparición de ROS que dañan el ADN y activan a PARP-1, lo que ocasiona una caída en los niveles de ATP; como la disminución de ATP produce la activación de AMPK esta se incrementa aún más y se favorece el mantenimiento de la autofagia; si esta señal se mantiene de forma prolongada se produce la muerte celular por autofagia. En ausencia de actividad de PARP-1, no hay retroalimentación de AMPK, y disminuyen los procesos de autofagia y las células mueren por apoptosis (Rodríguez-Vargas et al., 2012).

1.4.2.4. Parthanatos

Andrabi y colaboradores observaron que la administración del polímero sintético de PAR en neuronas corticales tenía graves consecuencias para la viabilidad celular, mientras que su degradación prevenía los efectos tóxicos (Andrabi et al., 2006). Esta evidencia puso de manifiesto que el polímero PAR podría actuar como señal de muerte celular, e iniciar aparentemente una ruta de muerte celular. En relación a esta hipótesis, unos años antes, Yu y colaboradores (2002) mostraron que la activación de PARP-1 induce un proceso de muerte celular independiente de caspasas caracterizado por la traslocación al núcleo de la flavoproteína AIF (del inglés *Apoptosis Inducing Factor*). Sin embargo, el bloqueo de la actividad de PARP-1 evitaba la traslocación de AIF y la muerte celular (Yu et al., 2002). Años más tarde este mismo grupo de investigación puso de manifiesto que el polímero PAR es el responsable de la traslocación del factor AIF desde la mitocondria hacia el núcleo celular (Yu et al., 2006). La administración de polímero PAR a mitocondrias aisladas desencadena la liberación del factor AIF, indicando que PAR media la liberación de este factor (Yu et al., 2006). Además este grupo muestra que tras el tratamiento con agentes que producen daños en el ADN se genera una acumulación del polímero PAR en el núcleo a los 15 minutos del

tratamiento, mientras que a tiempos posteriores se observa en fracciones citoplasmáticas y mitocondriales, apoyando la hipótesis de que el polímero PAR podría interaccionar con AIF en la mitocondria e inducir su traslocación al núcleo (Yu et al., 2006) (Figura 9). Estudios posteriores han mostrado que la proteína AIF posee una alta afinidad por el polímero PAR, llegando a presentar tres dominios de unión a PAR (Gagne et al., 2008), de tal forma que mutaciones en residuos dentro de estos dominios alteran la capacidad de unión entre el polímero PAR y el factor AIF (Wang et al., 2011).

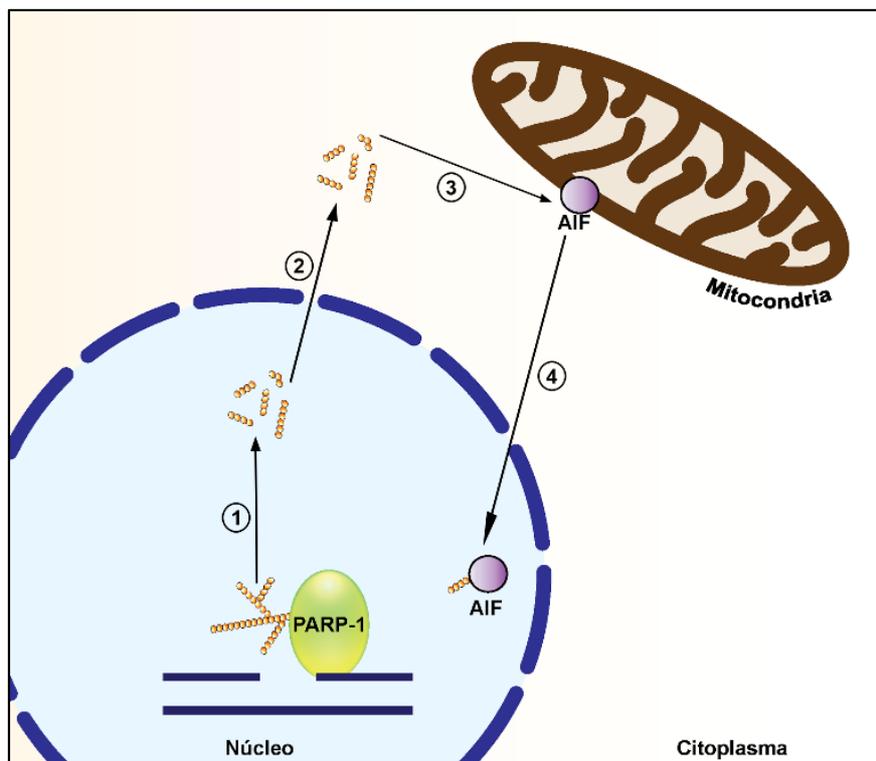


Figura 9. Muerte celular mediada por PARP-1, Parthanatos. 1. La generación de daño en el ADN conlleva la activación de PARP-1. La activación de PARP-1 permite la poli-ADP-ribosilación de diversos aceptores nucleares, así como la generación de polímero PAR libre. 2. Este polímero PAR libre puede traslocarse desde el núcleo a la mitocondria donde puede interaccionar con el factor AIF. 3. La interacción del polímero PAR con AIF induce la traslocación de AIF al núcleo celular, donde desencadenaría la fragmentación del ADN y la muerte celular.

Dada la relación observada entre ambas proteínas y el papel de PARP-1 en mediar este tipo de muerte celular, el Comité de Nomenclatura Sobre Muerte Celular, NCCD, reconoció en el año 2012 como un nuevo tipo de

muerte celular a la muerte celular mediada por el polímero PAR que fue denominada como *Parthanatos* (Galluzzi et al., 2012). Esta muerte presenta características comunes al proceso de muerte celular por apoptosis, tales como la externalización del lípido fosfatidilserina, la disipación del potencial de membrana, la condensación de la cromatina y la disminución del tamaño celular. No obstante, a diferencia de la apoptosis presenta pérdida de la integridad de la membrana, fragmentación del ADN en fragmentos de gran tamaño (mayores de 50 kb) y no requiere activación de caspasas (Fatokun et al., 2014).

A pesar de que los estudios comentados anteriormente ponen de manifiesto el papel del polímero PAR en la liberación y traslocación del factor AIF e inducción de la muerte celular, queda por esclarecer el mecanismo exacto por el cual AIF es capaz de producir muerte celular. AIF es una flavoproteína mitocondrial que participa en la regulación y biogénesis de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Hangen et al., 2015), y que puede promover muerte celular, con condensación de la cromatina y fragmentación del ADN (en fragmentos de gran tamaño, mayores de 50 kb), independiente de caspasas cuando se trasloca al núcleo (Susin et al., 1999). No se ha descrito actividad nucleasa de AIF que justifique la degradación del ADN tras la traslocación al núcleo celular (Fatokun et al., 2014), por lo que se ha propuesto que AIF debe cooperar (o activar) en el núcleo con alguna enzima que sí posea esta actividad. Así, se ha propuesto que AIF puede activar a la Endonucleasa G para promover la degradación del ADN (Wang et al., 2002), aunque esta enzima no parece ser crucial para el desarrollo de la muerte celular en mamíferos (David et al., 2006; Irvine et al., 2005). Recientemente, se ha identificado al factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF, del inglés *Macrophage Migration Inhibitory Factor*) como una nucleasa cooperadora con AIF en la muerte mediada por el polímero PAR, ya que la eliminación de MIF o la alteración de la unión AIF-MIF evita la degradación del ADN (Wang et al., 2016). Sin embargo, el causante de la actividad nucleasa no está plenamente identificado, como muestra una revisión reciente del grupo de Valina Dawson

que describe la intervención de una nucleasa genérica que denomina PAAN (del inglés *Parthanatos-dependent AIF-associated nuclease*) (Fan et al., 2017).

Diversos estudios han mostrado que la muerte celular por *Parthanatos* tendría un papel relevante en la muerte de neuronas tras la exposición a agentes genotóxicos o a situaciones de estrés oxidativo (Alano et al., 2010; Mandir et al., 2000). Estas situaciones se observan en modelos de enfermedades neurodegenerativas tales como Parkinson e isquemia cerebral (Culmsee et al., 2005; Li et al., 2010; Wang et al., 2003).

1.4.3. Transcripción génica

Observaciones realizadas en los años 80 indicaron que el enzima PARP-1 podría incrementar la especificidad de la transcripción génica mediada por la enzima ARN polimerasa II (Slattery et al., 1983). Posteriormente se reveló que PARP-1 es un estimulador de la transcripción mediada por la ARN polimerasa II (Meisterernst et al., 1997).

La función de PARP-1 en el proceso de transcripción parece ser, fundamentalmente, la de modificar o alterar la disposición de los nucleosomas, mediante la poli-ADP-ribosilación de las histonas que los componen, facilitando los procesos de transcripción. Así, Poirier y colaboradores (1982) mostraron por primera vez que la histona H1 era susceptible de ser modificada por PARP-1, de forma que se alteraba el estado de la cromatina. A partir de observaciones realizadas en *Drosophila*, se ha propuesto que el enzima PARP-1 inactivo se encuentra asociado a los nucleosomas y a otras proteínas que forman parte de la cromatina; tras su activación, PARP-1 poli-ADP-ribosila a proteínas asociadas a la cromatina, produciendo la relajación de la cromatina y permitiendo el acceso de la maquinaria de transcripción; cuando cesa la señal activadora de PARP-1, el enzima PARG elimina el polímero PAR de las proteínas cromatínicas y la cromatina vuelve a adoptar una organización condensada (Tulin y Spradling, 2003) (Figura 10). Un fenómeno semejante, el control del estado de relajación de la cromatina por la acción de PARP-1,

parece ocurrir para la regulación de la transcripción de los genes de las citoquinas inflamatorias IL-1 β y TNF en células microgliales estimuladas con lipopolisacárido (Martinez-Zamudio y Ha, 2014).

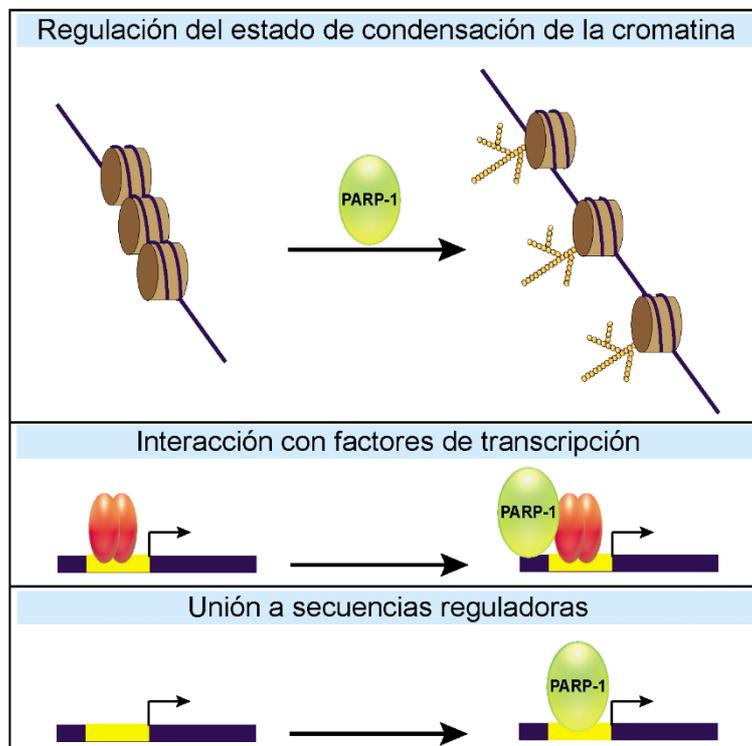


Figura 10. Papel de PARP-1 en el control de la transcripción génica. PARP-1 puede controlar el proceso de transcripción génica por medio de tres mecanismos: mediante cambios en la organización de la cromatina, gracias a la modificación de histonas; mediante la interacción con factores de transcripción, bien promoviendo o reprimiendo su actividad, o mediante la unión a secuencias reguladoras en los promotores.

PARP-1 también puede regular la transcripción mediante otros mecanismos (Kraus y Lis, 2003). En primer lugar, PARP-1 puede interactuar directamente, en algunos casos sin que se precise su actividad enzimática, con factores de transcripción (Figura 10). Por ejemplo, en el caso del factor de transcripción NF- κ B: PARP-1 forma un complejo nuclear con NF- κ B sin necesidad de la actividad enzimática de PARP-1, promoviendo la transcripción de genes dependientes de NF- κ B (Hassa et al., 2001; Hassa y Hottiger, 2002). En otros casos, por el contrario, sí es necesaria la actividad enzimática de PARP-1 para su actividad co-reguladora, como sucede en el caso de la regulación del factor de transcripción p53 por PARP-1. En este caso, PARP-1

cataliza la poli-ADP-ribosilación de p53, lo que impide que este factor interactúe con la exportina Crm1, y hace que se acumule en el núcleo, donde ejerce su actividad como factor de transcripción; si no hay poli-ADP-ribosilación de p53 este es exportado al citoplasma y no actúa como factor de transcripción (Kanai et al., 2007).

Finalmente, el efecto de PARP-1 se debe en ocasiones a que PARP-1 se une a secuencias reguladoras presentes en las regiones promotoras de los genes que codifican factores de transcripción (Figura 10). Tal es el caso de la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX2), responsable de la síntesis de prostaglandinas. PARP-1 es capaz de unirse a un elemento inhibidor localizado entre los nucleótidos -655/-632 de la región promotora de COX2 en ratones, resultando en una menor expresión de la COX2 (Lin et al., 2011).

1.4.4. División celular

Diversos estudios muestran que PARP-1 podría participar en el control del ciclo celular y de la división celular. Se ha observado que PARP-1 interactúa con proteínas constitutivas del cinetocoro tales como CENP-A y CENP-B, y con proteínas facultativas del control del huso mitótico durante la mitosis (Earle et al., 2000; Saxena et al., 2002a; Saxena et al., 2002b). Asimismo, PARP-1 regula la función del centrosoma, ya que se ha visto que puede poli-ADP-ribosilar proteínas del centrosoma y su inhibición o ausencia causa un incremento en la cantidad de centrosomas (Kanai et al., 2003), y aneuploidías cromosómicas (Tong et al., 2007).

1.4.5. Inflamación

La inflamación es un proceso biológico que se encarga de eliminar estímulos dañinos (como patógenos, células dañadas, compuestos tóxicos o irradiación), e inicia el proceso de recuperación de la zona dañada. La inflamación se caracteriza por el enrojecimiento, hinchazón, calor, dolor y

pérdida de la función tisular, como resultado de las respuestas de las células inmunes, vasculares e inflamatorias locales a la infección o lesión (Chen et al., 2018). En muchos casos se consigue eliminar el estímulo desencadenante con el mínimo de lesiones y la respuesta inflamatoria es limitada en el tiempo (respuesta inflamatoria aguda); pero otras veces el estímulo desencadenante no desaparece o produce lesiones permanentes y la respuesta inflamatoria se prolonga en el tiempo (respuesta inflamatoria crónica) pudiendo desarrollarse enfermedades crónicas (Chen et al., 2018).

Algunos componentes de la reacción inflamatoria actúan como detectores de la lesión (por ejemplo, la infección por bacterias es detectada por receptores de la inmunidad innata TLR, del inglés *Toll-like receptors*). Otros componentes son mediadores inflamatorios que actúan en la zona de la lesión y provocan directamente la reacción inflamatoria (Medzhitov, 2010). Estos mediadores inflamatorios comprenden pequeñas moléculas, como las citoquinas inflamatorias (por ejemplo, IL-1, TNF o IFN- γ), las quimiocinas, o la activación de diversas enzimas (como la óxido nítrico sintasa inducible, iNOS; COX2, NADPH oxidasa, etc.) (Chen et al., 2018).

Durante la respuesta inflamatoria PARP-1 interviene controlando la transcripción génica, y regulando, por tanto, la expresión de citoquinas y otros mediadores inflamatorios. Ya se ha descrito que PARP-1 promueve la transcripción de citoquinas inflamatorias por medio de NF- κ B. Por el contrario, la ausencia de PARP-1, reduce la expresión de citoquinas inflamatorias y disminuye el proceso inflamatorio (Altmeyer et al., 2010). De hecho, ratones deficientes en PARP-1 son resistentes al shock endotóxico inducido por lipopolisacárido (LPS) (Oliver et al., 1999). Además, PARP-1 interviene en la modulación de la actividad del factor de transcripción AP-1 (del inglés *Activating Protein 1*) que también regula la expresión de mediadores inflamatorios; la inhibición o bloqueo de la expresión de PARP-1 reduce la actividad de JNK, una quinasa que regula AP-1, y la capacidad de AP-1 para unirse al ADN (Andreone et al., 2003).

Dado que PARP-1 es capaz de modular la respuesta inflamatoria se ha propuesto que PARP-1 pueda ser una diana terapéutica adecuada para producir efectos beneficiosos en situaciones inflamatorias. Así, la inhibición o bloqueo de PARP-1 produce efectos beneficiosos en modelos murinos de enfermedades crónicas cardiovasculares con un componente inflamatorio significativo (Bai y Virag, 2012). Incluso PARP-1 parece contribuir en los procesos inflamatorios que ocurren en el SNC, precisamente a través de la regulación de la expresión génica en células gliales, ya que la estimulación con lipopolisacárido de células gliales procedentes de ratones deficientes en PARP-1 muestran una marcada reducción en la expresión de citoquinas como IL-1 β , IL-6 y TNF (Ha et al., 2002; Nakajima et al., 2004).

1.5. Inhibidores de PARP-1

El papel de PARP-1 en respuesta a los agentes genotóxicos y su implicación en los diferentes procesos celulares descritos, ha permitido a lo largo de la historia el desarrollo de inhibidores para el bloqueo de su actividad, usados como herramienta para el estudio de la función de PARP-1, y como potenciales agentes terapéuticos.

Durante los primeros años de estudio de la enzima PARP-1 se observó que la nicotinamida generada durante la síntesis de las unidades de ADP-ribosa mostraba cierta capacidad inhibitoria sobre la actividad de PARP-1 (Clark et al., 1971). Estas observaciones dieron lugar al desarrollo de la primera generación de inhibidores, basados en la nicotinamida, donde el nitrógeno de la posición 3 del heterociclo era sustituido por un átomo de carbono u otras sustituciones, dando lugar a la benzamidas y derivados de estas (Purnell y Whish, 1980) (Figura 11). Las moléculas obtenidas, en particular la 3-aminobenzamida (3-AB), inhibían la actividad de PARP-1 y producían efectos citotóxicos en las células tumorales tratadas con agentes genotóxicos (Durkacz et al., 1980) (Figura 11). Estos primeros inhibidores mostraban una baja capacidad de inhibición, por lo que era necesario emplear concentraciones altas de inhibidor, concentraciones milimolares, para conseguir una inhibición

apreciable en cultivos celulares; además presentaban cierta inespecificidad que se reflejaba en que producían descenso en la viabilidad celular, y alteraciones del metabolismo de la glucosa y de la síntesis de ADN (Milam y Cleaver, 1984). Todo esto impedía que fuesen utilizadas *in vivo*.

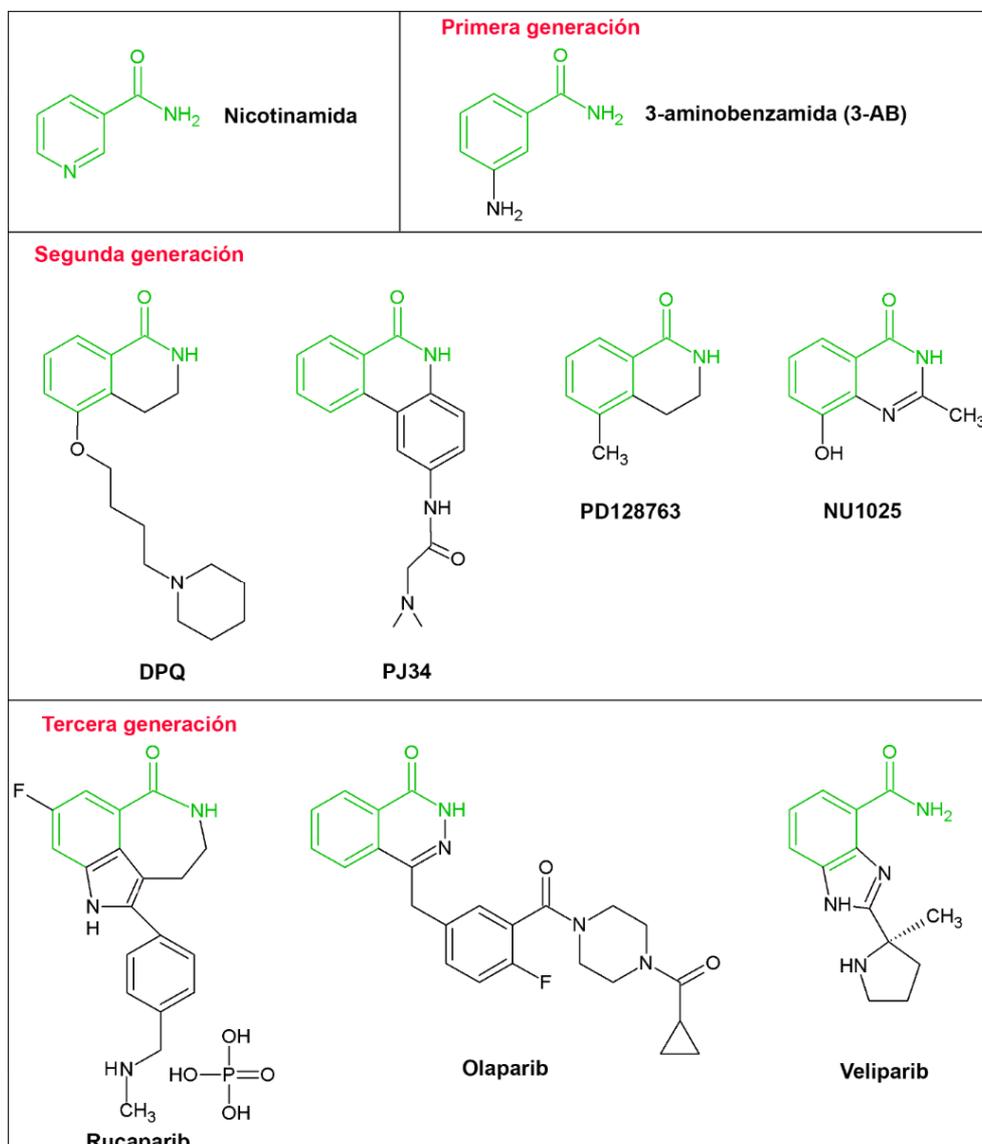


Figura 11. Diferentes generaciones de inhibidores de PARP-1. Estructura de la nicotinamida, usada como base para el desarrollo de inhibidores de PARP-1 e inhibidores de PARP-1 representativos de cada generación. Se resalta en color verde el grupo farmacóforo de la nicotinamida en cada uno de los inhibidores. Las estructuras químicas de los inhibidores se han representado con la herramienta ACD/ChemSketch Freeware, versión 11.02, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, On, Canada, www.acdlabs.com, 2019.

Ya en los años 90, Banasik y colaboradores (1992) analizaron la capacidad inhibitoria frente a PARP-1 de 170 compuestos; durante este estudio se identificaron varios compuestos con potente actividad inhibitoria, entre los que destacan derivados de las quinazolinonas como las isoquinolinonas, las fenantridionas y las naftalimidonas (segunda generación de inhibidores). Algunos de estos compuestos identificados se usaron como base para el desarrollo de inhibidores de PARP-1 más potentes, como es el caso de las fenantridionas. Un ejemplo de ello es el desarrollo del inhibidor N-(6-oxo-5,6-dihidrofenantridin-2-il)-2-(N,N-dimetilamino)acetamida, denominado PJ34, a partir de la fenantridiona, con una IC_{50} de 20 nM (Jagtap et al., 2002) (Figura 11). Este nuevo inhibidor era capaz de reducir la necrosis inducida por peroxinitrito en timocitos murinos (Jagtap et al., 2002) y protegía a las neuronas sometidas a privación de glucosa y oxígeno (Abdelkarim et al., 2001). La administración *in vivo* de este inhibidor mejora la respuesta en accidentes cerebrovasculares, infarto de miocardio, shock circulatorio, insuficiencia cardíaca y diabetes (Jagtap y Szabo, 2005). Finalmente también reduce la supervivencia de algunos tipos de células tumorales potenciando la acción de agentes antitumorales como el cisplatino (Huang et al., 2008; Michels et al., 2013). Otros inhibidores de esta generación son el DPQ (3,4-dihidro-5-[4-(1-piperidinil)butoxil]-1(2H)-isoquinolinona), el PD128763 (3,4-dihidro-5-metil-1-[2H]-isoquinolinona) y el NU1025 (8-hidroxi-2-metilquinazolina-4-[3H]-ona) (Arundel-Suto et al., 1991; Griffin et al., 1995; Suto et al., 1991) (Figura 11).

Estudios cristalográficos de los inhibidores de segunda generación permitieron obtener datos importantes en relación a la estructura molecular necesaria para incrementar la interacción de los inhibidores con PARP-1 y desarrollar inhibidores más efectivos, inhibidores de tercera generación (Canan Koch et al., 2002; Ruf et al., 1998; Skalitzky et al., 2003) (Figura 11). En la tercera generación, encontramos compuestos como Rucaparib (Thomas et al., 2007), con una constante de inhibición en el rango nanomolar (K_i : 1.4 nM). En la actualidad los inhibidores de tercera generación (por ejemplo, Rucaparib, Iniparib, Olaparib, Veliparib, Niraparib, Talazoparib, CEP-9722 y E7016) se están utilizando o están propuestos para el tratamiento de tumores en

combinación con quimioterapia o radiación (Martin-Guerrero et al., 2017a; Tangutoori et al., 2015). Recientemente, se ha demostrado que estos inhibidores causan la muerte de células tumorales por el secuestro de PARP-1 y PARP-2 en la zona de la lesión del ADN (fenómeno denominado en inglés *trapping*), impidiendo la reparación del daño, la replicación y la transcripción, lo que desencadena la activación de rutas de muerte celular (Shen et al., 2015).

La agencia americana del medicamento (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) y la Agencia Europea del Medicamento autorizaron en 2014, 2016 y 2018 el uso de los inhibidores Olaparib y Rucaparib para el tratamiento de diversos cánceres de ovario y próstata (datos obtenidos de www.fda.gov y de la Agencia Europea del Medicamento).

2. OBJETIVOS

Elevadas concentraciones intracelulares de ROS originadas de manera endógena o debido a una exposición a agentes exógenos pueden provocar en la célula una situación de estrés oxidativo, con efectos perjudiciales para la célula. Uno de los posibles efectos negativos de esta situación es la generación de daños en el ADN. Si este no es reparado, o el nivel de daño es excesivo, se puede generar inestabilidad genómica que puede inducir la muerte de la célula. Si esta situación se extiende al resto de células de un tejido u órgano puede dar lugar al desarrollo y progresión de ciertas patologías. Por tanto, el conocer los mecanismos implicados en la respuesta celular inducida por dicho estrés es de vital importancia para la identificación de futuras dianas terapéuticas que puedan contrarrestar la progresión de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

PARP-1, como se ha descrito anteriormente, es una enzima implicada en la respuesta celular tras daños en el ADN, implicada en el reclutamiento y activación de la maquinaria necesaria para la reparación del daño, promoviendo la reparación del daño inducido. Sin embargo, una activación excesiva de PARP-1 puede conducir a la muerte de la célula. Por todo ello, es importante comprender el papel de la enzima PARP-1 en cada contexto celular, ya que las consecuencias de su activación pueden ser diferentes dependiendo del tipo celular y del estímulo que desencadene su activación.

Aunque todos los tipos celulares que componen los diferentes tejidos y órganos corren el riesgo de padecer situaciones de estrés oxidativo, existen órganos que debido a su función están expuestos de forma rutinaria a diversas fuentes de ROS. Tal es el caso de la retina y el hígado, que debido al procesamiento de la luz o a la detoxificación de diversos compuestos, se encuentran expuestos a fuentes de ROS. Por ello es importante que los mecanismos encargados de contrarrestar los altos niveles de ROS, o en reparar los daños inducidos por estas, funcionen correctamente. Sin embargo, en determinadas circunstancias las ROS no son neutralizadas e inducen una situación de estrés oxidativo. Por ello, una mayor comprensión de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de patologías en la retina e hígado, relacionadas con la presencia de altos niveles de ROS, es de crucial

Objetivos

importancia para la identificación de nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento de estas patologías.

Dado que PARP-1 es una enzima importante en la reparación del daño en el ADN inducido por ROS, y debido a que la retina e hígado son dos órganos susceptibles de padecer daño oxidativo, en la presente Tesis doctoral se ha estudiado las consecuencias de la activación de PARP-1 ante situaciones de estrés oxidativo en ambos modelos.

Para realizar este estudio se han establecido los siguientes objetivos:

Primero. Evaluar el papel de la activación de PARP-1 durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón, y correlacionar dicha activación con la presencia de marcadores de daños oxidativos, especialmente en el ADN.

Segundo. Determinar la importancia de PARP-1 en un modelo de estrés oxidativo inducido en la retina de ratón, mediante el tratamiento de cultivos organotípicos o de una línea celular de retina de ratón con un agente inductor de estrés oxidativo. Analizar el papel de los inhibidores de PARP-1 en la respuesta celular y molecular inducida por dicho estrés.

Tercero. Evaluar la relevancia de PARP-1 en un modelo de estrés oxidativo inducido en hepatocitos humanos, mediante el tratamiento de la línea celular WRL68 con un agente inductor de estrés oxidativo, y estudiar el papel de los inhibidores de PARP-1 o de su silenciamiento en la respuesta celular y molecular inducida por dicho estrés.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Animales

En el presente estudio se han utilizado retinas procedentes de ratones *Mus musculus* de la cepa C57BL/6, suministrados por el Servicio de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Granada. Las retinas utilizadas provenían de animales postnatales de 0, 3, 7, 10, 12, 14, 21 y 28 días de edad (P0, P3, P7, P10, P12, P14, P21 y P28, respectivamente) y de animales adultos de 60 días de edad (P60). Los animales postnatales hasta P14 fueron sacrificados por decapitación, mientras que los animales posnatales P21 y P28, así como los adultos P60 fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Todos los animales fueron mantenidos con un ciclo de luz/oscuridad de 12h y acceso *ad libitum* a la comida y el agua.

La manipulación y realización de procedimientos experimentales con los animales fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de Granada (ref. permiso: 2011-357; ref. permiso: 26/04/2018/058), siguiendo las directrices de la Directiva de la Unión Europea 2010/63/EU y la normativa legal española sobre protección de animales utilizados para fines científicos.

3.2. Aislamiento y cultivo organotípico de retina

Posteriormente a la muerte del animal, los ojos se enuclearon y se llevaron a placas estériles de 35 mm de diámetro en tampón fosfato salino (PBS) o en solución salina de Gey's enfriada (en este caso si la retina era destinada para su cultivo) para la realizar la disección del globo ocular. La disección se realizó bajo una lupa binocular (Nikon), utilizando pinzas Dumont nº 5 y microtijeras Pascheff-Wolff de hoja de 6 mm. Todos los procedimientos se realizaron en frío para evitar la degradación de los tejidos.

Tras la enucleación del ojo, el nervio óptico fue seccionado. A continuación, se cortó el límite entre la esclera y la córnea, eliminándose la córnea por completo (Figura 12). Seguidamente, se eliminaron el cristalino y la

esclera, dejando la retina al descubierto, de color blanquecino y aspecto gelatinoso (Figura 12). Finalmente, se eliminaron los restos de la vasculatura hialoidea que pudieran quedar adheridos a la retina, completando así el aislamiento de la retina (Figura 12).

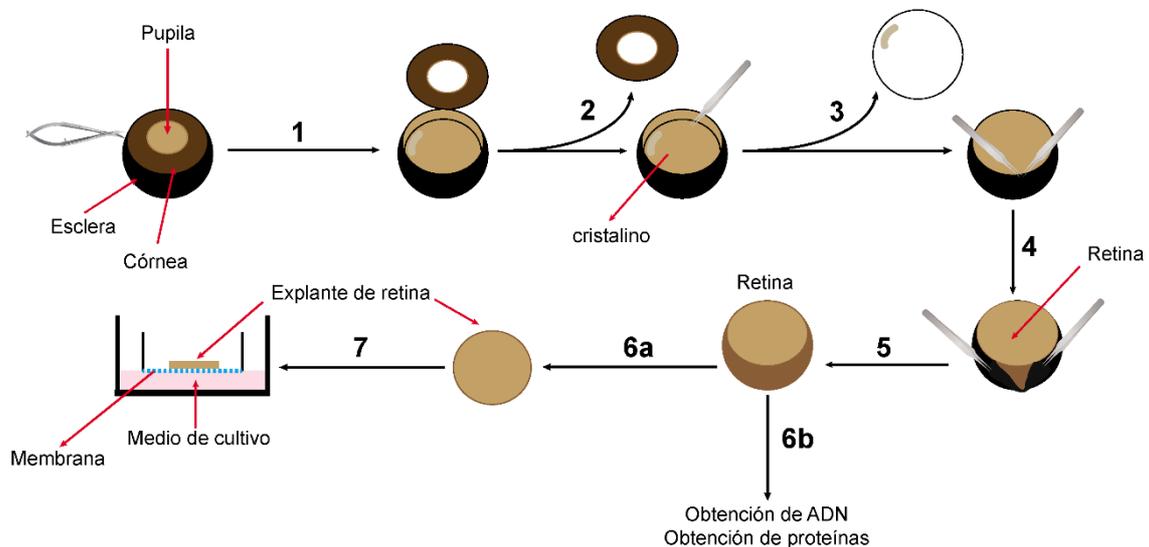


Figura 12. Aislamiento y cultivo *in vitro* de retina de ratón. El ojo, aislado en PBS frío o en solución salina de Gey's enfriada (en este último caso, si la retina era destinada para su cultivo), se diseccionó realizando un corte entre el límite de la esclera y la córnea (1); se eliminó la córnea y el cristalino (2, 3) así como la esclera, el epitelio pigmentario y la vasculatura hialoidea (4, 5); obteniéndose finalmente la retina aislada. Para la obtención de proteínas o de ADN, la retina aislada se procesó de acuerdo al protocolo correspondiente (6b). En el caso del cultivo organotípico de explantes de retina, tras aislar la retina, se cortó la región periférica de la retina, para poder obtener discos de la región central de un diámetro aproximado de 3 mm (explantes de retina, 6a). Finalmente, los explantes de retina se situaron sobre una membrana semipermeable con la cara vítrea en contacto con la membrana, y se dispusieron en pocillos con medio de cultivo, estando en contacto la membrana con el medio de cultivo.

Para el cultivo organotípico de retina se usaron animales P12 y el aislamiento de la retina se realizó tal y como se ha descrito anteriormente, usando como medio de disección solución salina Gey's (*Gey's Balanced Salt Solution*, Sigma, ref. G9779) suplementada con 5 mg/ml de glucosa (Sigma, ref. G8769) y 50 UI- μ g/ml de penicilina-estreptomicina (Gibco; ref. 15070-063) (Figura 12). Una vez aislada la retina, se realizaron cortes para eliminar la parte periférica de la retina, obteniéndose discos centrales de retina (explantes de

retina) de aproximadamente 3 mm de diámetro. Una vez obtenidos los explantes de retina, estos fueron cultivados siguiendo el método descrito por Stoppini y colaboradores (1991) con algunas modificaciones (Marin-Teva et al., 2004). Los explantes de retina obtenidos, se colocaron con la cara vítrea hacia abajo sobre una membrana semipermeable (0.4 μm de tamaño de poro) asociada a un dispositivo *Millicell* de 30 mm de diámetro (Millipore, ref. PICM03050). El dispositivo *Millicell* fue a su vez colocado en un pocillo de una placa de 6 pocillos, conteniendo dicho pocillo 1 ml del medio de cultivo; de tal forma que cada explante de retina estaba en contacto con el medio de cultivo por su parte vítrea y con el aire por la parte escleral (Figura 12). El medio de cultivo estaba compuesto por un 50% de medio basal *Eagle* con sales *Earle* (BME, *Basal Medium with Earle's salts*, Gibco, ref. 41010-026), 25% de solución salina Hanks (HBSS, *Hank's Balanced Salt Solution*, Gibco, ref. 14180-046), 25% de suero de caballo inactivado (Gibco, ref. 16050-122), 5 mg/ml de glucosa (Sigma, ref. G8769), 1 mM de L-Glutamina (Gibco, ref. 25030-024) y 10 UI- $\mu\text{g/ml}$ de penicilina-estreptomicina (Gibco, ref. 15070-063). Los explantes de retina fueron mantenidos en un incubador de CO_2 (Galaxy S, Cultek) a 37°C en una atmósfera saturada de humedad y 5% de CO_2 por un periodo mínimo de 4 horas previo a los tratamientos correspondientes y un periodo máximo de 2 días de cultivo *in vitro* desde su obtención.

3.3. Cultivos celulares

La línea celular retiniana 661W, cedida por el Dr. Muayyad Al-Ubaidi (University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, OK), y la línea celular hepática fetal humana WRL68, obtenida de la compañía ATCC (del inglés *American Type Culture Collection*), se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma, ref. D6429; Gibco ref. 41966-29) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Sigma, ref. F7524; Gibco, ref. 16140-071) y 2 mM de L-glutamina conteniendo 10000 UI/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomicina (Sigma, ref. G1146; Gibco, ref. 15140-122). Las células fueron mantenidas en un incubador de CO_2 (Galaxy S, Cultek) a 37°C

en una atmósfera saturada de humedad y 5% de CO₂. El mantenimiento de las líneas celulares se realizó en frascos de cultivo con un área de crecimiento de 25 cm² o de 75 cm² (T25 o T75; Thermo Scientific) hasta alcanzar un 90% de confluencia, momento en el cual se procedía a su tripsinización con tripsina-EDTA 1x (Sigma, ref. T3924; Gibco, ref. R-001-100) para llevar a cabo la siembra de ensayos o la siembra de nuevos frascos de cultivo T25 o T75.

3.4. Inducción de estrés oxidativo: tratamiento con peróxido de hidrógeno

La generación de una situación de estrés oxidativo en los explantes de retina y en los cultivos celulares se consiguió mediante la administración de un agente inductor de estrés oxidativo, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Los explantes de retina procedentes de ratones P12 fueron tratados usando una solución 3.5 mM de H₂O₂ en medio de cultivo durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación de 30 minutos, el medio de cultivo fue reemplazado por medio de cultivo fresco (sin H₂O₂) y se incubaron adicionalmente 12 o 24 horas. Se usaron como controles explantes de retina que no estuvieron sometidos a tratamiento con H₂O₂.

Las líneas celulares 661W (retiniana) y WRL68 (hepática) se trataron con soluciones de H₂O₂ preparadas en medio de cultivo a diferentes concentraciones comprendidas entre 0.25 y 5 mM durante 0, 15 y 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, el medio de cultivo se reemplazó por medio de cultivo sin H₂O₂, y se incubaron adicionalmente 15 y 30 minutos, 2, 4, 6, 12, 24, 48 y 72 horas. Los tratamientos de 0, 15 y 30 minutos, así como la incubación posterior en medio fresco durante 15 min y 30 min se usaron para la determinación de la actividad de PARP-1 y la medida de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Adicionalmente, en la línea celular WRL68, se llevó a cabo un tratamiento combinado de H₂O₂ con piruvato sódico (PS), a una concentración final de 4 mM, durante el tiempo de tratamiento con H₂O₂, así como durante la post-incubación en medio fresco. El PS es capaz de neutralizar la presencia de

ROS, en concreto, del H₂O₂ (Kladna et al., 2015), por lo que se usó para corroborar que el estrés oxidativo era responsable de los cambios inducidos en la línea celular WRL68.

3.5. Bloqueo de la actividad de PARP-1

3.5.1. Inhibición farmacológica de PARP-1

El bloqueo de la actividad de PARP-1 en los cultivos organotípicos, así como en los cultivos celulares, se llevó a cabo usando los inhibidores de PARP-1, PJ34 (Enzo Life Sciences, ref. ALX-270-289) a una concentración final de 1 µM. Adicionalmente, en la línea celular WRL68 se utilizó también otro inhibidor de PARP-1, denominado AG14361 (Selleck Chemicals, ref. S2178) a una concentración final de 1 µM. Para la realización de los ensayos de inhibición de PARP-1, se realizó en primer lugar una incubación previa con el inhibidor durante 16 horas, seguido posteriormente del tratamiento correspondiente con H₂O₂ junto al inhibidor. Por tanto, durante el desarrollo de los ensayos, el inhibidor se encontraba continuamente presente.

3.5.2. Silenciamiento de PARP-1 mediante ARN pequeño de interferencia

El silenciamiento de la expresión de la proteína PARP-1 se llevó a cabo en la línea celular hepática WRL68 usando el sistema de ARN pequeño de interferencia (*siRNA*, del inglés *small interfering RNA*). Las células se cultivaron a una densidad inicial de 50000 células/pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos y se mantuvieron 12 horas a 37°C en una atmósfera saturada de humedad y 5% de CO₂. A continuación, el medio de cultivo se reemplazó por medio de cultivo fresco (1.6 ml por pocillo). Seguidamente, se le adicionaban 0.4 ml de la solución transfectante. La solución transfectante se obtuvo tras la mezcla en proporción 1:1 de una dilución 3/50 del agente transfectante Lipofectamina 3000 (Invitrogen, ref. L3000-008) en medio esencial mínimo de bajo contenido en suero (*Opti-MEM*TM, Gibco, ref. 31985-062) y una solución 50

nM de una mezcla comercial de 4 *siRNA* para PARP-1 (Dharmacon, ref. L-006656-03-0005) en medio *Opti-MEM™*. La solución transfectante se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó a los pocillos correspondientes, incubándose 72 horas a 37°C en un incubador de CO₂. Como control negativo de la transfección, se transfectaron células usando una mezcla comercial de *siRNA* sin diana específica (*siRNA Non-Target*, Dharmacon, ref. D-001810-10-05). Tras la incubación de 72 horas con la solución transfectante, se procedía al tratamiento con H₂O₂.

3.6. Administración de NAD⁺

Con el fin de evitar una caída en los niveles energéticos celulares, una solución 0.25 mM de NAD⁺ (Sigma, ref. N7004) era administrada durante el tratamiento con H₂O₂, así como durante el tiempo de incubación en medio fresco posterior, en la línea celular hepática WRL68.

3.7. Determinación de especies reactivas de oxígeno mediante citometría de flujo

La línea celular hepática WRL68 se cultivó a una densidad inicial de 200000 células/pocillo en placas de 6 pocillos. Previo al tratamiento con H₂O₂, las células se incubaron con una solución 20 μM de diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA, Life Technologies, ref. C-400) durante 30 minutos a 37°C. Tras la incubación con la sonda, se reemplazó el medio de cultivo y se procedió al tratamiento con H₂O₂. Tras el tratamiento con H₂O₂, las células se despegaron por tripsinización y se lavaron con PBS frío mediante su centrifugación a 300g durante 5 minutos. Finalmente, se resuspendieron en PBS frío y se analizó la fluorescencia mediante citometría de flujo en un citómetro Becton Dickinson FACSAria III usando el programa de análisis y

adquisición FACSDiva (BD Biosciences), en la Unidad de Citometría de Flujo del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada.

3.8. Determinación de la viabilidad celular mediante derivados de tetrazolio

La medición de la viabilidad celular se llevó a cabo mediante el ensayo de MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma, ref. M5655). Para la realización de este ensayo, la línea celular WRL68 se sembró en placas de 96 pocillos a una densidad celular inicial de 8000 células/pocillo. Tras el tratamiento con H₂O₂ y su posterior incubación con medio fresco durante 24 horas, se procedió a la adición de 20 µl/pocillo de una solución 5 mg/ml de MTT (Sigma, ref. M5655), y se incubó durante tres horas a 37°C. A continuación, se retiró todo el contenido del pocillo y se adicionó 100 µl/pocillo de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, ref. 472301) para solubilizar el formazán acumulado en el interior celular. Se incubó durante 10 minutos en agitación y oscuridad. La cantidad de formazán solubilizado se midió mediante la lectura de la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro (*Multiskan Ascent Reader*, Thermo Fisher Scientific). El porcentaje de células viables se calculó como el cociente de la absorbancia de la condición sometida a tratamiento con H₂O₂ respecto a la del control, asumiendo que el control posee una viabilidad del 100%.

La determinación de la viabilidad celular en la línea celular WRL68 en las que se había llevado a cabo el bloqueo de la expresión de PARP-1 se llevó a cabo mediante el método de MTS (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio). Tras el tratamiento con H₂O₂ y su posterior incubación 24 horas en medio fresco, se adicionó 100 µl (para placas de 6 pocillos) de la solución comercial de MTS (Promega, ref. G3582) y se incubó a 37°C. La cantidad de formazán generado se midió mediante la lectura de la absorbancia a 490 nm con un espectrofotómetro (*Microplate Readers FLUOstar[®] Omega*, BMG LABTECH) cada 10 minutos hasta la saturación de la absorbancia. Paralelamente, se usó como blanco pocillos que

contenían medio de cultivo y MTS. El porcentaje de células viables se calculó como el cociente de la absorbancia de la condición sometida a tratamiento con H₂O₂ respecto a la del control, asumiendo que el control posee una viabilidad del 100%.

3.9. Medida de la proliferación celular mediante sulforrodamina B

El grado de proliferación celular de la línea celular retiniana 661W se determinó mediante el ensayo colorimétrico basado en sulforrodamina B (SRB) según Vichai y Kirtikara (2006). Las células 661W se cultivaron a una densidad inicial de 2000 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Tras el tratamiento con H₂O₂ y su posterior incubación durante 0, 24, 48 y 72 horas en medio fresco, se añadió 50 µl/pocillo de una solución fría al 10% de ácido tricloroacético (TCA) directamente sobre las células con medio de cultivo (concentración final 3.3% de TCA) y se incubaron 1h. Posteriormente, las placas se lavaron varias veces con agua y se dejaron secar a temperatura ambiente. Tras el secado, las placas se tiñeron con una solución de SRB al 0.057% en 1% de ácido acético durante 30 minutos, se lavaron cuatro veces con una solución 1% de ácido acético y se dejaron secar a temperatura ambiente. Tras el secado de las placas, se añadió 200 µl/pocillo de una solución 10 mM de Tris pH 10.5 para solubilizar la SRB, y se incubó 5 min en agitación y oscuridad. Finalmente, la lectura de la absorbancia se realizó a 492 nm con un espectrofotómetro (*Multiskan Ascent Reader*, Thermo Fisher Scientific).

3.10. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

La determinación del porcentaje de células presentes en cada una de las fases del ciclo celular (subG₁, G₀/G₁, S y G₂/M) se realizó por citometría de flujo mediante la tinción del ADN con el colorante Ioduro de Propidio (IP). Para el análisis del ciclo celular, se sembraron 200000 células/pocillo de la línea celular 661W en placas de 6 pocillos. Transcurrido el tiempo de tratamiento con H₂O₂ y

la incubación posterior de 24 horas, se recogieron los medios de cultivo, se tripsinizaron las células y se transfirieron a tubos Eppendorf. A continuación, se centrifugaron a 800g durante 10 minutos, se lavaron con PBS frío y se volvieron a centrifugar a 800g durante 10 minutos. Una vez retirado el sobrenadante, se adicionó gota a gota y en hielo 2 ml de etanol 70% previamente enfriado a -30°C. Se fijaron las células en hielo durante 15 minutos, y se conservaron a -20°C en etanol 70% hasta su análisis. Para su análisis, se retiró el etanol 70% mediante su centrifugación a 800g durante 10 min a 4°C, y el sedimento celular se lavó con 2 ml de PBS frío. Se volvieron a centrifugar durante 10 min a 800g y se descartó el sobrenadante. Tras la realización de tres lavados adicionales con PBS, las células se mezclaron con 250 µl de una solución de IP con RNasa (*PI/RNASE Solution*, Immunostep, ref. PI/RNase) y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación las muestras se analizaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSAria III (Unidad de Apoyo a la Investigación [UNAI], Hospital Clínico San Cecilio). Los resultados se representaron como el porcentaje de células presentes en cada una de las fases del ciclo celular.

3.11. Detección de daño en el ADN mediante 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

La detección de daño oxidativo en el material genético se llevó a cabo mediante la detección y cuantificación de un producto de la oxidación del ADN, la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). La presencia de radicales libres de oxígeno, tales como el radical hidroxilo, pueden causar daños en proteínas, lípidos de membrana y ADN. En el caso del radical hidroxilo (OH[·]), éste puede interaccionar con los nucleótidos del ADN, tales como la guanina, generando 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) (Floyd et al., 1988). En este estudio se cuantificó la cantidad de 8-OHdG presente en cada uno de los estadios elegidos mediante un ELISA competitivo (*New 8-OHdG check kit*; JalCA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Retinas procedentes de los estadios P0, P7, P14, P21 y P60 se homogeneizaron con un homogeneizador Dounce

(Afora, Madrid, España) en 1 ml de reactivo DNAzol (Life Technologies, ref. 10503-027). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 9800g durante 10 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se precipitó el ADN mediante la adición de 0.5 ml de etanol 100%. El precipitado de ADN se lavó con etanol 75%, y finalmente, se mezcló con una solución 8 mM de NaOH. La cantidad de ADN obtenido en cada una de las muestras se cuantificó para su posterior procesamiento (BioPhotometer Plus, Eppendorf). 10 µg de ADN de cada muestra fueron digeridos con la enzima DNasa I (Sigma, ref. AMPD1) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 50 µl de las muestras se transfirieron a la placa de ELISA junto con 50 µl del anticuerpo primario para 8-OHdG, y se incubó durante 1 hora a 37°C. Tras el periodo de incubación, se realizaron tres lavados con la solución de lavado (PBS). A continuación, se añadió 100 µl de la solución de anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa) a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a 37°C. Tras la incubación, se realizaron varios lavados, se añadió 100 µl por pocillo de la solución del sustrato (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, la reacción se finalizó mediante la adición de 100 µl por pocillo de una solución 1M de ácido fosfórico, y se midió la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas (*Multiskan Ascent Reader*, Thermo Fisher Scientific). La cantidad de 8-OHdG presente en cada muestra se obtuvo mediante la extrapolación de la absorbancia en una curva estándar de 8-OHdG preparada de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En cada estadio se analizaron tres retinas de distintos animales por triplicado.

3.12. Análisis de la muerte celular

3.12.1. Determinación de la muerte celular mediante citometría de flujo

El porcentaje de muerte celular tras la inducción de estrés oxidativo se cuantificó por citometría de flujo mediante la detección de anexina-V, proteína que se une al fosfolípido fosfatidilserina expuesto en la cara externa de la membrana durante los procesos de apoptosis, y por la internalización del

compuesto IP y su unión al ADN. Para la evaluación de la muerte celular en explantes de retina P12, tras la exposición con H₂O₂ y su posterior incubación en medio fresco durante 24 horas, los explantes se disgregaron en 1ml de tampón de anexina-V diluido 1/10 en PBS (*Annexin V Binding Buffer*, Immunostep, ref. ANXVKF-100T) mediante un homogeneizador Dounce de émbolo no esmerilado y se pasaron repetidas veces a través de una jeringa con aguja de 0.33 mm x 1.27 mm (*Micro-Fine 29 Gauge*, Becton-Dickinson). Seguidamente, se añadió 10 µl de Anexina-V-APC (BD Pharmingen™, ref. 550474) y 10 µl de una solución 1mg/ml de IP (Sigma, ref. P4170) a la suspensión celular, y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La cuantificación del porcentaje de células apoptóticas (Anexina-V positivas), células necróticas (IP positivas) y células con apoptosis secundaria (Anexina-V e IP positivas), se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACS Canto II, utilizando el software FACSDiva (BD Biosciences) para la adquisición y análisis de los datos, en la Unidad de Citometría de Flujo del CIC de la Universidad de Granada.

La evaluación de la muerte celular en cultivos celulares se realizó también por citometría de flujo mediante la cuantificación de Anexina-V e IP. La línea celular hepática WRL68 fue cultivada a una densidad inicial de 250000 células/pocillo en placas de 6 pocillos. Tras el tratamiento con H₂O₂ y su posterior incubación en medio fresco durante 24 horas, se recogieron los medios, se tripsinizaron las células y se transfirieron a tubos Eppendorf. A continuación, se centrifugaron a 800g durante 10 minutos a 4°C y se lavaron con PBS frío. Una vez retirado el sobrenadante, se adicionó 500 µl de tampón unión de anexina-V diluido 1/10 en PBS (*Annexin V Binding Buffer*, Immunostep, ref. ANXVKF-100T). Posteriormente, se adicionó 5 µl de anexina-V-FITC (Immunostep, ref. ANXVKF-100T) y 5 µl de IP (Immunostep, ref. ANXVKF-100T) a todas las muestras y se procedió a incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrida la incubación, se midió la fluorescencia obtenida en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSAria III junto con el software de adquisición y análisis FACSDiva, en la Unidad de Citometría de Flujo del CIC de la Universidad de Granada.

Antes de efectuar las medidas correspondientes, se realizó una estandarización de la intensidad de fluorescencia de las sondas. Para ello, se usaron tres muestras estándar: un blanco que corresponde con células sin tratar y sin marcar con las sondas; un control positivo para anexina-V que corresponde con células tratadas con estaurosporina (STS, 6 μ M para los cultivos celulares y 1 μ g/ml para los explantes de retina) teñidas únicamente con anexina-V, y un control positivo para IP que corresponde con células o explantes tratados con STS y teñidos únicamente con IP.

3.12.2. Cuantificación de los niveles de lactato deshidrogenasa

Para determinar si los procesos de muerte celular acontecidos en la línea celular hepática WRL68 correspondían con procesos de muerte celular por necrosis se cuantificaron los niveles de enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo tras el tratamiento con H₂O₂ (Chan et al., 2013) mediante un kit comercial (*Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit*, Thermo Scientific, ref. 88953). El kit se basaba en un método colorimétrico, en el cual la enzima presente en el medio extracelular, como consecuencia de su liberación por daños en la membrana plasmática, catalizaba la conversión de lactato a piruvato mediante la generación de NADH. Seguidamente, la enzima diaforasa reducía una sal de tetrazolio a formazán, usando el NADH generado por la enzima lactato deshidrogenasa. La absorbancia del formazán generado podía cuantificarse a 490 nm y se relacionaba de forma directamente proporcional con la cantidad de LDH liberada.

En este ensayo, las células WRL68 se cultivaron a una densidad inicial de 12000 células/pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos. Tras el tratamiento con H₂O₂ y 24 horas de incubación en medio de cultivo fresco, se tomaron 50 μ l del medio de cultivo de cada pocillo y se transfirieron a nueva placa de 96 pocillos. A continuación, se añadió 50 μ l de la mezcla de reacción constituida por el sustrato disuelto (Cloruro de 5-fenil-2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-2H-tetrazolio, INT) en tampón de ensayo. Tras la adición del sustrato, la placa se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Adicionalmente, se

usaron pocillos con medio con/sin suero y medio de células tratadas con 1% de Tritón X-100 como blancos y control positivo, respectivamente. Tras el periodo de incubación, se procedió a la adición de 50 µl de la solución de parada para detener la reacción colorimétrica y se procedió a la lectura de la absorbancia a 492 nm con un espectrofotómetro (*Multiskan Ascent Reader*, Thermo Fisher Scientific).

El porcentaje de LDH liberada se determinó como:

$$LDH \text{ liberada (\%)} = \frac{(\text{Abs exp} - \text{Abs spont})}{(\text{Abs max} - \text{Abs spont})}$$

Donde “Abs exp” representa la absorbancia del medio de cultivo corregida frente al blanco de la condición a estudiar, “Abs spont” la cantidad de LDH basal liberada en células sin tratar (absorbancia de medio de cultivo de células sin tratar corregida frente al blanco) y “Abs max” la cantidad máxima de LDH liberada por células tratadas con Tritón X-100 1% (absorbancia del medio de cultivo de células tratadas con Tritón X-100 1% corregida frente al blanco).

3.13. Determinación del contenido celular de ATP

El contenido intracelular de ATP en la línea WRL68 se midió mediante un kit de bioluminiscencia basado en la enzima luciferasa (*Adenosine 5'-triphosphate [ATP] Bioluminescent Assay Kit*, Sigma, ref. FLAA). La línea celular WRL68 se cultivó en frascos de cultivo T25 a una densidad inicial de 1000000 de células/T25. Tras el tratamiento con H₂O₂ y 2 horas de incubación en medio de cultivo fresco, las células se recogieron por tripsinización y se lavaron en PBS frío con centrifugaciones a 300g durante 10 minutos a 4°C. A continuación, el ATP intracelular se obtuvo mediante la adición de agua hirviendo según el procedimiento descrito por Yang y colaboradores (Yang et al., 2002). 400 µl de agua miliQ calentada a 100°C se añadió sobre cada sedimento celular, se mezclaba mediante agitación y se calentaba 5 min a 100°C en un bloque térmico. Seguidamente, la suspensión celular se centrifugaba a 12000g durante 5 minutos a 4°C. 300 µl del sobrenadante, que

contenía el ATP intracelular extraído, se usó para la cuantificación del ATP mediante el ensayo de bioluminiscencia siguiendo las instrucciones del fabricante. El precipitado proteico se mezcló en los 100 μ l restantes y se usó para la cuantificación proteica. Previamente, en placas de 96 pocillos se dispuso 100 μ l de una dilución 1/25 de la solución de reacción (*ATP Assay Mix*) y se dejó 3 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Transcurridos los tres minutos, se añadió 100 μ l del sobrenadante obtenido previamente y rápidamente se medía la luminiscencia mediante un lector de placas (*TRIAD series Multi-mode Microplate reader*, Dynex Technologies). La cantidad de ATP se calculó usando una recta patrón de concentraciones crecientes de ATP comercial, desde 1×10^{-6} mol/l hasta 1×10^{-10} mol/l. Se midió la cantidad de ATP por triplicado en cada muestra, en tres ensayos independientes.

La concentración proteica de los extractos obtenidos se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford. Para ello, se añadió 5 μ l del extracto proteico a 200 μ l de solución de Bradford 1x (Bio-Rad, ref. 500-0006EDU), y se procedió a la lectura de la densidad óptica (D.O) correspondiente a 595 nm mediante un espectrofotómetro (*Multiskan Ascent Reader*, Thermo Fisher Scientific). Para obtener las concentraciones de proteínas, se realizó una recta patrón de concentraciones crecientes de albúmina, desde 0.5 hasta 10 mg/ml. Finalmente, la cantidad intracelular de ATP se expresó como nmol por mg de proteína total (nmol/mg).

3.14. Determinación de la actividad de PARP-1 mediante ELISA

La determinación de la actividad de la enzima PARP-1 se determinó mediante un ensayo colorimétrico ELISA comercial (*HT Colorimetric PARP/apoptosis assay*, Trevigen, ref. 4684-096-K), siguiendo las instrucciones del fabricante. En este ensayo ELISA se cuantifica la cantidad de polímero PAR generado y unido a histonas adheridas en los pocillos de placas de 96 pocillos como consecuencia de la actividad de la enzima PARP-1 presente en las muestras objeto de ensayo. Retinas procedentes de estadios P0, P7, P14, P21 y P60 se lisaron con el tampón de lisis indicado por el fabricante, constituido

por tampón de ensayo 1x I-PAR (ref. 4684-096-07), 0.4 M de NaCl, 0.9% de Tritón X-100 y 0.4 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Las retinas se homogeneizaron mediante agitación periódica y su incubación a 4°C durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 10000g durante 10 min a 4°C para eliminar los restos celulares. La concentración proteica de los extractos obtenidos se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford (descrito en secciones anteriores). Finalmente, se ajustó la cantidad de proteína a 200 ng de proteína /25 µl de muestra y se conservaron a -80°C hasta su medición.

Tras la hidratación de la placa de 96 pocillos con el tampón de ensayo 1x I-PAR durante 30 minutos a temperatura ambiente, se adicionaron 25 µl de muestra (200 ng de proteína) por pocillo y por triplicado. A continuación, se adicionó 25 µl de una mezcla de ensayo compuesta por tampón de ensayo 1x I-PAR, 2 mM de NAD⁺ (ref. 4684-96-02) y ADN 1x (ref. 4671-096-06), y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Tras el periodo de incubación, la placa se lavó dos veces con PBS Tritón X-100 0.1% (PBS-Tr), seguido de dos lavados en PBS. A continuación, se adicionó 50 µl/pocillo de anticuerpo anti-PAR (ref. 4684-096-04) diluido 1:1000 y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Tras lavados con PBS-Tr 0.1% y PBS, se incubaron los pocillos con 50 µl del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa diluido 1:1000 (ref. 4684-096-05) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, tras lavados con PBS-Tr 0.1% y PBS, los pocillos se incubaron con 50 µl del sustrato colorimétrico (TACS-Sapphire™, ref. 4822-96-08) durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Para la medida de la absorbancia, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de una solución 0.2 M de HCl, y se procedió a la lectura de la densidad óptica (D.O) correspondiente a 450 nm mediante un espectrofotómetro (*Multiskan Ascent Reader*, Thermo Fisher Scientific). La actividad de PARP-1 se expresó como mUnidades/ml gracias a la extrapolación de la absorbancia obtenida con una curva estándar de PARP-1 de 10 a 0.1 mUnidades, preparada y cuantificada en cada ensayo. Asimismo, como controles negativos se midió la lectura de la D.O en pocillos sin muestra. Las muestras se midieron por triplicado y en tres retinas independientes por cada estadio analizado.

3.15. Análisis de la morfología mitocondrial

El estudio de la función mitocondrial se realizó mediante el análisis de la morfología mitocondrial mediante dos estrategias diferentes:

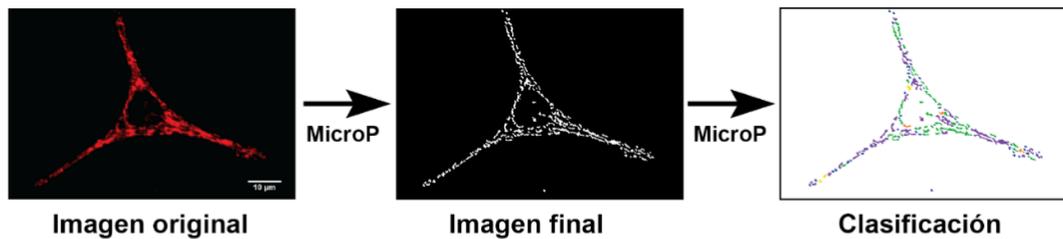
3.15.1. Cuantificación de la morfología mitocondrial mediante el programa MicroP

El análisis y cuantificación de la morfología mitocondrial se realizó mediante el empleo de una sonda fluorescente que marca específicamente mitocondrias, denominada *mitotracker* (*MitoTracker[®] Red CMXRos*, Cell Signaling Technology, ref. #9082), y mediante el uso del programa de análisis de la morfología mitocondrial, MicroP, desarrollado por Peng y colaboradores (Peng et al., 2011). Para ello, la línea celular hepática WRL68 se cultivó a una densidad inicial de 150000 células/pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos. Tras el tratamiento con H₂O₂, se incubaron en medio fresco 2 y 4 horas. Durante los últimos 45 minutos de incubación en medio fresco, se adicionó la sonda *mitotracker* (*MitoTracker[®] Red CMXRos*, Cell Signaling Technology, ref. #9082) a una concentración final de 125 nM. Concluido el tiempo de incubación, las células se lavaron varias veces con PBS frío y se fijaron con una solución fría de metanol-acetona en proporción 1:1 durante 10 min a 4°C en oscuridad. Finalmente, tras varios lavados con PBS, los núcleos celulares eran contrastados mediante la tinción con Hoechst 33342 (10 mg/ml; Sigma, ref. B2261) a una dilución 1:1000 durante 2 minutos. Tras la tinción nuclear y varios lavados con PBS, se montaron con el medio de montaje *Fluoromount-G[®]* (SouthernBiotech, ref. 0100-01). Para el análisis y cuantificación de la morfología mitocondrial, las muestras se visualizaron mediante microscopía láser confocal en un microscopio confocal Leica TCS-SP (Leica; Unidad de Apoyo a la Investigación [UNAI], Hospital Clínico San Cecilio) con un objetivo de inmersión 63x (magnificación 630x) y se tomaron 10 imágenes por muestra. Las imágenes posteriormente eran procesadas mediante el programa de análisis de la morfología mitocondrial MicroP (Peng et al., 2011). Mediante este software las imágenes obtenidas eran procesadas para obtener una imagen

final donde cada elemento mitocondrial era extraído y depurado (Figura 13A). Posteriormente, cada elemento mitocondrial se clasificó según su morfología y tamaño en seis subtipos mitocondriales diferentes: mitocondrias globulares pequeñas (del inglés *small globe*), globulares de mayor tamaño (del inglés *swollen globe*), tubulares simples (del inglés *simple tube*), tubulares curvadas (del inglés *twisted tube*), tubulares ramificadas (del inglés *branching tube*) y tubulares en forma de rosquilla (del inglés *loops*) (Figura 13A) (Peng et al., 2011). Para el estudio de la morfología mitocondrial y la presencia de fragmentación mitocondrial, se llevó a cabo una agrupación de los diferentes subtipos mitocondriales proporcionados por el programa MicroP en dos tipos principales: mitocondrias globulares o mitocondrias tipo I y mitocondrias tubulares o mitocondrias tipo II. Esta clasificación se basó en la clasificación propuesta por Li y colaboradores (2015a) con algunas modificaciones. En el tipo I se engloban las mitocondrias con morfología globular y en el tipo II todas las mitocondrias con morfología tubular (simple, curvada, ramificada y en forma de rosquilla) (Figura 13B). Se obtenía el porcentaje de cada tipo mediante su relativización al número total de mitocondrias analizadas en cada condición. Se analizó un mínimo de 7000 mitocondrias por condición en diferentes ensayos independientes.

Asimismo, el programa de análisis proporcionaba el área, la longitud del eje mayor (altura, *L-axis*) y el eje menor (anchura, *S-axis*) de cada mitocondria clasificada, lo que se usó para representar el área mitocondrial promedio y el índice de elongación de cada condición por experimento. El índice de elongación se calculó como el cociente entre el eje mayor y el eje menor; de tal forma, que las mitocondrias tubulares presentarían índices de elongación mayores de 1, mientras que las mitocondrias con morfología globular presentarían índices de elongación más cercanos o iguales a 1.

A) Clasificación de la morfología mitocondrial con el programa MicroP



B) Tipos de morfología mitocondrial

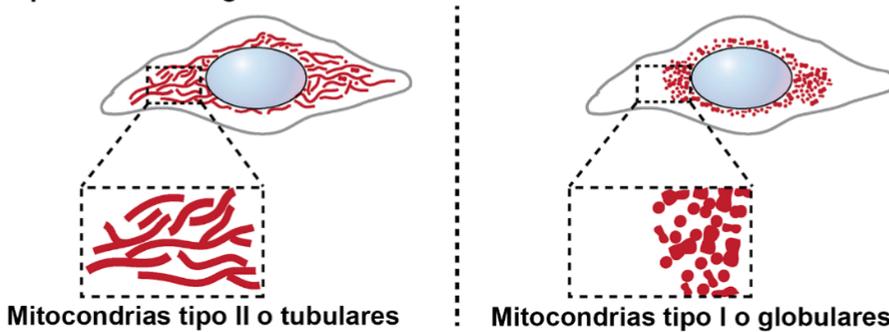


Figura 13. Procedimiento para el análisis de la morfología mitocondrial mediante MicroP.

A) Etapas en el procesamiento de imágenes realizadas por el programa MicroP (Peng et al., 2011). Las imágenes obtenidas mediante microscopía láser confocal se introducían en el programa de análisis MicroP. Este programa mediante una serie de algoritmos procesaba la imagen, hasta obtener una imagen final donde cada elemento mitocondrial era extraído y depurado. Finalmente, el programa llevó a cabo la clasificación de cada elemento depurado según su morfología y tamaño, obteniéndose seis subtipos mitocondriales diferentes: mitocondrias globulares pequeñas (indicadas de color azul), globulares de mayor tamaño (de color amarillo), tubulares simples (de color verde), tubulares curvadas (de color naranja), tubulares ramificadas (de color morado) y tubulares en forma de rosquilla (de color rojo). **B)** Reorganización de los subtipos mitocondriales proporcionados por el programa MicroP en dos tipos principales: mitocondrias tipo II o tubulares y mitocondrias tipo I o globulares (barra de escala: 10 μm).

3.15.2. Análisis de la ultraestructura mitocondrial mediante microscopía electrónica de transmisión

El estudio de la ultraestructura mitocondrial se llevó cabo mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). La preparación de las muestras fue realizada por el Servicio de Preparación de Muestras del CIC de la

Universidad de Granada. La línea celular WRL68 se cultivó a una densidad celular inicial de 250000 células/pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos. Tras el tratamiento con H₂O₂ e incubación posterior de 2 horas en medio fresco, las células se lavaron en PBS frío y se fijaron durante 2 horas a 4°C en una solución de glutaraldehído 2% en tampón cacodilato 0.05 M (pH 7.4) suplementado con 2 mM de MgCl₂ y 0.03 g/L de sacarosa. Posteriormente, las muestras se post-fijaron en tetraóxido de osmio 1% durante 1 hora, se deshidrataron mediante pases sucesivos en concentraciones crecientes de etanol y se incluyeron en resina epoxi. Secciones ultrafinas (50-70 nm de grosor) fueron montadas en rejillas de cobre y visualizadas mediante un microscopio electrónico de transmisión Zeiss Libra 120 EDX (Zeiss) en el CIC de la Universidad de Granada.

3.16. Inmunodetección de proteínas por *Western Blot*

Para la obtención de extractos proteicos de retinas completas, 2 retinas aisladas (Figura 12) de cada estadio se lisaron en 25 µl de tampón de lisis (0.1 mM de EDTA, 50 mM de Tris HCl a pH 8, 12.5 mM de β-mercaptoetanol, 0.5% de Tritón X-100) para los estadios P0, P3 y P7 o en 50 µl de tampón de lisis para los estadios P10, P12, P14, P21, P28 y P60 suplementado con inhibidores de proteasas (Roche, ref. 14696300). Las muestras se mantuvieron durante 45 minutos en hielo con agitación cada 5 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugaron a 16000g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido, que correspondía a la fracción proteica, se reservó para la cuantificación proteica y la inmunodetección de proteínas. La extracción proteica de explantes se realizó mediante el mismo procedimiento, cambiando únicamente el tampón de lisis. Dos explantes de retina por condición se lisaron en 50 µl de tampón de lisis RIPA (50 mM de Tris-HCl a pH 8, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de NP-40, 0.5% de deoxicolato sódico, 0.1% de SDS) suplementado con una solución de inhibidores de proteasas comercial diluida 1/100 (Roche, ref. 14696300; Sigma, ref. P8340), 1 mM de PMSF (Sigma, ref. 93482) y con inhibidores de fosfatasa (1mM de NaF y 1 mM de Na₃VO₄).

La extracción de proteínas en cultivos celulares (661W y WRL68) se realizó tras el tratamiento con H₂O₂ y su posterior incubación en medio fresco, tras varios lavados con PBS frío suplementado con 1 mM de NaF, y su posterior raspado en tampón de lisis RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas tal y como se ha indicado anteriormente. La línea celular retiniana 661W se cultivó a una densidad inicial de 1 millón de células/placa en placas de cultivo de 10 cm de diámetro. En el caso de la línea celular hepática WRL68 se llevó cabo la lisis de los cultivos celulares provenientes del silenciamiento de PARP-1 mediante *siRNA* en placas de 6 pocillos indicado en secciones anteriores.

La concentración proteica de los extractos obtenidos se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford. Para ello, se añadió 1 µl del extracto proteico a 200 µl de solución de Bradford 1x (Bio-Rad, ref. 500-0006EDU) y se procedió a la lectura de la densidad óptica (D.O) correspondiente a 595 nm mediante un espectrofotómetro (*Multiskan Ascent Reader*, Thermo Fisher Scientific). Para obtener las concentraciones de proteínas, se realizó una recta patrón de concentraciones crecientes de albúmina, desde 0,5 hasta 10 mg/ml. Por tanto, la concentración de proteínas de cada muestra era referida a las concentraciones proporcionadas por la recta patrón. La concentración proteica de los extractos de la línea celular WRL68 obtenidos se determinó mediante el método colorimétrico basado en ácido bicinconínico (BCA, ThermoFisher, ref 23225). Para ello, se añadió 2 µl del extracto proteico a 200 µl de solución de BCA y se procedió a la lectura de la densidad óptica (D.O) correspondiente a 562 nm mediante un espectrofotómetro (*Microplate Readers FLUOstar[®] Omega*, BMG LABTECH). Para obtener las concentraciones de proteínas, se realizó una recta patrón de cantidades crecientes de albúmina, desde 0,25 hasta 10 µg.

Tras la cuantificación de los extractos proteicos de retinas completas, explantes de retina o de la línea celular 661W, se dispuso de misma cantidad de proteína (30-40 µg), a la cual se le añadía 5 µl de tampón de carga 6x (0.25 M de Tris-Cl pH 6.8, β-mercaptoetanol 8%, SDS 8%, y bromofenol 0.4%) y tampón de lisis hasta completar un volumen final de 30 µl. Posteriormente, se

calentaron las muestras durante 10 minutos a 96°C en un bloque térmico y se centrifugaron a 16000g durante 5 segundos. Tras esto, las proteínas se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% o 7.5% a un voltaje de 120 V durante una hora. Las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de Difluoruro de polivinilo (PVDF, *Immuno-Blot® PVDF membrane*, Bio-Rad, ref. 162-0177) mediante la técnica de transferencia semiseca utilizando el sistema de transferencia *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* o mediante el sistema de transferencia *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* (Bio-Rad). Las condiciones de transferencia fueron 50 mA de intensidad durante 50 minutos para el caso del *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell*, y 25V durante 30 minutos para el *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System*.

En el caso de las muestras de la línea celular hepática WRL68, se dispuso de la misma cantidad de proteína (30 µg), a la cual se le añadía 7.5 µl de tampón de carga 4x (*Invitrogen™ Novex™ NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X)*, Invitrogen, ref. NP0008), ditiotreitól (DTT) a una concentración final de 30 mM y tampón de lisis hasta completar un volumen final de 30 µl. Posteriormente, se calentaron las muestras durante 10 minutos a 96°C en un bloque térmico y se centrifugaron a 16000g durante 5 segundos. Tras esto, las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida Bis-Tris con un rango de acrilamida 4-12% (*NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Midi Protein Gels, 20-well*, Invitrogen, ref. WG1402BOX) a un voltaje de 120 V durante dos horas. Las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (*iBlot™ Transfer Stack*, Invitrogen, ref. IB301001) mediante la técnica de transferencia semiseca utilizando el sistema de transferencia *iBlot® Dry Blotting System* (Invitrogen). Las condiciones de transferencia fueron de 13 minutos a 23V.

Las membranas de PVDF o de nitrocelulosa se bloquearon con una solución de 10% de leche sin grasa en polvo en tampón Tris salino (TBS) con Tween 20 0.1% (TBS-T) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó la membrana con TBS-T y se procedió a incubar la membrana con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla I, Anexo III) en TBS-T con un 5% de leche sin grasa en polvo (TBS-T-L) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, y tras lavar la membrana varias veces con TBS-T, se

incubó con el anticuerpo secundario adecuado conjugado con peroxidasa diluido en TBS-T-L (Tabla I, Anexo III) durante dos horas a temperatura ambiente. La cantidad de proteínas se normalizó incubando la membrana con el anticuerpo primario anti- β -tubulina III o anti- β -Actina (Tabla I, Anexo III) diluido en TBS-T-L durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios y secundarios, así como la dilución empleada y su referencia se muestran en la Tabla I (Anexo III). Finalmente, y tras tres lavados con TBS-T, se reveló la membrana con el reactivo de revelado quimioluminiscente (Millipore, ref. WBKLS0500; ThermoFisher ref. #34080), utilizando el sistema de adquisición de imágenes (*ChemiDOC-it*, UVP; *Amersham Imager 600RGB Chemidoc*, GE Healthcare Life Sciences).

La cuantificación de la señal obtenida para los ensayos en retinas postnatales se realizó mediante el programa de análisis de imagen *ChemiDOC-it* (UVP). La cuantificación de la señal obtenida para los ensayos en explantes de retina y en la línea celular 661W se realizó mediante el programa de análisis de imagen ImageJ. La señal obtenida se normalizó con respecto a los niveles de β -actina o β -tubulina.

3.17. Obtención de criosecciones

Los ojos completos procedentes de ratones P7 y P14 se fijaron en fijador PLP (paraformaldehído 2%, 0.055 M de lisina y 0.01M de metaperyodato sódico en tampón fosfato 0.1M) (Yamato et al., 1984) durante 6 horas a 4°C. Posteriormente, se lavaron a temperatura ambiente con PBS-Tr 0.1%. A continuación, se crioprotegieron con una solución de sacarosa 20% en PBS-Tr 0.1% durante 24 horas a 4°C. Tras la crioprotección los ojos fueron embebidos en *Tissue-Tek[®] O.C.T. Compound* (Sakura Finetek, ref. 4583) y se congelaron en isopentano enfriado con nitrógeno líquido. Los ojos congelados se mantuvieron congelados a -40°C hasta la obtención de las secciones.

Para la obtención de criosecciones de explantes de retina P12, los explantes se fijaron en PLP durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, se lavaron a

temperatura ambiente con PBS-Tr 0.1%, y se crioprotegieron con una solución de sacarosa 20% en PBS-Tr 0.1% durante 24 horas a 4°C. Tras la crioprotección, los explantes fueron embebidos en solución de gelatina 10% con sacarosa 10% en PBS. Se dejaba gelificar en frío y posteriormente, los bloques de gelatina se congelaban con isopentano congelado a -80°C. Los bloques congelados se mantuvieron a -80°C hasta la obtención de las secciones.

Las secciones de ojos completos y de explantes de retina se realizaron con 20 µm de espesor en un criostato Leica CM1850 (Leica), se extendieron sobre portaobjetos *Superfrost® Plus* (Thermo Scientific, ref. J1800AMNZ), se secaban al aire y se conservaron a -20°C.

3.18. Obtención de secciones semifinas

La obtención de secciones semifinas y su tinción fue elaborado por el Servicio de Preparación de Muestras del CIC de la Universidad de Granada. Para la obtención de secciones semifinas de explantes de retina P12, los explantes se fijaron en una solución de glutaraldehído 2% en tampón cacodilato 0.05 M (pH 7.4) suplementado con 2 mM de MgCl₂ y 0.03 g/L de sacarosa. Posteriormente, las muestras se post-fijaron en tetraóxido de osmio 1% durante 1 hora, se deshidrataron mediante pases sucesivos en concentraciones crecientes de etanol y se incluyeron en resina epoxi. Secciones semifinas (0.5 µm de grosor) fueron posteriormente teñidas con una solución acuosa de azul de toluidina 1% y bórax, y se visualizaron mediante un microscopio Zeiss Axiophot (Zeiss) con el objetivo de 40x (magnificación 400x).

3.19. Inmunocitoquímica en criosecciones

Las criosecciones de ojos completos o de explantes de retina se dejaban a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente, se hidrataban con PBS durante 10 minutos. A continuación, las secciones se permeabilizaban

con PBS-Tr 0.1% (para criosecciones de ojos completos) o 0.2% (para criosecciones de explantes de retina) durante 10 minutos en agitación. Tras la permeabilización, las secciones se lavaban 3 veces en PBS con Tween 20 0.1% (PBS-T). Tras los lavados, se procedía al bloqueo de los sitios inespecíficos mediante la incubación de las secciones con suero de cabra (NGS, del inglés *Normal Goat Serum*, Sigma, ref. G9023) al 10% en PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se procedía a la incubación con el anticuerpo primario frente a la histona H2AX en su forma fosforilada (γ -H2AX, Novus Biologicals, ref. NB100-79967) a una dilución 1:200 durante toda la noche a 4°C en una solución de PBS-T con suero NGS 5% (PBS-T-NGS). Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaban tres lavados en PBS-T en agitación y se procedía a la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente una dilución 1:1000 (1:800 para las criosecciones de explantes de retina) en PBS-T-NGS durante dos horas a temperatura ambiente en oscuridad (*Alexa fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG*, Life Technologies, ref. A11008, o *Alexa fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG*, Life Technologies, ref. A11012). A continuación, se procedió a lavar las secciones con PBS-T tres veces, seguido de tres lavados en PBS. Finalmente, los núcleos celulares eran contrastados mediante la tinción de las secciones con Hoechst 33342 (10 mg/ml; Sigma, ref. B2261) o con DAPI (1mg/ml; Sigma, ref. D9542) a una dilución 1:1000 durante 2 y 5 minutos, respectivamente. Tras la tinción nuclear se lavaron con PBS y se montaron con el medio de montaje (*Fluoromount-G*[®], SouthernBiotech, ref. 0100-01; *FluorSave™ Reagent*, Calbiochem, ref: 345789). Secciones sin marcaje con el anticuerpo primario fueron usadas como controles negativos. Finalmente, se conservaron a 4°C hasta su visualización.

Las secciones fueron visualizadas mediante microscopía láser confocal con un microscopio TCS-SP5 (Leica) o A1R (Nikon GmbH) en el servicio de microscopía del centro CIC de la UGR. Las imágenes sufrieron ajustes de brillo y contraste mediante el programa Adobe Photoshop. En explantes de retina sometidos a estrés oxidativo se llevó a cabo el recuento de células positivas para el inmunomarcaje de γ -H2AX en la capa nuclear externa (CNE). Se

cuantificó el número de células positivas en tres campos por sección (tres secciones por explante de retina y tres explantes de retina por condición), usando un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiophot (Zeiss) con un objetivo 63x (magnificación 630x). Los resultados se expresaron como el número de células positivas para γ -H2AX por sección.

3.20. Inmunohistoquímica TUNEL

La presencia de muerte celular en las secciones de retina era puesta de manifiesto mediante la técnica TUNEL (del inglés *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*) (Gavrieli et al., 1992). Esta técnica utiliza una transferasa terminal (TdT) que incorpora nucleótidos marcados con biotina en los extremos 3' OH libres de las cadenas de ADN fragmentadas como consecuencia de los procesos de muerte celular. Las secciones de retina eran incubadas durante 1 hora a 37°C en una solución de reacción compuesta por 10 unidades/ml de enzima TdT (Promega, ref. M828C), 0.2 nmol/l del nucleótido biotina-16-dUTP (Roche, ref. 109307910) en tampón TdT (Promega, ref. M189A) a pH 6.8. Tras lavar con PBS, las criosecciones se incubaron con estreptavidina conjugada con el fluorocromo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, ref. S11223). Tras varios lavados con PBS, algunas secciones se contrastaron con Hoechst 33342 (10 mg/ml; Sigma, ref. B2261) a una dilución 1:1000 durante 2 minutos y se montaron con el medio de montaje *Fluoromount-G*[®] (SouthernBiotech, ref. 0100-01). Finalmente, se conservaron a 4°C hasta su visualización. En otras secciones se procedió a realizar la inmunocitoquímica para la histona γ -H2AX tal y como se ha descrito en la sección anterior.

Las células positivas para el marcaje con TUNEL pertenecientes a cinco campos se cuantificaron en todas las secciones procesadas (tres retinas por edad y tres secciones por retina) usando un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiophot (Zeiss) con un objetivo 40x (magnificación 400x). Los resultados se expresaron como el porcentaje de células positivas para TUNEL con o sin señal positiva para γ -H2AX. Algunas secciones fueron visualizadas mediante microscopía láser confocal con un microscopio TCS-SP5 (Leica) o A1R (Nikon

GmbH) en el servicio de microscopía del centro CIC de la UGR. Finalmente, las imágenes sufrieron ajustes de brillo y contraste mediante el software Adobe Photoshop.

En criosecciones de explantes de retina P12 se llevó a cabo el marcaje con TUNEL tal y como se ha descrito anteriormente, en combinación con el inmunomarcaje para la detección de caspasa 3 activa. Tras el marcaje con TUNEL, se procedía al bloqueo de los sitios inespecíficos mediante la incubación de las secciones NGS (Sigma, ref. G9023) al 10% en PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se procedía a la incubación con el anticuerpo primario frente a caspasa 3 activa (RnDSystems, ref. AF835) a una dilución 1:50 durante toda la noche a 4°C en una solución de PBS-T con suero NGS 5% (PBS-T-NGS). Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaban tres lavados en PBS-T en agitación y se procedía a la incubación con el anticuerpo secundario (*Alexa fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG*, Life Technologies, ref. A11012) a una dilución 1:800 en PBS-T-NGS durante dos horas a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, se procedió a lavar las secciones con PBS-T tres veces, seguido de tres lavados en PBS. Finalmente, los núcleos celulares eran contrastados mediante la tinción de las secciones con DAPI (1 mg/ml; Sigma, ref. D9542) a una dilución 1:1000 durante 5 minutos. Tras la tinción nuclear se lavaron con PBS y se montaron con el medio de montaje (*Fluoromount-G*[®], SouthernBiotech, ref. 0100-01; *FluorSave™ Reagent*, Calbiochem, ref: 345789). Secciones sin marcaje con TUNEL y el anticuerpo primario fueron usadas como controles negativos. Las secciones fueron visualizadas mediante microscopía láser confocal con un microscopio TCS-SP5 (Leica) en el servicio de microscopía del centro CIC de la UGR con un objetivo 63x (magnificación 630x) y los núcleos TUNEL positivos se cuantificaron en tres campos diferentes por sección (tres secciones por explante de retina y tres explantes por condición). Los resultados se expresaron como el número de células positivas para γ -H2AX por sección. Finalmente, las imágenes sufrieron ajustes de brillo y contraste mediante el software Adobe Photoshop.

3.21. Inmunocitoquímica de cultivos celulares

La actividad de PARP-1 en cultivos celulares se analizó mediante la detección por inmunocitoquímica del polímero PAR. Para ello, se sembraron 80000 células de las líneas celulares 661W y WRL68 sobre cubreobjetos depositados en placas de 6 pocillos y se mantuvieron 24 horas a 37°C en una atmósfera saturada de humedad y 5% de CO₂. Posteriormente, se llevó a cabo el tratamiento de las células con H₂O₂ y la incubación posterior en medio fresco. Tras varios lavados en PBS frío, las células se fijaron en una mezcla de metanol-acetona en relación 1:1 durante 10 minutos a 4°C y se lavaron con PBS-T. Seguidamente, se incubaron las muestras con el anticuerpo primario anti-PAR (Enzo Life Technologies, ref. ALX-804-220-R100) a una dilución 1:400 durante toda la noche a 4°C en PBS-T-NGS. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se lavaron con PBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (*Alexa fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG*, Life Technologies, ref. A11001) durante dos horas en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, los núcleos celulares eran contrastados con Hoechst 33342 (10 mg/ml; Sigma, ref. B2261) a una dilución 1:1000 durante 2 minutos. Tras la tinción nuclear se lavaron con PBS y se montaron con el medio de montaje *Fluoromount-G*[®] (SouthernBiotech, ref. 0100-01). Secciones sin marcaje con el anticuerpo primario fueron usadas como controles negativos. Finalmente, se conservaron a 4°C hasta su visualización.

La inmunocitoquímica anti-PAR se visualizó mediante un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiophot (Zeiss) mediante el objetivo de inmersión 40x (magnificación 400x). A continuación, se realizó un recuento de células con núcleos positivos para PAR, cuantificándose 200 células por condición experimental, obteniéndose un promedio de células PAR positivas. Esto se realizó en tres experimentos independientes. Las imágenes sufrieron ajustes de brillo y contraste mediante el programa Adobe Photoshop.

3.22. Análisis cuantitativo del fosfoproteoma celular

El procesamiento de las muestras y parte del análisis bioinformático se realizó durante las estancias de investigación predoctorales en el *Barts Cancer Institute (Queen Mary University of London, Londres)*. Los protocolos empleados que se detallan a continuación han sido previamente descritos por el Dr. Cutillas y colaboradores (Casado et al., 2013; Casado et al., 2018).

3.22.1. Extracción y digestión proteica

La línea celular retiniana, 661W, y hepática, WRL68, fueron cultivadas en discos de cultivo de 150 cm² de superficie a una densidad inicial de 7,5 millones de células por disco. Tras el tratamiento con H₂O₂ y su posterior incubación en medio fresco, se retiró el medio y las células se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (DPBS, Gibco, ref. 14190-094) frío suplementado con inhibidores de fosfatasas (1 mM de Na₃VO₄ y 1 mM de NaF). Se eliminó los restos de DPBS, se añadió 750 µl de una solución fría 8M Urea en tampón HEPES pH 8.0 suplementado con inhibidores de fosfatasas (1 mM de Na₃VO₄, 1 mM de NaF, 1 mM de β-glicerol-fosfato y 2.5 mM de Na₄P₂O₇) (tampón de lisis) y se rasparon las células, todo ello en frío. Se recogió el raspado y se transfirió a tubos de baja unión a proteínas de 2 ml (LB, *Protein LoBind Tubes*, Eppendorf). Las muestras se homogeneizaron mediante 30 ciclos de sonicación a máxima intensidad a 4°C (30 segundos encendido y 30 segundos en reposo por ciclo) en un sonicador (*Bioruptor® Pico*, Diagenode), y se centrifugaron a 16000g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos LB, se congelaron durante 15 minutos en hielo seco y se conservaron a -80°C hasta la cuantificación proteica y procesamiento de las muestras. Este procedimiento se repitió hasta tener un total de 4 ensayos independientes.

En los ensayos de silenciamiento de la expresión de PARP-1 realizados en placas de 6 pocillos, tras el tratamiento con H₂O₂, y posterior incubación en medio fresco, se llevó a cabo la lisis celular con 100 µl del tampón de lisis

mediante raspado de las células en frío tras dos lavados en DPBS frío suplementado con inhibidores de fosfatasas, tal y como se ha indicado anteriormente. Las muestras se homogeneizaron en un sonicador (*Bioruptor® Pico*, Diogenode) mediante 30 ciclos de sonicación a máxima intensidad a 4°C (30 segundos ON y 30 segundos OFF por ciclo), y se centrifugaron a 16000g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos LB, procediendo a la cuantificación proteica.

La concentración proteica de los extractos obtenidos se determinó mediante el método colorimétrico basado en ácido bicinconínico (BCA, ThermoFisher, ref. 23225). Para ello, se añadió 2 µl del extracto proteico a 200 µl de solución de BCA y se procedió a la lectura de la densidad óptica (D.O) correspondiente a 562 nm mediante un espectrofotómetro (*Microplate Readers FLUOstar® Omega*, BMG LABTECH). Para obtener las concentraciones de proteínas, se realizó una recta patrón de cantidades crecientes de albúmina, desde 0,25 hasta 10 µg.

Una vez determinada la concentración proteica se continuó con el procesamiento de las muestras para su análisis por espectrometría de masas. Para los extractos proteicos de la línea celular WRL68 y 661W, se tomaron 500 µg de proteína y se completó con tampón de lisis para tener el mismo volumen final en todas las muestras. A continuación, se realizó una etapa de reducción de los residuos de cisteína con 10 mM de DTT durante 1 hora a 25°C en agitación y oscuridad en un agitador con control de temperatura (*Thermo Shaker*, Hangzhou Allsheng Instruments Ltd.). Tras la etapa de reducción, se realizó una etapa de alquilación de los residuos de cisteína mediante la incubación de las muestras con 16.6 mM de Iodoacetamida (IAM) durante 30 minutos a 25°C en agitación y oscuridad. Finalmente, se procedió a la digestión proteica mediante el empleo de tripsina unida a perlas de agarosa (*TLCK-trypsin*, Thermo-Fisher Scientific, ref. #20230)). Previamente a la adición de la tripsina, las muestras se diluyeron con 20 mM de HEPES pH 8.0 hasta alcanzar una concentración final de 2 M de Urea. Asimismo, las perlas de tripsina se lavaron tres veces con 20 mM HEPES pH 8.0 mediante centrifugaciones sucesivas a 2000g durante 5 minutos a 4°C. Las muestras previamente diluidas

con HEPES se incubaron con 100 µl de perlas de tripsina toda la noche a 37°C en agitación y oscuridad.

En los ensayos de silenciamiento de la expresión de PARP-1, se tomaron 80 µg de proteína de cada condición y se llevó a cabo el mismo procedimiento de reducción, alquilación y digestión descrito.

3.22.2. Enriquecimiento de fosfopéptidos mediante TiO₂

Tras la digestión proteica de las muestras, se procedió a enriquecer los fosfopéptidos presentes en las muestras. Para ello, primero fue necesaria la eliminación de las perlas de tripsina de las muestras mediante su centrifugación a 2000g 5 minutos a 4°C. A continuación, se llevó a cabo una etapa de eliminación de sales que pudieran interferir con la etapa de enriquecimiento mediante un sistema de extracción en fase sólida (SPE). Para ello se usaron cartuchos OASIS-HLB de 10 mg (*Oasis® HLB 1cc (10 mg) Extraction Cartridges*, Waters, ref. 186000383) que fueron colocados en un colector de vacío con una presión de 5 mmHg. Los cartuchos se activaron mediante el paso de 1 ml de acetonitrilo 100% (ACN), se equilibraron con 1 ml y 0.5 ml de la solución de lavado compuesta por 1% de ACN y 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) (solución de lavado A). A continuación, se cargaron las muestras en los cartuchos utilizando un flujo lento en el colector de vacío. Tras el cargado de las muestras, se lavaron los cartuchos con 1 ml de la solución de lavado A y se purgaron los cartuchos en su totalidad. Tras esto, se produjo la elución de las muestras con 500 µl de la solución de elución compuesta por 1 M de ácido glicólico, 50% de ACN y 5% de TFA (solución de elución A).

Tras la etapa de eliminación de sales, se procedió a la etapa de enriquecimiento de fosfopéptidos basada en TiO₂. El TiO₂ posee una alta afinidad por los grupos fosfato presente en los péptidos fosforilados, quedando estos adheridos al TiO₂ (Thingholm y Larsen, 2016). Se ajustaron todos los volúmenes de las muestras al mismo volumen mediante la adición de una solución ácida compuesta por 1 M de ácido glicólico, 80% de ACN y 5% de

TFA (solución de enriquecimiento 1). A continuación, se añadieron 50 µl de una solución de 50% de perlas de TiO₂ (*Titansphere® TiO₂ 10 µm*, GL Sciences Inc., ref. 5020-75010) en 1% de TFA y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente mediante rotación. Tras el periodo de incubación, las muestras se centrifugaron 30 segundos a 1500g. Para cada muestra, el 80% del sobrenadante obtenido se transfirió a nuevos tubos LB y se mantuvo en hielo hasta su uso. El 20% del sobrenadante restante se usó para mezclar las perlas de TiO₂, que contenían los fosfopéptidos adheridos, y se dispuso en puntas de pipeta con filtro (*Top Tips with filter EMPTY 10-200 µL*, Glygen, ref. TF2EMT.96) colocadas sobre tubos de 2 ml. Estas puntas se lavaron previamente mediante el paso de 100 µl de ACN 100%, y su posterior centrifugación a 1500g durante 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se cargaron las perlas de TiO₂ y se empacaron mediante su centrifugación a 1500g durante 3 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se llevó a cabo el paso del sobrenadante reservado en hielo mediante centrifugaciones sucesivas a 1500g durante 3 minutos. Posteriormente, se lavaron con 100 µl de la solución de enriquecimiento 1 y se centrifugaron a 1500g durante 3 minutos. Seguidamente, las perlas empacadas se lavaron con 100 µl de una solución de acetato amónico (100 mM de acetato amónico en 25% de ACN) y dos veces con 100 µl de una solución de 10% de ACN mediante centrifugaciones a 1500g durante 3 minutos. Finalmente, se llevó a cabo la elución de los fosfopéptidos adheridos al TiO₂. Para ello, se cambiaron los tubos Eppendorf de 2 ml donde se encontraban las puntas por tubos LB de 2 ml, y se llevó a cabo la elución mediante el paso de 50 µl de la solución de elución compuesta por NH₄OH al 5% en 10% de ACN mediante centrifugación a 1500g durante 3 minutos. Este paso se repitió hasta un total de cuatro veces, obteniéndose un volumen final de 200 µl. Tras esto, para eliminar cualquier resto de TiO₂, se centrifugaron a 16000g durante 2 minutos y se transfirieron a tubos LB nuevos. Las muestras se congelaron en hielo seco durante 15 minutos, y se secaron toda la noche en un concentrador al vacío rotacional (*Rotational-Vacuum-Concentrator RVC 2-25*, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH). Tras su secado, se conservaron a -80°C hasta su análisis por espectrometría de masas.

Las muestras procedentes tras el silenciamiento de PARP-1, dada la poca cantidad de proteína usada durante las etapas de digestión sufrieron un proceso de eliminación de sales con algunas modificaciones para reducir la pérdida de proteína durante las etapas de lavado y elución. El método se basó también en un sistema de extracción en fase sólida (SPE), pero en vez de realizarse en cartuchos OASIS-HLB de 10 mg, se realizó en columnas de C18 y carbón empaquetadas en puntas (*TopTip with Filter C18 + Carbon 10-200* μ l, Glygen, ref. TF2MC18.96), tal y como se describe en (Arnandis et al., 2018), con algunas modificaciones. Las puntas se situaron sobre tubos Eppendorf de 2 ml, se activaron con 200 μ l de una solución 70% ACN y 0.1% de TFA, y se centrifugaron a 1500g durante 3 minutos. Este paso se repitió hasta un total de dos veces. A continuación, se lavaron dos veces con 200 μ l de la solución de lavado A mediante centrifugaciones a 1500g durante 3 minutos. Posteriormente, se procedió al cargado de las muestras mediante el paso de 300 μ l de muestra y su centrifugación a 1500g durante 3 minutos. Este paso se repitió hasta agotar el volumen de muestra. Tras el cargado de las muestras, se lavaron dos veces con la solución de lavado A y se eluyeron con 50 μ l de la solución de elución A mediante centrifugaciones a 1500g durante 3 minutos. El paso de elución se repitió hasta un total de cuatro veces y se ajustaron todos los volúmenes de las muestras al mismo volumen mediante la adición de la solución de enriquecimiento 1. Finalmente, se procedió al enriquecimiento con TiO_2 tal y como se ha descrito previamente.

3.22.3. Análisis mediante espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

Las muestras se reconstituyeron en 13 μ l de una mezcla de enolasas (20 fmol/ μ l) en 3% de ACN y 0.1% de TFA (tampón de reconstitución), se incubaron en hielo durante 45 minutos y se centrifugaron a 16000g durante 5 minutos a 4°C para eliminar cualquier precipitado. Las muestras se inyectaron 2 veces (5 μ l de muestra/duplicado técnico) en un sistema de espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida (LC-MS/MS), compuesto por un sistema de cromatografía líquida de Ultra Alta resolución

(UPLC) Dionex UltiMate 3000 RSLC acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap Q-Exactive Plus mass (Thermo Fisher Scientific) mediante un sistema ionización por nanoelectrospray (*Easy Spray*, Thermo Fisher Scientific). El sistema UPLC utilizó como fases móviles una solución 0.1% de ácido fórmico (solución A), y una solución 99.9% de ACN y 0.1% de ácido fórmico (solución B). Los fosfopéptidos se cargaron inicialmente en una columna de atrapamiento (LC Acclaim™ PepMap™ 100 C18 LC 300µm x 5mm, Thermo Scientific, ref. 160454) durante 3 minutos a un flujo de 12 µl/min, y fueron separados posteriormente en una columna analítica (*Easy Spray RSLC C18 2µm 50 cm x 75 µm*, Thermo Scientific, ref. ES803). Para la separación de los fosfopéptidos, se utilizó un gradiente del 3 a 28% de la solución B durante 90 minutos a un flujo de 250 nL/min.

La MS permite la identificación y cuantificación de moléculas, en este caso péptidos, basada en su relación masa/carga (m/z) tras su ionización (la MS necesita que las moléculas presenten carga eléctrica) (Griffiths et al., 2001). En un MS/MS, tras la ionización de la molécula completa (ion molecular), la muestra pasa por un primer analizador de masa (MS1), donde se registra la masa (m/z) de los iones moleculares. A continuación, las moléculas cargadas pasan de forma individual a una cámara de ruptura o fragmentación (del inglés *collision cell*), donde sufren un proceso de fragmentación por colisión con un gas inerte, generándose iones de fragmentación. Estos iones de fragmentación pasan a un segundo analizador (MS2), donde se registra su masa; al entrar los iones moleculares de forma individual en la cámara de colisión y en el MS2, pueden asignarse los iones de fragmentación generados en el MS2 al ión molecular que los generó y fue registrado previamente en el análisis de MS1 (Chace y Kalas, 2005; Griffiths et al., 2001). Finalmente, los resultados se muestran en forma de espectro de masas. En cada ciclo de análisis en el espectrómetro se realizó un barrido en el MS1 con un rango de 375-1500 m/z . Para el análisis por el MS2, se realizó una adquisición dependiente de datos en la que se seleccionaron los 15 iones más intensos con carga (z) superior a 1 y se fragmentaron mediante el método de disociación de alta energía (HCD, del inglés *Higher energy Collisional Dissociation*). Se

aplicó una lista de exclusión de 30 segundos para los iones previamente fragmentados.

Para las muestras procedentes del silenciamiento de PARP-1 se utilizó el mismo protocolo y sistema, pero dada la poca cantidad de proteína procesada las muestras se reconstituyeron en 7 μ l de tampón de reconstitución y se inyectaron una sola vez (5 μ l/muestra) en el sistema LC-MS/MS, tal y como se ha descrito previamente.

3.22.4. Identificación y cuantificación de fosfopéptidos

La identificación de los iones peptídicos detectados en el sistema LC-MS/MS se automatizó utilizando el sistema de búsqueda informático *Mascot Demon* (Perkins et al., 1999). Este paquete informático usó el sistema de depuración *Mascot Distiller* (versión 2.5.0) para la generación de listas de picos (del inglés *peak list*) en las que se detallan las masas experimentales de los iones moleculares y de los iones de fragmentación que se generaron. A continuación, el sistema de búsqueda *Mascot Search Engine* comparó las masas experimentales recogidas en las listas de picos con las masas teóricas recogidas en las bases de datos para asignar identificaciones peptídicas a los iones moleculares. Las búsquedas se realizaron frente a la base de datos de proteínas *Swiss-Prot Mus Musculus* (uniprot_sprot_2014_08.fasta) para la línea celular retiniana 661W, y *Swiss-Prot Human* (uniprot_sprot_2014_08.fasta) para la línea celular hepática WRL68. En ambos casos, se consideraron un máximo de dos puntos de corte perdidos por la tripsina, una tolerancia en la medida de las masas de ± 10 ppm para los análisis de MS1 (MS), y ± 25 mmu para los análisis de MS2 (MS/MS). Se consideró como modificación fija la carbamidometilación de los residuos de cisteína, y como modificaciones variables la oxidación de la metionina, formación de N-piroglutamina a partir de la glutamina, y la fosforilación en residuos de serina, treonina y tirosina.

La cuantificación de los fosfopéptidos identificados en cada una de las condiciones experimentales, se llevó a cabo mediante el uso del programa

bioinformático Pescal (del inglés *Peak Statistic Calculator*) desarrollado por el Dr. Cutillas y colaboradores (Cutillas y Vanhaesebroeck, 2007). Para la determinación de los valores de intensidad de señal de cada fosfopéptido, Pescal extrae el pico cromatográfico para cada ion identificado como fosfopéptido, y calcula el área bajo la curva del pico. Pescal genera estos picos cromatográficos utilizando unas restricciones de tiempo y masa de 2 minutos y 7 ppm respectivamente (Cutillas y Vanhaesebroeck, 2007). En aquellos fosfopéptidos en los que no se detectó señal, se le asignó como intensidad de señal la décima parte de la señal mínima identificada para ese fosfopéptido a lo largo de todas las condiciones estudiadas. A continuación, se calculó para cada replicado biológico la media de las señales de intensidad obtenidas en los correspondientes duplicados técnicos. Finalmente, la señal de intensidad de cada fosfopéptido para una determinada condición, se normalizó con la señal de intensidad total de toda la muestra en esa condición (señal de intensidad normalizada, NSI).

3.22.5. Análisis bioinformático

Los valores de NSI obtenidos se compararon entre las distintas condiciones estudiadas y la significancia se analizó mediante el estadístico t de Student y mediante el análisis de la varianza (ANOVA) complementado con comparaciones múltiples con el método de Tukey. A continuación, se calculó el “*fold change*” como el NSI promedio de los replicados biológicos, respecto al NSI promedio de los replicados biológicos para la condición sin tratar o la correspondiente condición de referencia, expresándose finalmente como logaritmo en base 2.

$$\text{“Fold change”} = \text{Log}_2 \left(\frac{\text{NSI condición experimental B}}{\text{NSI control o condición experimental A}} \right)$$

Posteriormente, se realizó la representación mediante gráficos de volcán (del inglés *volcano plots*), en los cuales cada fosfopéptido está representado por un punto, donde las coordenadas X representan su correspondiente “*fold*

change”, y las coordenadas Y representan el $-\text{Log}_{10}$ de su correspondiente p-valor (p) obtenido en el estadístico t de Student.

En la línea celular retiniana 661W, se llevó a cabo un análisis del motivo de fosforilación más frecuente mediante el algoritmo de cálculo de frecuencias ofrecido por la base de datos PhosphoSitePlus (<http://phosphosite.org>) (Hornbeck et al., 2015). Inicialmente se seleccionaron los fosfopéptidos de interés, se obtuvieron secuencias peptídicas de 11 aminoácidos, tomando como aminoácido central (posición 0) el aminoácido fosforilado, y representando las cinco posiciones aminoacídicas anteriores y posteriores al aminoácido central. Finalmente, el programa generó el motivo de fosforilación mediante una representación de frecuencias de aminoácidos en las posiciones que rodean al aminoácido central.

3.22.6. Análisis de enriquecimiento de sustratos de quinasa (KSEA)

La actividad diferencial de quinasas se estimó mediante un algoritmo diseñado por el Dr. Cutillas y colaboradores (Casado et al., 2013), denominado Análisis de enriquecimiento de sustratos de quinasas (KSEA, del inglés *Kinase-Substrate Enrichment Analysis*). En este análisis, se estudia la actividad de cada quinasa en función del nivel relativo de fosforilación de sus sustratos (hiperfosforilación o desfosforilación, si el nivel de fosforilación es mayor o menor que en la condición de referencia, respectivamente). Este algoritmo usa como sustratos indicativos de la actividad de una quinasa, aquellos sustratos que han sido descritos para cada quinasa, y que se encuentran recogidos en la base de datos “PhosphoSite”. Mediante este algoritmo, se obtiene un valor de enriquecimiento para cada quinasa que representa el grado de activación de la quinasa entre las condiciones comparadas, y que se ha calculado teniendo en cuenta el “*fold change*” promedio de todos los fosfopéptidos identificados como sustratos para una quinasa y el “*fold change*” promedio de todos los fosfopéptidos no identificados en la muestra (Casado et al., 2013). Tanto los valores de enriquecimiento obtenidos (denominado “*KSEA score*”) como la significancia estadística de dicho enriquecimiento fueron calculados utilizando

la herramienta KSEA (Casado et al., 2013). Posteriormente, se seleccionaron aquellas quinasas cuyo “KSEA score” se hubiera calculado con al menos cinco sustratos en las muestras de estudio.

En cuanto a la interpretación de los resultados, un valor negativo de enriquecimiento, indica un menor grado de activación de la quinasa de interés, debido a que sus sustratos se encuentran mayoritariamente desfosforilados en la comparación de estudio respecto a la comparación de referencia (ejemplo tratamiento respecto a control). Un valor positivo de enriquecimiento, indica un mayor grado de activación de la quinasa, debido a que los sustratos se encuentran mayoritariamente hiperfosforilados (Casado et al., 2013).

3.22.7. Análisis de ontología de genes

Los datos de fosfoproteómica obtenidos fueron sometidos a un análisis de ontología de genes (GO, del inglés *Gene Ontology*), para identificar relaciones biológicas entre los fosfopéptidos diferencialmente afectados entre varias condiciones. El análisis de GO se realizó tanto para la línea retiniana 661W como para la línea hepática WRL68.

- Análisis GO en la línea celular 661W. Para la realización del análisis GO se usaron dos herramientas bioinformáticas, el sistema online de análisis de GO, *DAVID bioinformatics resources* (versión 6.8) (Huang da et al., 2009), y la herramienta de análisis GO, ClueGO, ejecutada en la herramienta bioinformática Cytoscape (Bindea et al., 2009; Shannon et al., 2003). Se analizaron aquellos fosfopéptidos cuyos cambios fueran significativos ($p < 0.05$) y mayores de 1 (“*fold change*” ≥ 1) en las condiciones tratadas con H₂O₂ o con H₂O₂ + PJ34 respecto a la condición sin tratar (control). Una vez obtenida las listas de fosfopéptidos de interés, se obtuvieron los identificadores proteicos de cada fosfopéptido (*Uniprot ID*), proporcionados por el sistema de búsqueda *Mascot*, y se usaron para el análisis de ontología de genes con la herramienta DAVID. Los genes correspondientes a cada proteína se agruparon funcionalmente en ontologías pertenecientes a procesos biológicos. Para el

agrupamiento, se consideraron grupos con un número mínimo de 2 genes y como límite máximo de significancia 0.1 (p-valor [p] del contraste de hipótesis modificado de Fisher, tal y como lo ejecuta la herramienta de GO, *EASE score*). Una vez obtenidos los grupos funcionales se seleccionaron aquellos más representativos, y cuyo agrupamiento fuese significativo ($p < 0.05$).

Para un análisis más exhaustivo, se seleccionaron aquellos fosfopéptidos comunes que presentaban un cambio de *fold change* significativo ($p < 0.05$) en ambos tratamientos (H_2O_2 *versus* control y H_2O_2 + PJ34 *versus* control), y se analizó la ontología de genes mediante la herramienta ClueGO. El umbral de significancia se estableció en un $p < 0.05$, obtenido tras realizar un test estadístico de distribución hiper-geométrica de dos colas mediante la corrección por contraste múltiple de Bonferroni. Se estableció un máximo y mínimo de niveles de 3 y 8, con un mínimo de 3 genes o un 4% de genes por cada término analizado. Asimismo, para reducir la redundancia en los términos de GO, se usó la fusión de términos GO y se estableció con un límite de Kappa de 0.3. Finalmente, los términos de GO correspondientes a procesos biológicos se agruparon en familias funcionales de términos de GO usando el valor de Kappa y el grado significancia. Para el agrupamiento funcional se estableció como tamaño mínimo de 1 término por familia y un 50% de combinación por grupo.

- Análisis GO en la línea celular WRL68. Para la realización del análisis GO se usó la herramienta bioinformática de análisis *DAVID bioinformatics resources* (Huang da et al., 2009) (versión 6.8), y se consideraron aquellos fosfopéptidos cuyos cambios fueran significativos ($p < 0.05$), mayores de 1 ("*fold change*" ≥ 1) y menores de -1 ("*fold change*" ≤ -1) en las condiciones tratadas con H_2O_2 respecto a la correspondiente condición sin tratar (control). Una vez obtenidas las listas de fosfopéptidos de interés, se obtuvieron los identificadores proteicos para cada uno de ellos (*Uniprot ID*) y se usaron para el análisis de ontología de genes con la herramienta DAVID. Los genes correspondientes a cada proteína se agruparon funcionalmente en ontologías pertenecientes a procesos biológicos. Para el agrupamiento se utilizó un valor mínimo de 2 genes por grupo, y como límite máximo de significancia 0.05

(*EASE score*: 0.05). A continuación, se seleccionaron aquellos términos significativos de GO ($p < 0.05$) con mayor número de genes asociados.

3.23. Análisis estadístico

La evaluación estadística de los datos experimentales se llevó a cabo mediante el análisis estadístico t de Student (independiente para el análisis de las líneas celulares y pareado o dependiente para el análisis de los explantes de retina), mediante el análisis de la varianza (ANOVA) complementado con comparaciones múltiples con el método de Tukey o mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon, usando el sistema de análisis estadístico IBM-SPSS Statistics 19. Se consideraron que había diferencias significativas en las condiciones experimentales cuando presentaban un p-valor menor de 0.05 ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1. Análisis de la actividad de PARP-1 y de su relación con el daño en el ADN y la muerte celular durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón

4.1.1. Durante el desarrollo postnatal de la retina se producen daños de tipo oxidativo

Durante el desarrollo neural suelen generarse ROS, especialmente durante los procesos de diferenciación y maduración neuronal (Tsatmali et al., 2005; Tsatmali et al., 2006). En nuestro estudio, se investigó si durante el desarrollo postnatal de la retina se generan ROS que puedan alterar las estructuras celulares. Para ello, se midió la presencia de una serie de modificaciones inducidas por ROS en ciertos componentes celulares, concretamente en el ADN y en proteínas. También se evaluó los niveles de expresión de la enzima antioxidante manganeso superóxido dismutasa (MnSOD).

En primer lugar, el análisis mediante ELISA de la presencia de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), un marcador de daño oxidativo en el ADN, relacionado con la generación de SSBs, mostró que los niveles de 8-OHdG en el ADN se mantenían bajos durante la primera semana de desarrollo postnatal de la retina (entre P0 y P7), pero que a partir de P14 se incrementaban significativamente y progresivamente hasta la fase adulta (P60; Figura 14A). La presencia de este tipo de daño también se evaluó mediante la detección de proteínas modificadas con 3-nitrotirosina (3-NT), indicador del nivel de severidad del daño oxidativo (Buddi et al., 2002). El análisis por *Western Blot* de la cantidad de proteínas con 3-NT mostró un incremento de esta modificación durante el desarrollo postnatal de la retina, al igual que sucedía con la presencia de 8-OHdG (Figura 14B, C). Estos resultados muestran que durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón se producen daños oxidativos en el ADN y en proteínas derivados de la presencia de ROS, y que estos daños aumentan progresivamente con el desarrollo de esta estructura hasta la etapa adulta, pero manteniéndose bajos y apenas detectables durante la primera semana.

Por otro lado, la cuantificación mediante *Western Blot* de la expresión de la enzima MnSOD, relacionada con la eliminación de ROS y la longevidad de la retina (Kanwar et al., 2007), mostró un incremento progresivo a lo largo del desarrollo (Figura 14D, E), lo que parece indicar que el incremento del daño oxidativo descrito anteriormente e inducido presumiblemente por ROS potencia la expresión de este enzima a lo largo del desarrollo.

4.1.2. El incremento del daño oxidativo coincide con el periodo de disminución de la actividad de PARP-1

Tras confirmar la existencia de daños oxidativos durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón que afectaba entre otros componentes al ADN, se quiso evaluar la activación de la enzima PARP-1, implicada en la reparación de este tipo de daño. La cuantificación mediante ELISA de la actividad de PARP-1 indicó un incremento en su actividad durante la primera semana de desarrollo postnatal, alcanzándose la máxima actividad en el día 7 de desarrollo postnatal (P7) (Figura 15A). Sin embargo, a partir de este día se observó un descenso significativo en la actividad de PARP-1 (Figura 15A). Asimismo, la detección mediante *Western Blot* de proteínas poli-ADP-ribosiladas mostró grandes cantidades del polímero PAR (indicativo del grado de activación de la enzima PARP-1) en los extractos proteicos correspondientes a las retinas de P7, observándose una destacable reducción del polímero en los días de desarrollo posteriores (Figura 15B).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos respecto al daño oxidativo presente en la retina a lo largo de su desarrollo postnatal y los anteriores resultados sobre la activación de PARP-1, se puede sugerir que esta enzima podría estar implicada en mantener bajos los niveles de daño oxidativo en el ADN durante la primera semana de desarrollo postnatal de la retina (entre P0 y P7) dada la alta actividad que presenta PARP-1 en este periodo; sin embargo, cuando la actividad de PARP-1 desciende a partir de la segunda semana de desarrollo, la eficiencia en la reparación del ADN también se ve reducida, incrementándose el daño oxidativo.

4.1.3. En la retina postnatal también se producen daños en el ADN de doble cadena que inducen muerte celular

Durante el desarrollo y diferenciación de los tejidos se pueden generar roturas en el ADN del tipo DSBs (Jackson, 2002; Vilenchik y Knudson, 2003), en concreto, durante en el proceso de reorganización de la cromatina que tiene lugar durante la diferenciación celular (Falk et al., 2010; Falk et al., 2014). La presencia de DSBs se analizó durante el desarrollo de la retina postnatal mediante la detección de la forma fosforilada de la histona H2AX, denominada γ -H2AX, que sufre fosforilación en el residuo serina 139 (Podhorecka et al., 2010). γ -H2AX es un tipo de histona con un papel importante en las etapas tempranas de la respuesta al daño en el ADN de doble cadena; su fosforilación permite que se produzcan cambios en la organización de la cromatina que facilita el acceso de la maquinaria de reparación (Mah et al., 2010; Podhorecka et al., 2010). Dada su implicación y acumulación en los sitios de lesión, γ -H2AX se usa como marcador de este tipo de daño (Mah et al., 2010; Podhorecka et al., 2010).

El análisis mediante *Western Blot* de los niveles de γ -H2AX en la retina postnatal indicó que la histona fosforilada sufre un incremento en su expresión desde el estadio P0 a P14; posteriormente se produce un descenso en sus niveles hasta la fase adulta (P60) (Figura 16A). Un estudio más detallado sobre la expresión de γ -H2AX durante la segunda semana de desarrollo postnatal (periodo donde se produce la diferenciación de la retina), mostró un aumento paulatino de este marcador conforme la retina maduraba, alcanzándose la mayor expresión de la forma fosforilada de esta histona en P14 (Figura 16B), coincidiendo con el periodo donde PARP-1 muestra una baja actividad (Figura 15A). Estos resultados muestran cómo los mayores niveles de DSBs (reflejados mediante la expresión de γ -H2AX) durante el desarrollo de la retina postnatal coinciden con el periodo donde se inicia una bajada en la actividad de PARP-1 (estadio P14); ello sugiere que la baja actividad de PARP-1 en este estadio podría aumentar la presencia de DSBs originados durante el proceso de maduración de la retina al no ser reparados eficientemente por PARP-1.

Además, se analizó mediante inmunofluorescencia la distribución de γ -H2AX en la retina postnatal a fin de localizar en qué capa de la retina se estaba produciendo el daño de doble cadena. Se observó que la mayor parte de este inmunomarcaje se localizaba en la capa nuclear interna (CNI) y en la capa de células ganglionares (CCG) de la retina (Figura 17A), observándose un mayor marcaje en los estadios P7 y P14 con respecto al estadio P21. Asimismo, al igual que los experimentos de *Western Blot*, la inmunocitoquímica mostró que P14 era el estadio con mayor expresión de γ -H2AX (Figura 17A, B); de hecho, P14 mostró 1.9 y 5.2 veces más marcaje que los estadios P7 y P21, respectivamente (Figura 17B).

Por otro lado, el grupo de investigación donde se ha desarrollado esta Tesis describieron en 2011 un incremento de los niveles de muerte celular durante la primera semana de desarrollo postnatal de la retina de ratón, alcanzándose los valores más altos en el estadio P7, los cuales descendían notablemente a partir de la segunda de semana de desarrollo (Martin-Oliva et al., 2011). Por ello, en esta Tesis se quiso evaluar si el marcaje descrito para γ -H2AX (como indicador de daño en el ADN) se correlacionaba con los niveles de muerte detectados durante la primera semana de desarrollo postnatal; para ello se analizó si los núcleos positivos para γ -H2AX mostraban signos de picnosis, caracterizados por una retracción del núcleo y una alta condensación de la cromatina, propios de las células apoptóticas. En P7, una gran parte de los núcleos de la CNI presentaban una distribución normal de la cromatina (Figura 18A), sin embargo, algunos de ellos positivos para γ -H2AX mostraban claros signos de picnosis (Figura 18B-D); además, también se observaron núcleos picnóticos que no eran positivos para el marcaje γ -H2AX (Figura 18D). En cambio, en el estadio P14 los núcleos que presentaban marcaje positivo para γ -H2AX correspondían mayoritariamente a núcleos con apariencia normal, sin condensación de la cromatina, tanto en la CNI como en la CCG (Figura 19A, B), lo que indica que en este estadio el marcaje de γ -H2AX estaría relacionado con procesos en curso para la reparación del daño por una vía independiente de PARP-1 y no con eventos de inducción de muerte celular tras daños severos en el ADN.

Para analizar de forma más específica la relación entre el daño en el ADN, detectado mediante la presencia de γ -H2AX, y los eventos de muerte celular, se realizaron en secciones histológicas de los estadios P7 y P14 dobles marcajes γ -H2AX/TUNEL para marcar de manera específica los núcleos apoptóticos. Por un lado, el marcaje con TUNEL permitió concluir que P7 presentaba una mayor tasa de núcleos apoptóticos en comparación con el estadio P14 (Figura 20), observándose un promedio de 15.9 núcleos TUNEL positivos por cada cinco campos analizados (usando el objetivo de 40x) en el estadio P7, en comparación a los 5.9 núcleos positivos observados como promedio en el estadio P14. Asimismo, se detectó que la distribución de los núcleos TUNEL positivos era diferente en ambos estadios, observándose mayoritariamente en la CNI en P7 y en la CNE en P14 (Figura 20). Además, en P7 el 74% de los núcleos TUNEL positivos presentaban también marcaje para la histona γ -H2AX (Figura 21A, B), mientras que en P14 el porcentaje de núcleos con doble marcaje no superaba el 31.5% (Figura 21C, D). Estos resultados sugieren que un porcentaje importante de las células de la retina en el estadio P7 sufren daños irreparables en el ADN, posiblemente como consecuencia del proceso de diferenciación, y acaban muriendo por un proceso similar a la apoptosis. En este proceso de muerte celular, tal como describió nuestro grupo de investigación en 2011, podría estar participando PARP-1 a través de la activación de AIF (Martin-Oliva et al., 2011), como podría deducirse de la alta activación mostrada por este enzima en P7.

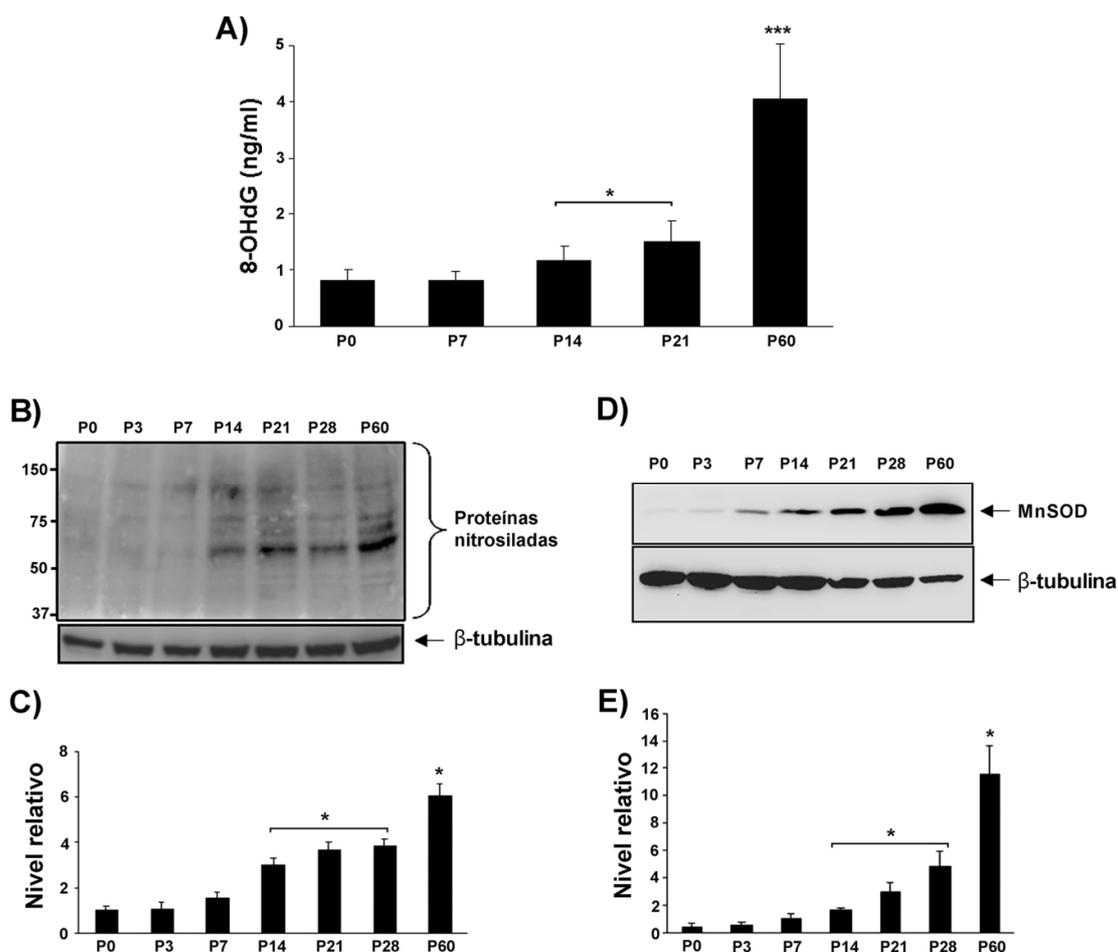


Figura 14. Daño oxidativo en la retina postnatal de ratón. **A)** Ensayo colorimétrico de ELISA para la detección de 8-OHdG, marcador de daño oxidativo en el ADN, durante el desarrollo postnatal de la retina y en el estadio adulto. La cantidad de 8-OHdG (ng/ml) se muestra como la media (\pm error estándar o SEM) del análisis de tres retinas por cada estadio (* $p < 0.05$ entre los valores indicados y con P0 y P7; *** $p < 0.001$ entre P60 y el resto de estadios). **B)** Detección de proteínas modificadas con 3-NT mediante *Western Blot* durante el desarrollo postnatal de la retina y en el estadio adulto. *Western Blot* representativo de tres ensayos independientes. La cantidad de proteínas se normalizó frente a β -tubulina. **C)** Análisis de densitometría de proteínas modificadas con 3-NT a lo largo del desarrollo postnatal de la retina. Las barras muestran la media (\pm SEM) de la cuantificación de cuatro *Western Blots* independientes (* $p < 0.05$ entre los valores indicados y los estadios previos). **D)** Detección de MnSOD mediante *Western Blot* durante el desarrollo postnatal de la retina y en el estadio adulto. *Western Blot* representativo de tres ensayos independientes. La cantidad de proteínas se normalizó frente a β -tubulina. **E)** Análisis de densitometría de los niveles de MnSOD a lo largo del desarrollo postnatal de la retina. Las barras muestran la media (\pm SEM) de la cuantificación de tres *Western Blots* independientes (* $p < 0.05$ entre los valores indicados y los estadios previos).

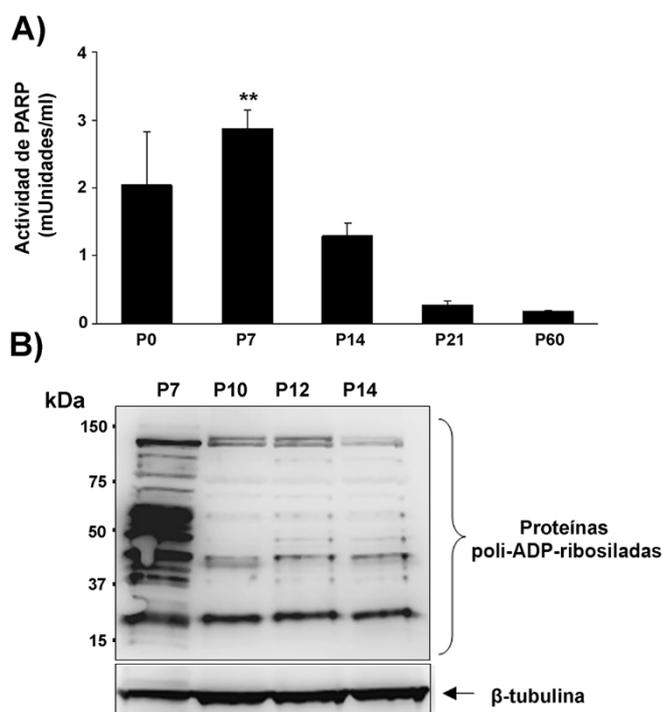


Figura 15. Actividad de PARP-1 durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón. A) Cuantificación de histonas poli-ADP-ribosiladas, medida representativa de la actividad de PARP-1, mediante la técnica ELISA durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón y el estadio adulto. Las barras representan la media (\pm SEM) del análisis de tres retinas por cada estadio (** $p < 0.01$ entre P7 y los siguientes estadios). **B)** *Western Blot* para la detección de proteínas poli-ADP-ribosiladas durante la segunda semana de desarrollo postnatal (P7 a P14), representativo de 3 ensayos independientes. La cantidad de proteínas se normalizó frente a β -tubulina.

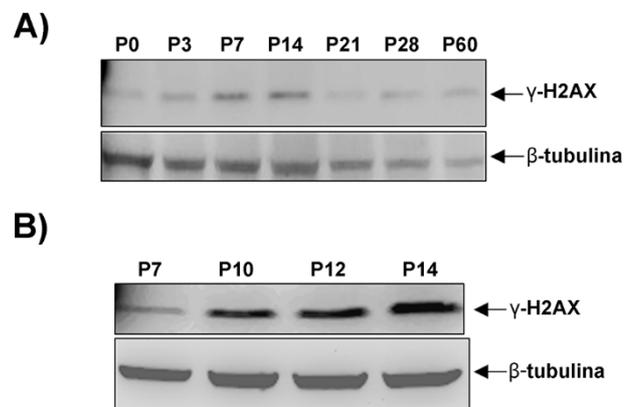


Figura 16. Expresión de γ -H2AX durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón. A) *Western Blot* para la detección de la forma fosforilada de la histona H2AX, γ -H2AX, durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón y en el estadio adulto. *Western Blot* representativo de tres ensayos independientes. **B)** *Western Blot* para la detección de γ -H2AX, durante la segunda semana de desarrollo (P7 a P14), representativo de 3 ensayos independientes. En **A** y **B** la cantidad de proteínas se normalizó frente a β -tubulina.

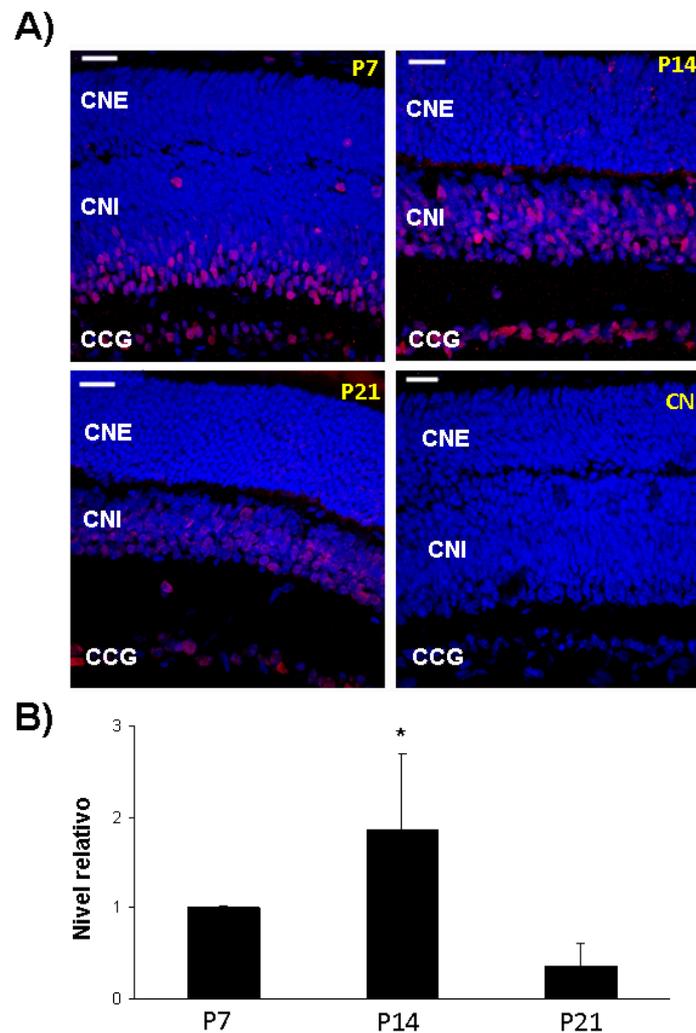


Figura 17. Distribución y cuantificación de γ -H2AX en los estadios P7, P14 y P21. A) Imágenes de microscopía confocal que muestran la inmunodetección de γ -H2AX (rojo) y los núcleos teñidos con Hoechst (azul) en la retina de ratón de los estadios P7, P14 y P21. Imágenes representativas de tres ensayos independientes (barras de escala: 20 μ m; CNI, capa nuclear interna; CNE, capa nuclear externa; CCG, capa de células ganglionares; y CN, control negativo). **B)** Cuantificación mediante densitometría de los niveles de γ -H2AX en los estadios P7, P14 y P21. Las barras muestran la media (\pm SEM) de la cuantificación de tres *Western Blots* independientes (* $p < 0.05$ entre P7 y P21).

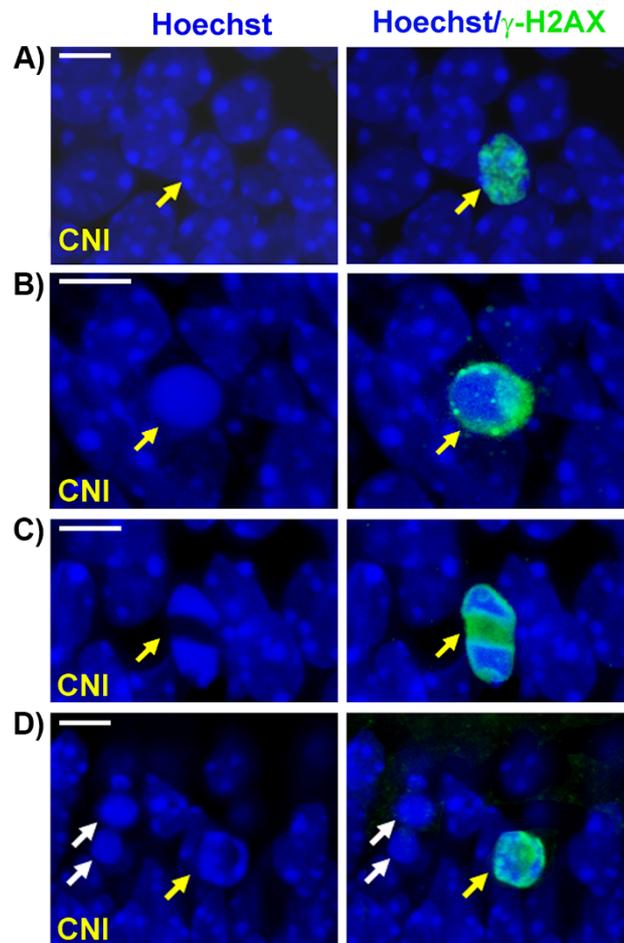


Figura 18. Inmunodetección de γ -H2AX en retinas del estadio P7. Imágenes de microscopía confocal que muestran la inmunodetección de γ -H2AX (verde) y los núcleos teñidos con Hoechst (azul) en la capa nuclear interna (CNI) de retinas P7. Imágenes representativas de tres ensayos independientes. **A)** Se observa núcleos con apariencia normal, positivos para γ -H2AX (flecha de color amarillo), **B)** núcleos picnóticos con marcaje positivo para γ -H2AX (flechas de color amarillo), **C)** núcleos con zonas marcadas de condensación de la cromatina y marcaje positivo para γ -H2AX (flecha de color amarillo) y **D)** núcleos con alta condensación de la cromatina sin marcaje positivo para γ -H2AX (flechas de color blanco), y núcleos de apariencia normal positivos para γ -H2AX (flecha de color amarillo). Imágenes representativas de tres ensayos independientes (barras de escala: 5 μ m).

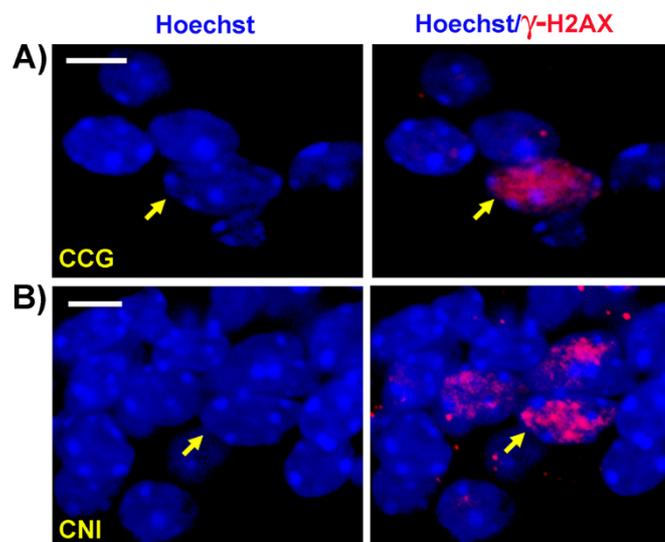


Figura 19. Inmunodetección de γ -H2AX en retinas del estadio P14. Imágenes de microscopía confocal que muestran la inmunodetección de γ -H2AX (rojo) y núcleos de apariencia normal teñidos con Hoechst (azul) en **A)** la capa de células ganglionares (CCG, flecha de color amarillo), y **B)** en la capa nuclear interna (CNI, flecha de color amarillo) de retinas P14. Imágenes representativas de tres ensayos independientes (barras de escala: 2 μ m).

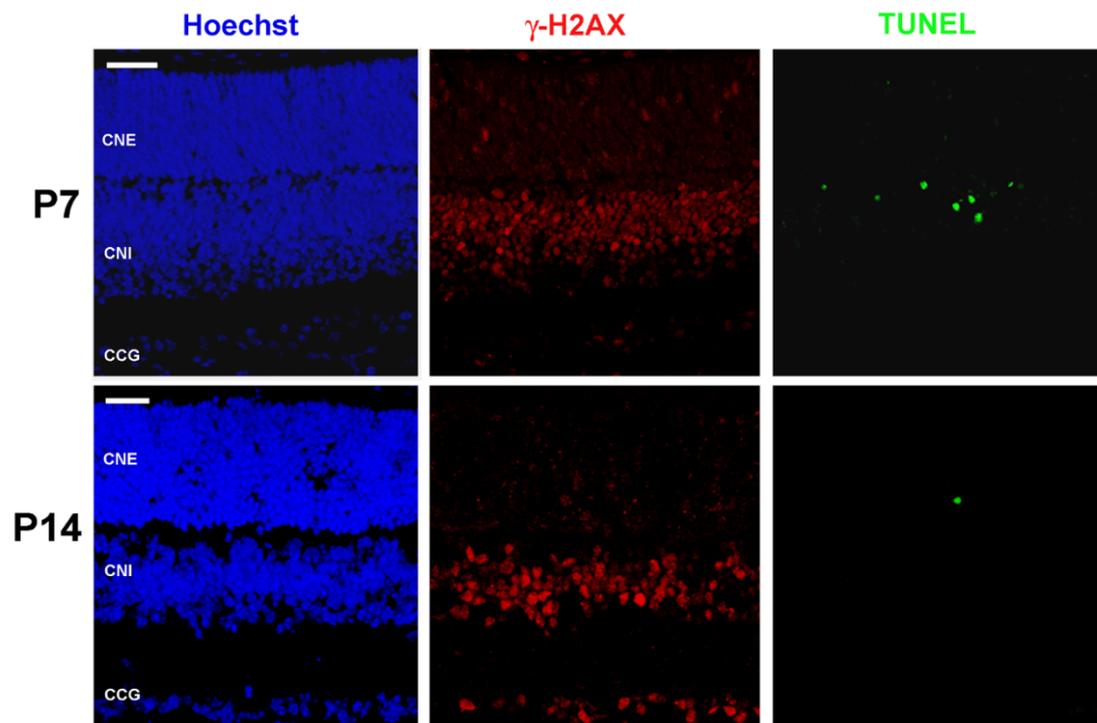


Figura 20. Distribución de γ -H2AX y núcleos TUNEL positivos en retinas P7 y P14. Imágenes de microscopía confocal que muestran la inmunodetección de γ -H2AX (rojo), los núcleos teñidos con Hoechst (azul) y núcleos en proceso de muerte detectados mediante la técnica TUNEL (verde) en retinas P7 y P14. Imágenes representativas de tres ensayos independientes (barras de escala: 30 μ m; CNI, capa nuclear interna; CNE, capa nuclear externa; y CCG, capa de células ganglionares).

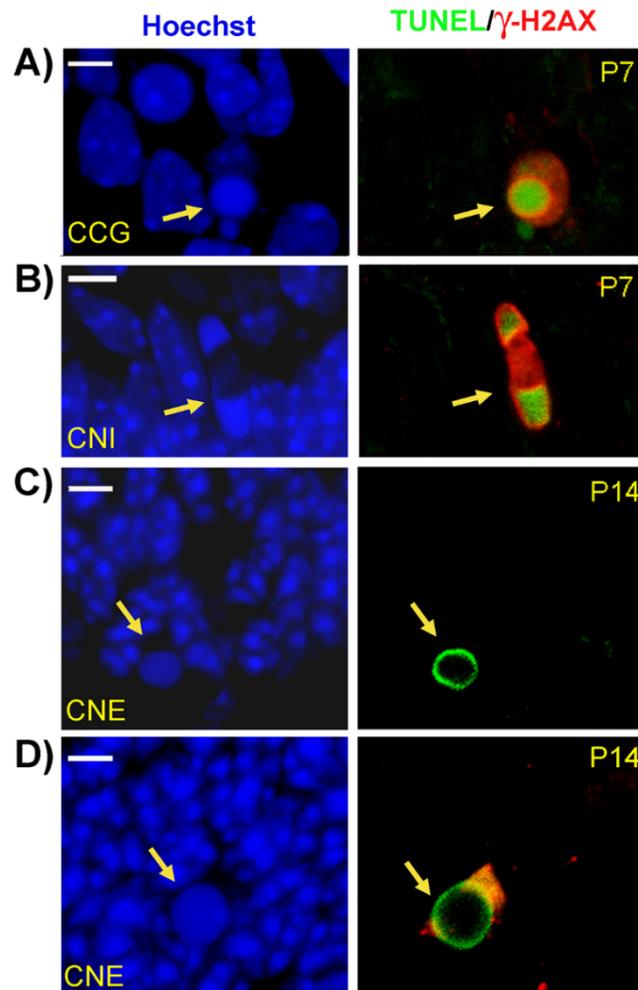


Figura 21. Inmunodetección de γ -H2AX y núcleos TUNEL positivos en retinas P7 y P14. Imágenes de microscopía confocal de áreas seleccionadas en la capa de células ganglionares (CCG) y capa nuclear interna (CNI) de retinas P7 (**A** y **B**), y en la capa nuclear externa (CNE) de retinas P14 (**C** y **D**); con inmunomarcaje para γ -H2AX (rojo), los núcleos teñidos con Hoechst (azul) y la técnica TUNEL (verde). **A**) Núcleo picnótico con marcaje positivo para γ -H2AX y TUNEL (flecha de color amarillo). **B**) Núcleo con zonas condensadas de la cromatina con marcaje positivo para TUNEL y γ -H2AX (flecha de color amarillo). **C**) Núcleo picnótico con marcaje positivo para TUNEL, pero sin marcaje de γ -H2AX (flecha de color amarillo). **D**) Núcleo picnótico con doble marcaje positivo para γ -H2AX y TUNEL (flecha de color amarillo). Imágenes representativas de tres ensayos independientes (magnificación original 600x; barras de escala: **A** y **B**: 5 μ m, **C**: 3 μ m y **D**: 3.5 μ m).

4.2. La inhibición de PARP-1 potencia la muerte celular y la fosforilación de proteínas implicadas en la respuesta al daño en el ADN inducido por el estrés oxidativo en la retina de ratón

En la sección anterior (epígrafe 4.1) se ha establecido como a lo largo del desarrollo postnatal de la retina de ratón se produce una disminución de la actividad de PARP-1 que se correlaciona temporalmente con la aparición de daños oxidativos en el ADN. Ahora, en esta nueva sección de resultados, se ha estudiado el papel que juega PARP-1 en la biología de las células de la retina cuando son sometidas a situaciones experimentales de estrés oxidativo. Para ello se han utilizado tanto cultivos organotípicos de retina de ratón como una línea celular murina (células 661W) derivada de fotorreceptores (Tan et al., 2004), a los que se le ha inducido un daño oxidativo mediante el tratamiento con el agente oxidante peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en presencia o no del inhibidor de PARP-1 denominado PJ34.

4.2.1. El inhibidor de PARP-1 PJ34 potencia la muerte celular en los cultivos organotípicos de retina de ratón sometidos a estrés oxidativo

En primer lugar, los cultivos organotípicos de retina, obtenidos a partir de ratones en estadios P12, se trataron con una dosis de 3.5 mM de H_2O_2 durante 30 minutos (Figura 22), en ausencia o presencia del inhibidor PJ34. A su vez, la incubación con el inhibidor PJ34, a una concentración de 1 μ M, consistió en un pretratamiento de 16 horas, más el tiempo de tratamiento con H_2O_2 , seguido del tiempo destinado a las incubaciones posteriores, según se indica en la Figura 22. En un primer abordaje, se evaluó la citoarquitectura de los cultivos organotípicos de retina (también denominados explantes) 24 horas después del tratamiento oxidativo mediante la realización de cortes semifinos que fueron teñidos con azul de toluidina (Figura 23A). De acuerdo a resultados previos mostrados por nuestro grupo (Ferrer-Martin et al., 2014), los explantes de retina no tratados con H_2O_2 (denominados explantes control) conservaban una citoarquitectura similar al estadio correspondiente *in vivo*, observándose bien diferenciadas las distintas capas de la retina (Figura 23A). No obstante, tras el

tratamiento con 3.5 mM de H₂O₂, la estratificación de la retina resultó alterada, observándose en la CNE, CNI y CCG signos evidentes de degeneración celular y picnosis (Figura 23A). Al analizar la citoarquitectura de los explantes de retina tratados con H₂O₂ en presencia del inhibidor PJ34, se observó también que 24 horas después del daño oxidativo había signos evidentes de degeneración similares a los observados en los explantes tratados únicamente con H₂O₂ (Figura 23A). Estos resultados mostraban que la inhibición de PARP-1 no evitaba la degeneración desencadenada por el tratamiento oxidativo. No obstante, cabe destacar que los explantes de retina tratados únicamente con el inhibidor de PARP-1 mostraban una citoarquitectura similar a los explantes control (Figura 24).

Tras observar que el tratamiento con H₂O₂ generaba cambios importantes en la citoarquitectura de la retina 24 horas después del tratamiento oxidativo, se evaluó en estos explantes los eventos de muerte celular mediante el empleo de la técnica TUNEL y la inmunodetección de caspasa 3 activa. Los resultados mostraron un incremento en el número de células TUNEL positivas en los explantes de retina tratados con H₂O₂ (Figura 23B); además, se observó que gran parte de los núcleos TUNEL positivos se localizaban en la CNI y CNE (Figura 23B). Por otro lado, el análisis de la activación de la caspasa 3 mostró que la gran mayoría de núcleos TUNEL positivos presentaban activación de dicha caspasa (Figura 23B), indicando que los eventos de muerte celular desencadenados por el H₂O₂ son de tipo apoptótico. En cambio, a diferencia de lo observado en los explantes tratados con H₂O₂, los explantes control mostraban un número reducido de núcleos TUNEL positivos, así como un marcaje reducido para la caspasa 3 activa (Figura 23B).

Por otro lado, en los explantes tratados con H₂O₂ e incubados simultáneamente con el inhibidor PJ34, se observó también un elevado número de células TUNEL positivas en las diferentes capas de la retina (Figura 23B), con un incremento de estas en la capa de fotorreceptores en comparación con los explantes tratados únicamente con H₂O₂ (Figura 23B), lo que parecía indicar que la inhibición de PARP-1 en situaciones oxidantes potenciaba la muerte en este tipo celular. Para corroborar esta observación, se cuantificó el

número de células TUNEL positivas en la CNE en los diferentes tratamientos, y efectivamente, se pudo corroborar que la inhibición de PARP-1 incrementaba de forma significativa el número de células TUNEL positivas en la CNE de explantes tratados con H₂O₂ (Figura 23C). Estos resultados indican que la inhibición de PARP-1 no protege a las células de la retina del estrés oxidativo, sino que potencian los eventos de muerte celular inducidos por el H₂O₂ en la capa donde se encuentran situados los núcleos de los fotorreceptores. Asimismo, el análisis del marcaje frente a la caspasa 3 activa mostró que los núcleos TUNEL positivos pertenecían a células con activación de la caspasa 3 (Figura 23B), indicando que la inhibición de PARP-1 estaría potenciando la muerte celular dependiente de caspasas en explantes de retina en situaciones oxidantes.

Los resultados de muerte celular descritos anteriormente fueron también corroborados mediante citometría de flujo usando la técnica Anexina V/Ioduro de propidio para detectar apoptosis (Figura 23D). En este caso, el tratamiento de los explantes con H₂O₂ indujo un incremento significativo en el porcentaje de células apoptóticas tempranas (Anexina V-positivas e Ioduro de propidio-negativas; valor = 25.17 ± 2.77) con respecto a los explantes control (valor = 14.97 ± 0.18) (Figura 23D); en cambio, la inhibición de PARP-1 en los explantes tratados con H₂O₂ incrementó aún más este porcentaje (valor = 37.10 ± 2.75).

En general, estos resultados muestran como la inhibición de PARP-1 ejerce un efecto negativo sobre la supervivencia de las células de la retina, con especial énfasis sobre los fotorreceptores, cuando esta sufre situaciones de estrés oxidativo.

4.2.2. PJ34 incrementa la expresión del marcador de daño en el ADN γ -H2AX en la capa de fotorreceptores de retinas sometidas a estrés oxidativo

Como ha sido descrito, el peróxido de hidrógeno es considerado un agente genotóxico que puede inducir muerte celular mediante la generación de roturas en el ADN (Iloki-Assanga et al., 2015). Además, como se ha comentado en la Introducción de esta Tesis, PARP-1 es una enzima cuya activación está relacionada con la señalización y reparación de los daños generados en el ADN. Por ello, en este trabajo de Tesis se quiso evaluar si el incremento de la muerte celular observada en las células de la retina sometidas al tratamiento oxidante con H_2O_2 en presencia del inhibidor de PARP-1 PJ34 se debía a una exacerbación del daño en el ADN en estas condiciones.

Al igual que en el epígrafe 4.1.3, los daños en el ADN fueron cuantificados mediante la detección de γ -H2AX (Podhorecka et al., 2010). En este caso las inmunofluorescencias mostraron en las secciones de retinas tratadas con H_2O_2 un número elevado de células positivas para γ -H2AX, especialmente en la CNI y en la CCG (Figura 25A); en cambio, las secciones de retinas controles mostraban un marcaje reducido para γ -H2AX. La inhibición de PARP-1 en explantes tratados con H_2O_2 presentó también un marcaje elevado para γ -H2AX, observándose un incremento de células positivas para γ -H2AX, especialmente en la CNE (Figura 25A). Estas observaciones parecían indicar que la inhibición de PARP-1 en situaciones oxidantes potenciaba la presencia de marcadores de daño de doble cadena en la capa de fotorreceptores. Para corroborar esta observación, se cuantificó el número de células γ -H2AX positivas en la CNE en los diferentes tratamientos, y efectivamente, se pudo corroborar que la inhibición de PARP-1 incrementaba de forma significativa el número de células para γ -H2AX en la CNE de explantes tratados con H_2O_2 (Figura 25B).

Finalmente, se evaluó si el tratamiento con H_2O_2 de los explantes de retina era capaz de producir la activación de la enzima PARP-1. Mediante la detección de la cantidad de proteínas poli-ADP-ribosiladas por *Western Blot*, a

las 12 horas de incubación en medio fresco tras el tratamiento oxidativo, se pudo corroborar que el tratamiento con H_2O_2 incrementaba la cantidad de proteínas poli-ADP-ribosiladas (indicativo de la activación de PARP-1) con respecto a los explantes sin tratar (Figura 25C). La inhibición de PARP-1 mediante el inhibidor PJ34 redujo el nivel de proteínas poli-ADP-ribosiladas tras el tratamiento con H_2O_2 (Figura 25C).

En resumen, estos resultados muestran como la inhibición de PARP-1 potencia la presencia de marcadores de daños en el ADN de doble cadena en la capa de los fotorreceptores tras el tratamiento con H_2O_2 de los explantes de retina.

4.2.3. El tratamiento con H_2O_2 modifica el fosfoproteoma de la línea celular 661W

A la vista de los resultados obtenidos en los explantes de retina, donde la inhibición de PARP-1 potenciaba la muerte celular y la presencia de γ -H2AX en la CNE ante situaciones oxidantes, se quiso profundizar en las rutas moleculares que podrían estar involucradas en dichos procesos. Dado que los cambios observados en explantes de retina se producían especialmente en la CNE, que contenía los núcleos de los fotorreceptores, era de especial interés determinar los procesos moleculares que acontecían en este tipo celular tras el daño oxidativo. Con esta finalidad se utilizó la línea celular murina 661W obtenida de tumores de retina e inmortalizada con el antígeno T del virus SV40, que presenta características propias de los conos (como la presencia de opsinas), convirtiéndola en una herramienta útil para el estudio de procesos celulares y moleculares relacionados con los fotorreceptores (Tan et al., 2004).

En primer lugar, se corroboró que el tratamiento con H_2O_2 era capaz de generar una activación de PARP-1 en la línea celular 661W. Para ello, se realizó un ensayo para determinar el tiempo óptimo de incubación en el que se detectaba la máxima actividad de la enzima, usando para ello técnicas de *Western Blot* y analizando en los *blots* la cantidad de proteínas poli-ADP-

ribosiladas durante los primeros 15 y 30 minutos de tratamiento con 1 mM de H_2O_2 , y a los 15 minutos, 2 y 6 horas posteriores a dicho tratamiento una vez retirado el H_2O_2 (Figura 26A). Al igual que sucedía en los explantes de retina, se comprobó que en las células 661W el tratamiento con H_2O_2 inducía la poli-ADP-ribosilación de proteínas (Figura 26A), lo que indicaba un incremento en la actividad de PARP-1. Además, se pudo observar que en los extractos proteicos de las células 661W las mayores cantidades del polímero PAR se inducían a los 15 minutos de tratamiento con H_2O_2 , observándose una destacable reducción del polímero en tiempos posteriores (Figura 26A). Tras confirmar que el tratamiento con H_2O_2 de la línea celular 661W inducía la poli-ADP-ribosilación de proteínas, se evaluó si el inhibidor PJ34 era capaz de bloquear dicha modificación, tal y como sucedía en los explantes de retina. El análisis mediante *Western Blot* e inmunofluorescencia de la cantidad del polímero PAR en presencia del inhibidor PJ34 mostró una gran reducción de los niveles del polímero PAR (Figura 26B, C), en comparación con la expresión mostrada en las células tratadas únicamente con H_2O_2 .

Una vez establecido que el tratamiento con H_2O_2 generaba un incremento en la actividad de PARP-1 y que el uso del inhibidor PJ34 reducía su actividad, se procedió a realizar un análisis del fosfoproteoma de la línea celular en condiciones oxidativas, tanto en ausencia como en presencia del inhibidor de PARP-1. Este análisis se realizó a las 6 horas tras el tratamiento oxidativo para así garantizar que las rutas de señalización implicadas en los procesos relacionados con la respuesta celular tras el daño inducido en el ADN se hubieran iniciado. El análisis por espectrometría de masas (LC-MS/MS) permitió la identificación y cuantificación total de 8131 fosfopéptidos, de los cuales 1807 y 1874 fosfopéptidos mostraron cambios significativos ($p < 0.05$) en su expresión en las células tratadas con H_2O_2 y $H_2O_2 + PJ34$, respectivamente, cuando se comparaban con la condición control (células sin tratar con H_2O_2). En un análisis más exhaustivo, se observó que el tratamiento con H_2O_2 incrementó con un valor de “*fold change*” ≥ 1 (concepto definido en el epígrafe 3.22.5 de Materiales y Métodos) la fosforilación de 524 péptidos con respecto a la condición control (Figura 27A, panel izquierdo; fosfopéptidos

mostrados en el cuadrante superior derecho del *volcano plot*); mientras que el tratamiento en combinación con el inhibidor PJ34 incrementó la fosforilación de 621 péptidos (con un “*fold change*” ≥ 1) con respecto al control (Figura 27A, panel derecho; fosfopéptidos mostrados en el cuadrante superior derecho del *volcano plot*). Estos resultados muestran que el tratamiento con H₂O₂ induce la fosforilación de proteínas en la línea celular 661W, siendo dichos cambios ligeramente mayores en presencia del inhibidor PJ34.

Para obtener una visión global de qué procesos biológicos se podrían estar modificando por los tratamientos anteriores, aquellos fosfopéptidos detectados en ambos tratamientos (H₂O₂ y H₂O₂ + PJ34) y que presentaban un incremento en su fosforilación con un valor de “*fold change*” ≥ 1 respecto a la condición control fueron analizados mediante la herramienta de análisis de ontología de genes (GO) ClueGO (Bindea et al., 2009). De esta manera se obtuvieron una serie de términos de GO que se agruparon en categorías funcionales relacionadas con un proceso biológico común (Figura 27B). De los 445 péptidos cuya fosforilación se veía incrementada significativamente por ambos tratamientos (denominados fosfopéptidos comunes), se observó que los grupos funcionales que presentaron mayor enriquecimiento estaban relacionados con la respuesta celular al daño en el ADN (en inglés *Cellular response to DNA damage stimulus*) y el procesamiento del ARNm (en inglés *mRNA processing*) (Figura 27B). Estos resultados parecen indicar que el tratamiento con H₂O₂, en gran parte, induce cambios en la fosforilación de proteínas cuya función está relacionada con la respuesta celular al daño en el ADN.

Además del análisis anterior sobre la expresión de los fosfopéptidos comunes, se llevó a cabo un nuevo análisis de enriquecimiento utilizando los fosfopéptidos diferencialmente expresados en cada tratamiento (fosfopéptidos mostrados en el cuadrante superior derecho de los *volcano plots* de la Figura 27A). Este análisis basado en la herramienta *DAVID* (Huang da et al., 2009) asocia a cada fosfoproteína aquellos procesos biológicos en los que participa, y los agrupa como términos. Los términos más representativos de este análisis fueron los siguientes: Regulación de la transcripción, Ciclo celular, Respuesta

al daño en el ADN, Fosforilación de proteínas, Reparación del ADN, División celular y Apoptosis (en inglés *Regulation of transcription, DNA-templated; Cell cycle; Cellular response to DNA damage stimulus; Protein phosphorylation; DNA repair; Cell division; y Apoptotic process*, respectivamente) (Figura 27C). Cabe destacar que en este análisis, el mayor número de proteínas asociadas a cada término se obtienen cuando PARP-1 es inhibida tras el daño oxidativo (Figura 27C). En la Tabla II (Anexo III) se indican todas las fosfoproteínas asociadas a cada término en cada uno de los tratamientos. Es importante destacar que la fosfoproteína ATM, implicada en los procesos de respuesta celular al daño en el ADN, apareció únicamente representada en los términos de GO en el tratamiento con H₂O₂ + PJ34 (resaltada en la Tabla II, Anexo III). De hecho, se observó que la fosforilación de ATM en la serina 1987 (Ser1987) presentaba mayor fosforilación cuando PARP-1 es inhibida tras el tratamiento oxidativo (Tabla III, Anexo III). Igualmente sucedía con el marcador de daño en el ADN, γ -H2AX, observándose solo en los términos de GO en la condición H₂O₂ + PJ34 (Tabla II, Anexo III).

En resumen, los resultados obtenidos en estos análisis muestran que el bloqueo de la actividad de PARP-1 mediante el inhibidor PJ34 en las células 661W sometidas a tratamiento oxidativo incrementa el número de fosfoproteínas asociadas con procesos relacionados con la respuesta celular al daño en el ADN, como por ejemplo ATM y γ -H2AX.

4.2.4. La inhibición de PARP-1 incrementa la fosforilación de proteínas en motivos SQ tras el tratamiento oxidativo

Tras observar que en las células sometidas al tratamiento oxidativo la inhibición de PARP-1 incrementaba el número de proteínas relacionadas con la respuesta celular al daño en el ADN, se quiso evaluar en detalle el efecto del inhibidor PJ34 sobre la fosforilación de estas proteínas. Para ello, se realizó un nuevo análisis sobre aquellos fosfopéptidos que mostraron cambios significativos en ambos tratamientos, o sea, utilizando los 445 fosfopéptidos comunes incrementados (con un valor de “*fold change*” ≥ 1) en las condiciones

H_2O_2 y $H_2O_2 + PJ34$, y se comparó los niveles de fosforilación diferencial que sufrían estos péptidos en ambas condiciones. Este análisis mostró que un total de 40 fosfopéptidos sufrían cambios significativos en sus niveles de fosforilación cuando se comparaban ambos tratamientos; 31 de ellos mostraban mayores niveles de fosforilación en presencia del inhibidor PJ34 tras el tratamiento oxidativo ("*fold change* $H_2O_2 + PJ34$ " > "*fold change* H_2O_2 "; $p < 0.05$), mientras que 9 presentaban menor fosforilación ("*fold change* $H_2O_2 + PJ34$ " < "*fold change* H_2O_2 "). En la tabla IV (Anexo III) se indican los 40 fosfopéptidos obtenidos en este análisis, el sitio donde se produce la fosforilación, así como la secuencia peptídica modificada y el efecto del inhibidor PJ34 sobre la fosforilación tras el tratamiento oxidativo.

A continuación, se analizó la secuencia peptídica entorno al sitio de fosforilación en los 40 péptidos diferencialmente expresados en ambos tratamientos; se observó que el 61.3% (19 de 31) de los péptidos con fosforilación incrementada en $H_2O_2 + PJ34$ presentaban fosforilación en un residuo de serina (S) seguido de un residuo de glutamina (Q), es decir, en un motivo SQ (Figura 28A; Tabla IV, Anexo III). Entre estos fosfopéptidos que presentaban niveles de fosforilación mayores cuando PARP-1 era inhibida (Figura 28B) se encontraban proteínas cruciales en la respuesta al daño en el ADN, como eran MDC1 y BRCA1 (Figura 28C); el resto de proteínas con fosforilaciones incrementadas en motivos SQ se muestran en la Figura 29. Cabe destacar, que ninguno de los 9 péptidos cuya fosforilación se veía reducida en presencia del inhibidor presentaban motivos SQ (Tabla IV, Anexo III).

En general, los datos aquí mostrados indican que el uso del inhibidor PJ34 tras el tratamiento oxidativo incrementa la fosforilación en motivos SQ de proteínas relacionadas con la respuesta al daño en el ADN.

4.2.5. El inhibidor PJ34 reduce la proliferación celular de la línea 661W tras el tratamiento oxidativo

Los resultados de fosfoproteómica indican que la inhibición de PARP-1 tras el tratamiento con H_2O_2 incrementa la fosforilación de proteínas implicadas en la ruta de señalización celular conocida con las siglas DDR (del inglés *DNA Damage Response*), ruta que está estrechamente relacionada con el control del ciclo celular en las células proliferativas. Ante esta relación se evaluó si las modificaciones en estas proteínas conllevaban cambios en la progresión del ciclo celular de la línea 661W en ambos tratamientos. El análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo mostró que el tratamiento con H_2O_2 incrementaba significativamente el porcentaje de células en fase G_2/M con respecto a la condición control, cuyos valores pasaban del 25.2% (condición control) hasta el 39% tras el tratamiento oxidativo (Figura 30A, panel primero y tercero), y siendo dicho porcentaje mucho mayor, alcanzando el valor del 56.7%, en presencia del inhibidor PJ34 (Figura 30A, cuarto panel) tras el tratamiento oxidativo. Estos resultados muestran que la inhibición de la actividad de PARP-1 potencia el arresto de células en la fase G_2/M del ciclo celular tras el tratamiento oxidativo, y que ello podría ser debido a la activación mediante fosforilación de proteínas implicadas en este control como eran MDC1 y BRCA1.

A continuación, se evaluó si esta alteración en el ciclo celular estaba relacionada con un descenso progresivo en la densidad celular. Mediante un ensayo colorimétrico usando la sulforrodamina B se pudo comprobar que el uso del inhibidor PJ34 reducía la densidad celular a lo largo del tiempo tras el tratamiento oxidativo (Figura 30B). No obstante, cabe destacar que este descenso solamente sucedía ante situaciones oxidantes, ya que la inhibición de PARP-1 en ausencia de H_2O_2 parecía no afectar a la densidad celular (Figura 30B).

Estas experiencias demuestran que la inhibición de PARP-1 afecta a la normal progresión del ciclo celular, generando una parada en fase G_2/M , así como a la proliferación de las células 661W tras el tratamiento oxidativo.

4.2.6. La inhibición de PARP-1 incrementa la fosforilación de los sustratos de ATM/ATR en la línea celular retiniana y en los explantes sometidos a estrés oxidativo

Los estudios realizados con LC-MS/MS indican una relación entre la inhibición de PARP-1 y el incremento de la fosforilación de proteínas implicadas en la DDR en situaciones de estrés oxidativo. Dado que la DDR está mediada por la activación de las quinasas ATM y ATR, las cuales llevan a cabo fosforilación en motivos SQ de diversos sustratos implicados tanto en la reparación del ADN como en el control del ciclo celular, proliferación y/o apoptosis (Traven y Heierhorst, 2005), se quiso verificar si en presencia del inhibidor PJ34 se producía un incremento de las fosforilaciones en dichos sustratos cuando las células fueron sometidas a un estrés oxidativo. Para ello, mediante *Western Blot*, se analizó el grado de fosforilación en los sustratos de ATM y ATR, indicativo de la actividad de estas quinasas. Los *immunoblots* mostraron que el inhibidor de PARP-1 PJ34 incrementó la expresión de los sustratos fosforilados por ATM/ATR tras el tratamiento oxidativo en la línea celular 661W (Figura 31A); dicha observación fue confirmada mediante la cuantificación de los niveles relativos de expresión en los estudios de densitometría (Figura 31B). Estos resultados fueron reproducidos en los cultivos organotípicos de retina de ratón, en los que se observó de nuevo un incremento de la fosforilación de los sustratos de ATM/ATR cuando la actividad de PARP-1 era inhibida (Figura 31C); no obstante, la cuantificación mediante densitometría no proporcionó resultados estadísticamente significativos (Figura 31D), lo que podría deberse al hecho de que los extractos proteicos obtenidos de los explantes estaban constituidos por células de cada una de las capas de la retina, y por tanto, respondiendo cada tipo celular de forma diferente al tratamiento.

En resumen, estos datos confirman que la inhibición de PARP-1 tras un tratamiento oxidativo incrementa la fosforilación de proteínas en motivos SQ tanto en células proliferativas (línea celular 661W) como en células post-mitóticas (explantes de retina), probablemente por un incremento en la actividad de las quinasas ATM/ATR.

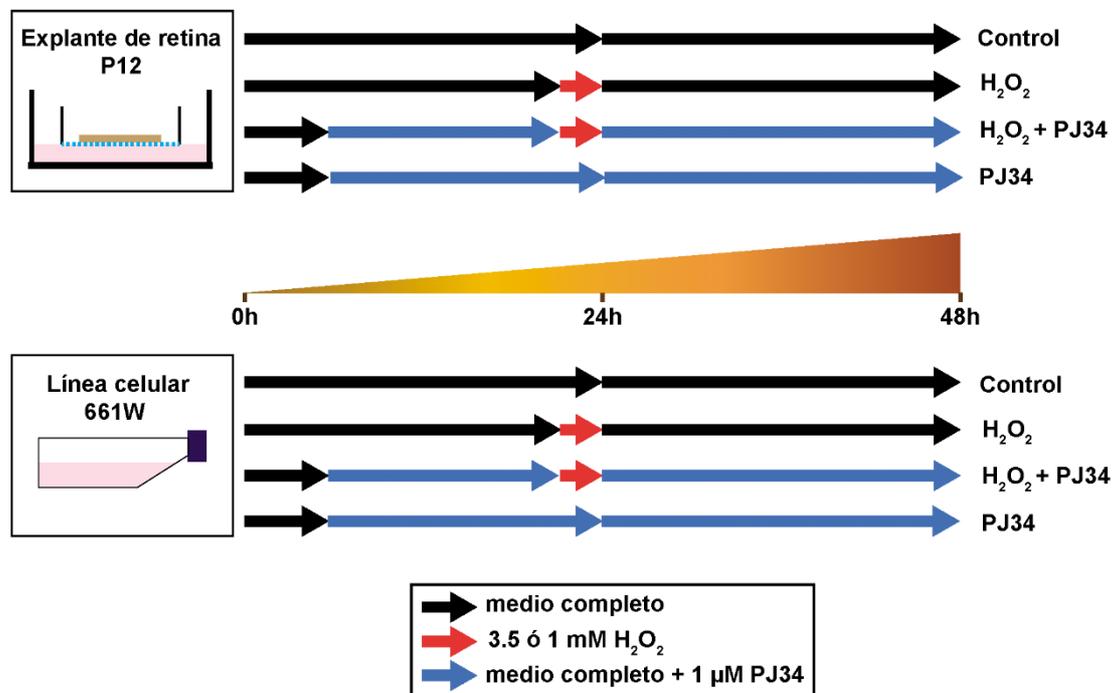


Figura 22. Esquema de tratamiento con H₂O₂ y/o el inhibidor de PARP-1 PJ34 en explantes de retina de ratón y en la línea celular retiniana 661W. Las flechas de color negro indican el cultivo de los explantes o de las células en medio fresco, las flechas de color rojo indican el tratamiento con H₂O₂ durante 30 min (en presencia o ausencia del inhibidor de PARP-1 PJ34), y las flechas de color azul indican la incubación con medio fresco junto con el inhibidor PJ34. Tras el cultivo de los explantes de retina o de la línea celular 661W, se llevó a cabo un pretratamiento de 16 horas con el inhibidor PJ34 en medio fresco, previo al tratamiento con H₂O₂, estando este presente hasta el final de los ensayos. El tratamiento con H₂O₂ se llevó a cabo durante 30 minutos, y transcurrido el tiempo, se retiraba el H₂O₂, se añadía medio fresco (sin H₂O₂) y se incubaba adicionalmente hasta un periodo máximo de 24 horas.

Figura 23. Efecto del tratamiento con H₂O₂ y la inhibición de PARP-1 en explantes de retina de ratón. **A)** Tinción con azul de toluidina de cortes semifinos de explantes de retina P12 tratados con H₂O₂ en ausencia y presencia del inhibidor de PARP-1 PJ34 y tras 24 horas de incubación en medio fresco, tal y como se indica en la figura 22 (barras de escala: 50 µm; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; y CCG, capa de células ganglionares). **B)** Imágenes de microscopía confocal que muestran la inmunodetección de caspasa 3 activa (rojo), el marcaje de células en proceso de muerte mediante la técnica TUNEL (verde) y los núcleos teñidos con DAPI (azul) en explantes de ratón P12 tratados con H₂O₂ en ausencia y presencia del inhibidor PJ34 y tras 24 horas de incubación en medio fresco. Imágenes representativas de tres ensayos independientes (barras de escala: 25 µm; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; y CCG, capa de células ganglionares). **C)** Recuento de células TUNEL positivas en la CNE en tres campos por sección, y en tres secciones por explante de retina. Los datos se presentan como las medias (± SEM) de células TUNEL positivas tras el análisis de 3 explantes de retina por cada condición (**p < 0.01 respecto al control; #p < 0.05 respecto a H₂O₂). **D)** La muerte celular de explantes P12, tratados con H₂O₂ e incubados posteriormente 24 horas en medio fresco en presencia o ausencia del inhibidor PJ34 se analizó por citometría de flujo mediante el uso de las sondas fluorescentes anexina V-APC e yoduro de propidio. Se muestra un mapa de densidad representativo donde las células se encuentran distribuidas en cuatro cuadrantes (cuadrante inferior izquierdo, Q3: células vivas; inferior derecho, Q4: células Anexina-V positivas; superior izquierdo, Q1: células IP positivas; superior derecho, Q2: células Anexina V e IP positivas). Asimismo, en la parte inferior de cada mapa de densidad se muestra la media (± SEM) del porcentaje de células apoptóticas (cuadrante inferior derecho, Q4: células Anexina-V positivas) de tres explantes de retina por cada condición (*p < 0.05 y **p < 0.01 respecto al control; #p < 0.05 respecto a H₂O₂).

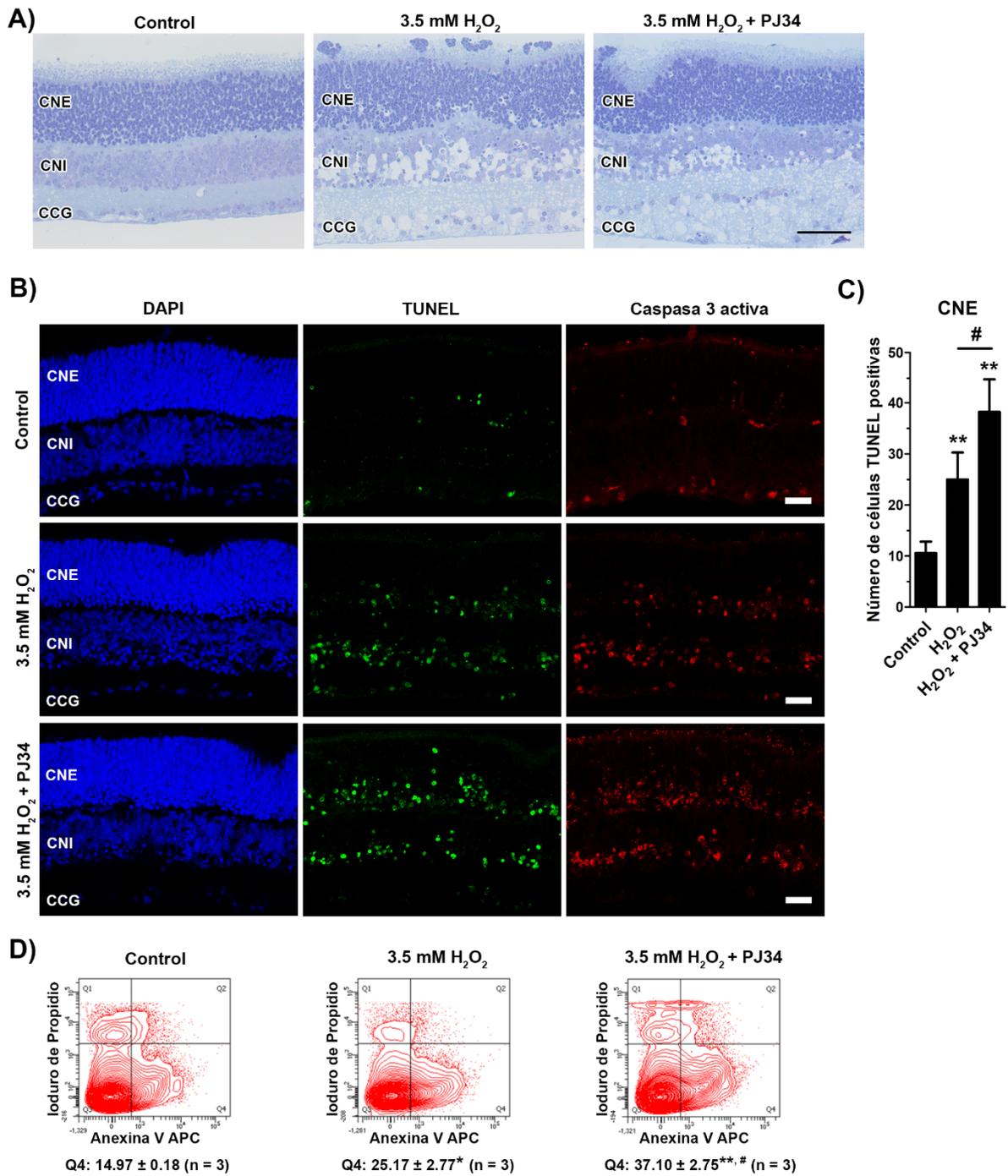


Figura 24. Efecto de la inhibición de PARP-1 en explantes no tratados con H₂O₂. Tinción con azul de toluidina de cortes semifinos de explantes de retina P12, incubados durante un periodo máximo de 48 horas (tiempo máximo de duración de los ensayos, tal y como se indica en la figura 22) en ausencia y presencia del inhibidor de PARP-1 PJ34 (barras de escala: 50 μ m; CCG, capa de células ganglionares; CNE, capa nuclear externa; y CNI, capa nuclear interna). Imágenes representativas de tres ensayos independientes.

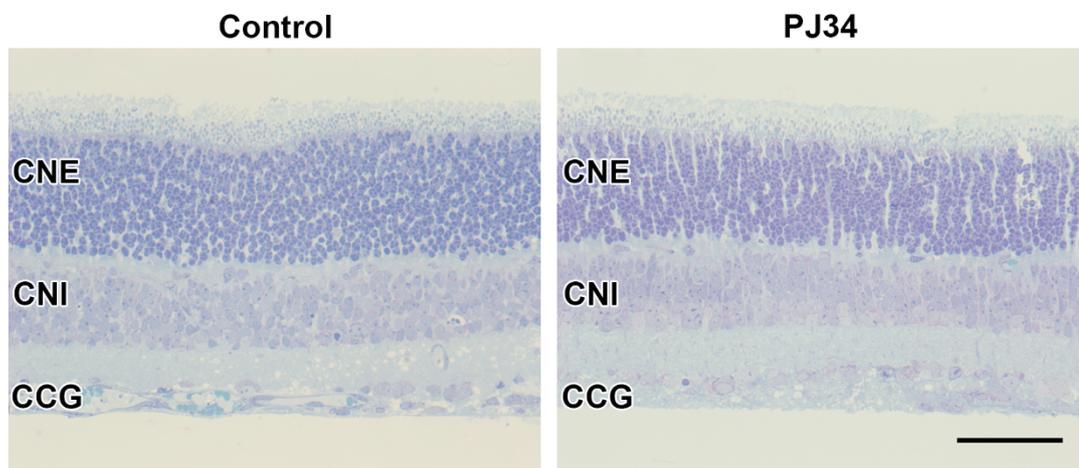


Figura 25. Efecto del tratamiento con H₂O₂ y la inhibición de PARP-1 en los niveles de γ -H2AX y proteínas poli-ADP-ribosiladas. A) Imágenes de microscopía confocal que muestran la inmunodetección de γ -H2AX (verde) y los núcleos teñidos con DAPI (azul) en explantes de ratón P12 tratados con H₂O₂ en ausencia y presencia del inhibidor PJ34 y tras 24 horas de incubación en medio fresco (barras de escala: 25 μ m; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; y CCG, capa de células ganglionares). Imágenes representativas de tres ensayos independientes. **B)** Recuento de células γ -H2AX positivas en la CNE en tres campos por sección, y tres secciones por explante de retina. Los datos se presentan como las medias (\pm SEM) de células γ -H2AX positivas tras el análisis de 3 explantes de retina por cada condición (**p < 0.01 y ***p < 0.001 respecto al control; ###p < 0.001 respecto a H₂O₂). **C)** *Western Blot* para la detección de proteínas poli-ADP-ribosiladas en explantes de retina tratados con H₂O₂ durante 30 minutos e incubados posteriormente 12 horas en medio fresco con y sin inhibidor de PARP-1 PJ34. La cantidad de proteínas se normalizó frente a β -actina. *Western Blot* representativo de 3 ensayos independientes.

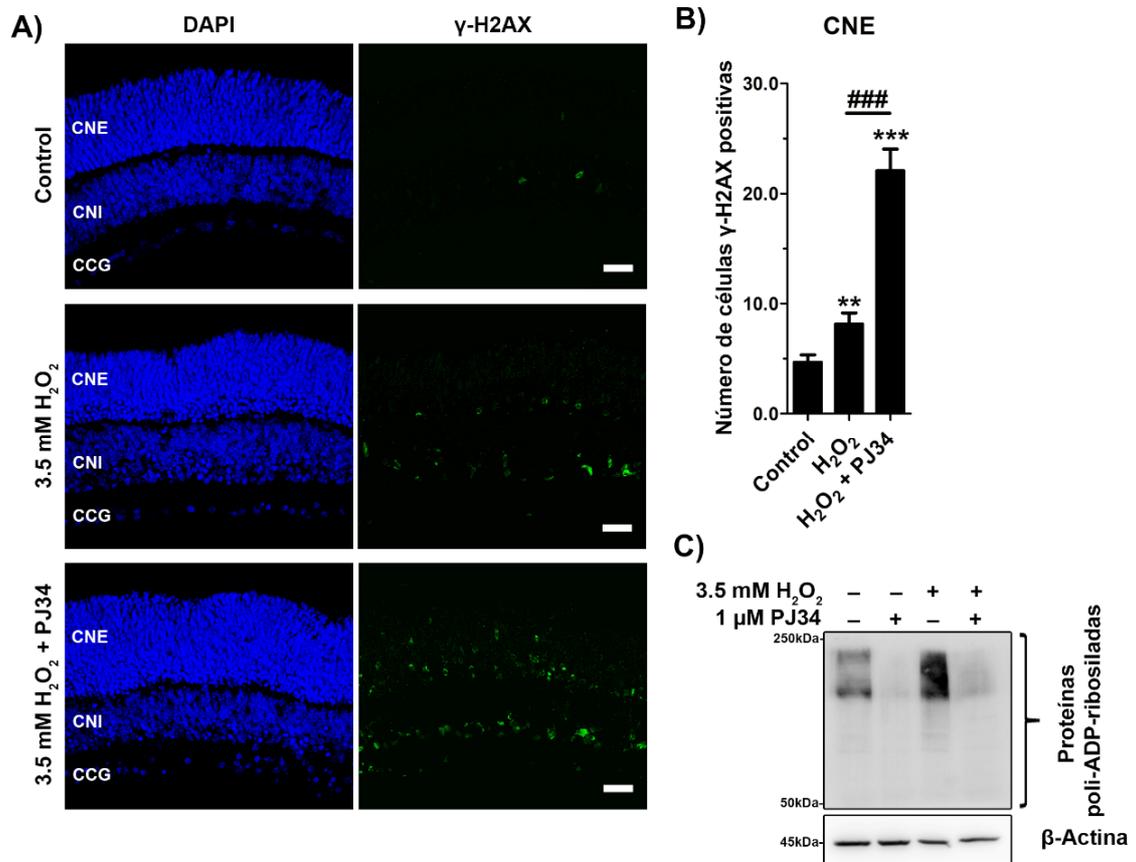


Figura 26. Actividad de PARP-1 en la línea celular 661W tratada con H₂O₂. **A)** *Western Blot* para la detección de proteínas poli-ADP-ribosiladas en la línea celular retiniana 661W tratada con 1 mM de H₂O₂ (0, 15 y 30 minutos) e incubada posteriormente (15 y 30 minutos, 2 y 6 horas) en medio fresco. La cantidad de proteínas se normalizó frente a β -tubulina. *Western Blot* representativo de 3 ensayos independientes. **B)** *Western Blot* para la detección de proteínas poli-ADP-ribosiladas en la línea celular retiniana tratada con 1 mM de H₂O₂ (15 minutos) en ausencia y presencia del inhibidor PJ34. La cantidad de proteínas se normalizó frente a β -actina. *Western Blot* representativo de 3 ensayos independientes. **C)** Inmunodetección de PAR (verde) y tinción de los núcleos celulares con Hoechst (azul) tras el tratamiento de la línea celular 661W con H₂O₂ durante 15 min en ausencia y en presencia del inhibidor PJ34 (barra de escala: 50 μ m). Imagen representativa de tres ensayos independientes.

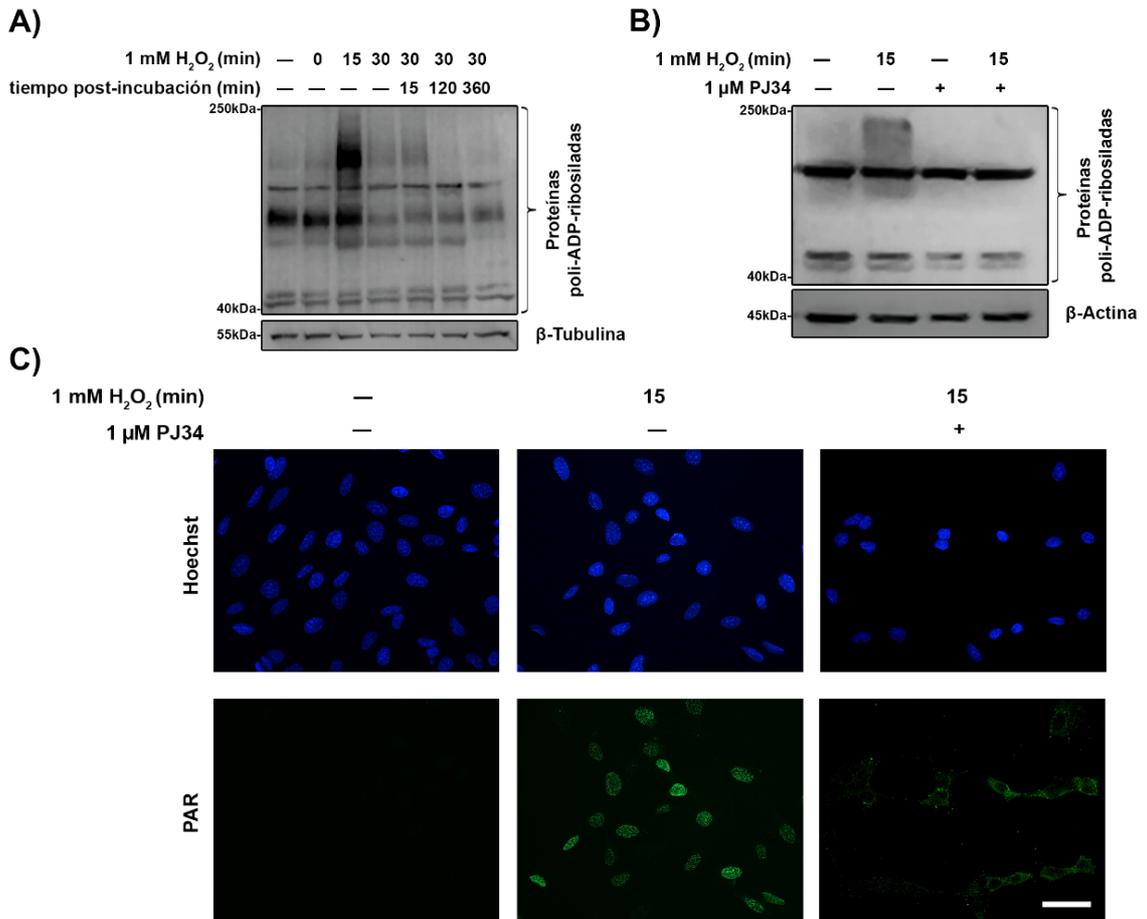
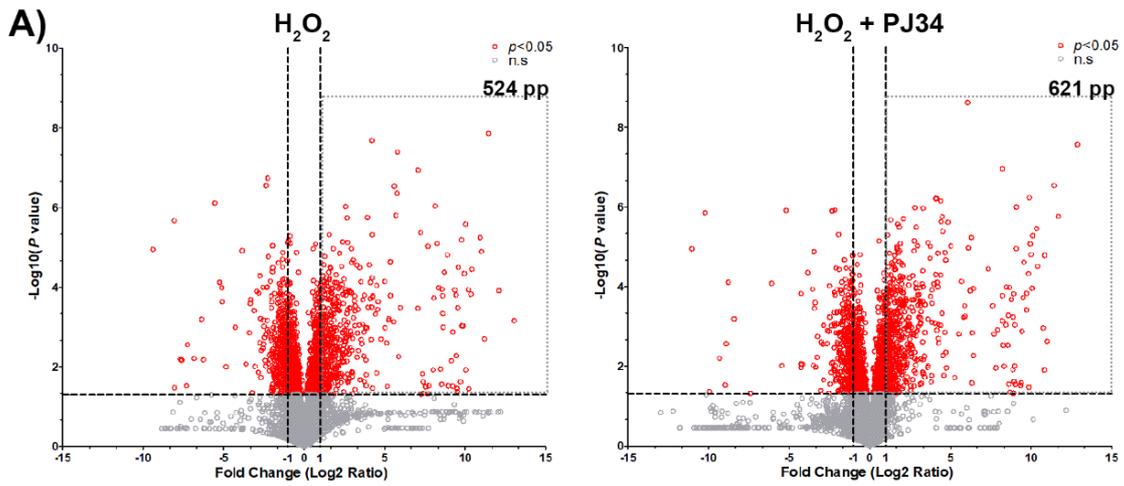
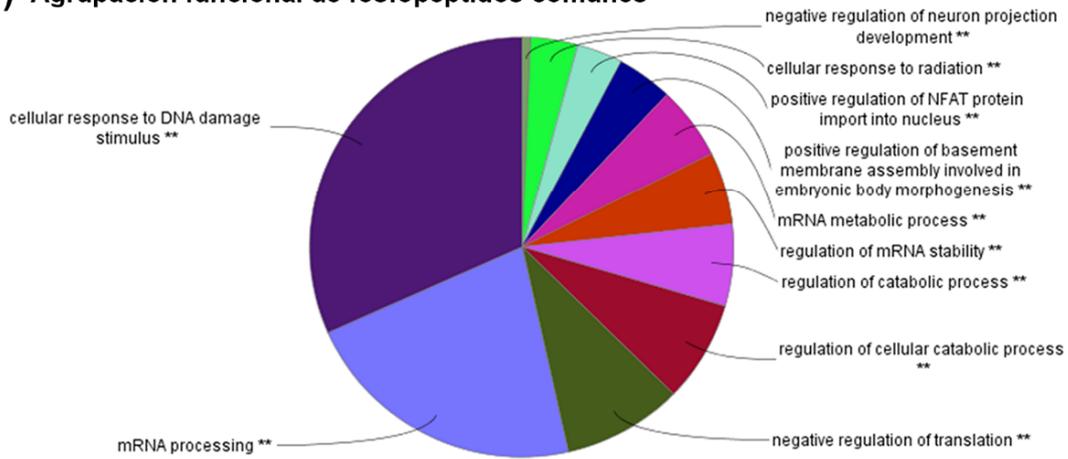


Figura 27. Efecto del tratamiento oxidativo y de la inhibición de PARP-1 en el fosfoproteoma de la línea celular 661W. A) *Volcano plots* donde se muestran todos los fosfopéptidos identificados por LC-MS/MS en la línea celular 661W tratada con H₂O₂ (30 minutos) e incubada en medio fresco 6 horas en ausencia y presencia del inhibidor PJ34. El eje X muestra el “*fold change*” calculado respecto al control para cada uno de los fosfopéptidos identificados (ver sección 3.22.5 de material y métodos), y el eje Y muestra el nivel de significancia para cada fosfopéptido (mostrado como -Log₁₀ del p-valor) respecto al control (líneas de puntos horizontales, límite de significancia establecido como $p < 0.05$; y líneas de puntos verticales, valores mínimos de “*fold change*” considerados, 1 y -1, respectivamente). En rojo se muestran todos los fosfopéptidos con cambios significativos respecto al control ($p < 0.05$), y en gris aquellos fosfopéptidos cuyos cambios no resultaron significativos ($p > 0.05$) respecto al control en ambos tratamientos. En cada *volcano plot* se indica el número de fosfopéptidos con niveles de fosforilación incrementados de forma significativa con respecto al control (“*fold change*” ≥ 1 y $p < 0.05$) para H₂O₂ y H₂O₂ + PJ34. **B)** Análisis de la ontología de genes (GO) y posterior agrupación funcional de los términos de GO mediante la herramienta de análisis ClueGO. Se analizaron aquellos fosfopéptidos con cambios significativos respecto al control (“*fold change*” ≥ 1 , y $p < 0.05$ respecto al control) y que aparecían a su vez en ambos tratamientos (en H₂O₂ y en H₂O₂ + PJ34, fosfopéptidos comunes), y se muestran las agrupaciones funcionales de los términos de GO que resultaron significativas (** $p < 0.01$). **C)** Análisis de GO mediante la herramienta DAVID de los fosfopéptidos cuyo nivel de fosforilación era significativamente mayor en cada uno de los tratamientos respecto al control (“*fold change*” ≥ 1 , y $p < 0.05$; cuadrante superior derecho de los *volcano plots* de H₂O₂ y H₂O₂ + PJ34). Se muestra el porcentaje de genes (eje X) para cada término identificado de GO relacionado con procesos biológicos (eje Y). Solo se muestran los términos de GO más representativos en ambas condiciones (términos con mayor número de genes).



B) Agrupación funcional de fosfopéptidos comunes



C) Términos de GO relacionados con *Biological Process*

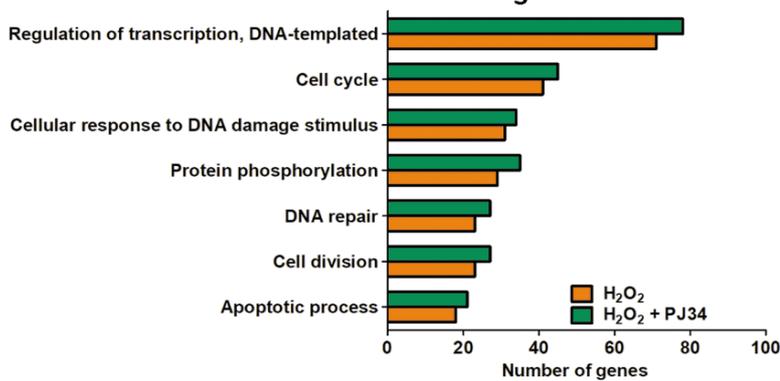


Figura 28. Fosfopéptidos con cambios significativos en células 661W tratadas con H₂O₂ en presencia y ausencia del inhibidor de PARP-1. Los fosfopéptidos comunes para H₂O₂ y H₂O₂ + PJ34 (con un valor de “fold change” ≥ 1 con respecto al control y un $p < 0.05$ también respecto al control, en cada tratamiento, véase texto principal, epígrafe 4.2.4) se compararon, y se seleccionaron aquellos péptidos que mostraron diferencias significativas en el grado de fosforilación entre ambos tratamientos. Se detectaron un total de 40 fosfopéptidos que sufrían cambios significativos en sus niveles de fosforilación. **A)** Análisis del motivo de fosforilación más frecuente en los 40 fosfopéptidos anteriores. Se representan los aminoácidos más frecuentes en torno al aminoácido fosforilado (aminoácido central, posición 0). La altura de la letra (eje Y) es proporcional a la frecuencia de cada aminoácido, mientras que el eje X hace referencia a la posición del aminoácido en el motivo (N, hacia el extremo amino-terminal, y C, hacia el extremo carboxilo-terminal). **B)** Representación gráfica del “fold change” de los fosfopéptidos que mostraron fosforilación en motivos SQ (19 fosfopéptidos de los 40 fosfopéptidos indicados anteriormente), y cuyo cambio en H₂O₂ + PJ34 respecto a H₂O₂ fue significativo. **C)** Gráficos que muestran la señal de intensidad normalizada (NSI) de los fosfopéptidos Brca1 pS1422 y Mdc1 pS975, pertenecientes a la lista de 19 fosfopéptidos con fosforilaciones en motivos SQ e incluidos en el gráfico B. Se muestra los valores de NSI para cada uno de los cuatro replicados biológicos (indicados con puntos), la media (línea horizontal) y la SEM (**p < 0.001 respecto al control; ##p < 0.01 respecto a H₂O₂).

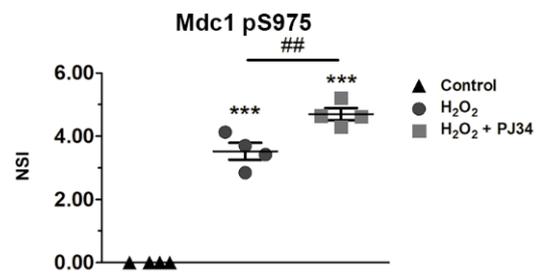
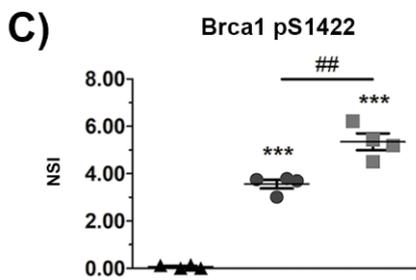
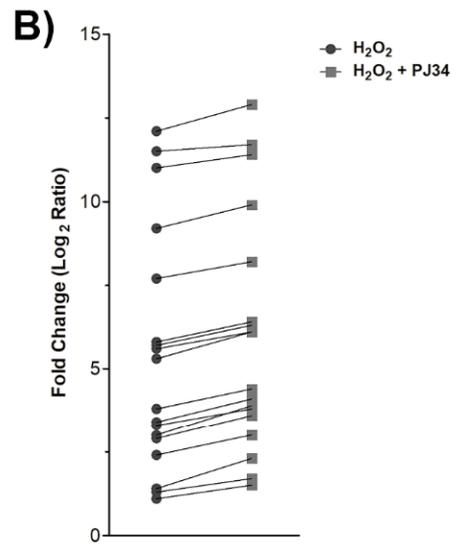
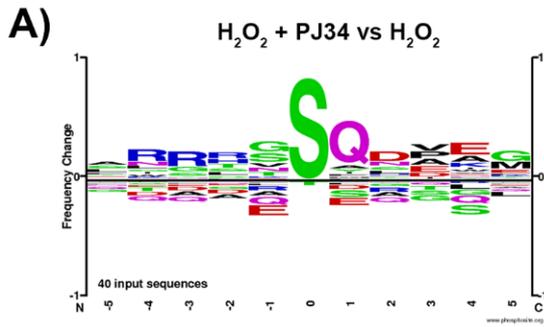


Figura 29. Señal de intensidad normalizada de los péptidos con fosforilación en motivos SQ. Gráficos que muestran la señal de intensidad normalizada (NSI) de los fosfopéptidos pertenecientes a la lista de 19 fosfopéptidos con fosforilaciones en motivos SQ. Se muestra los valores de NSI para cada uno de los cuatro replicados biológicos (indicados con puntos), la media (línea horizontal) y la SEM (*p < 0.05; **p < 0.01 y ***p < 0.001 respecto al control; #p < 0.05; ##p < 0.01 y ###p < 0.001 respecto a H₂O₂).

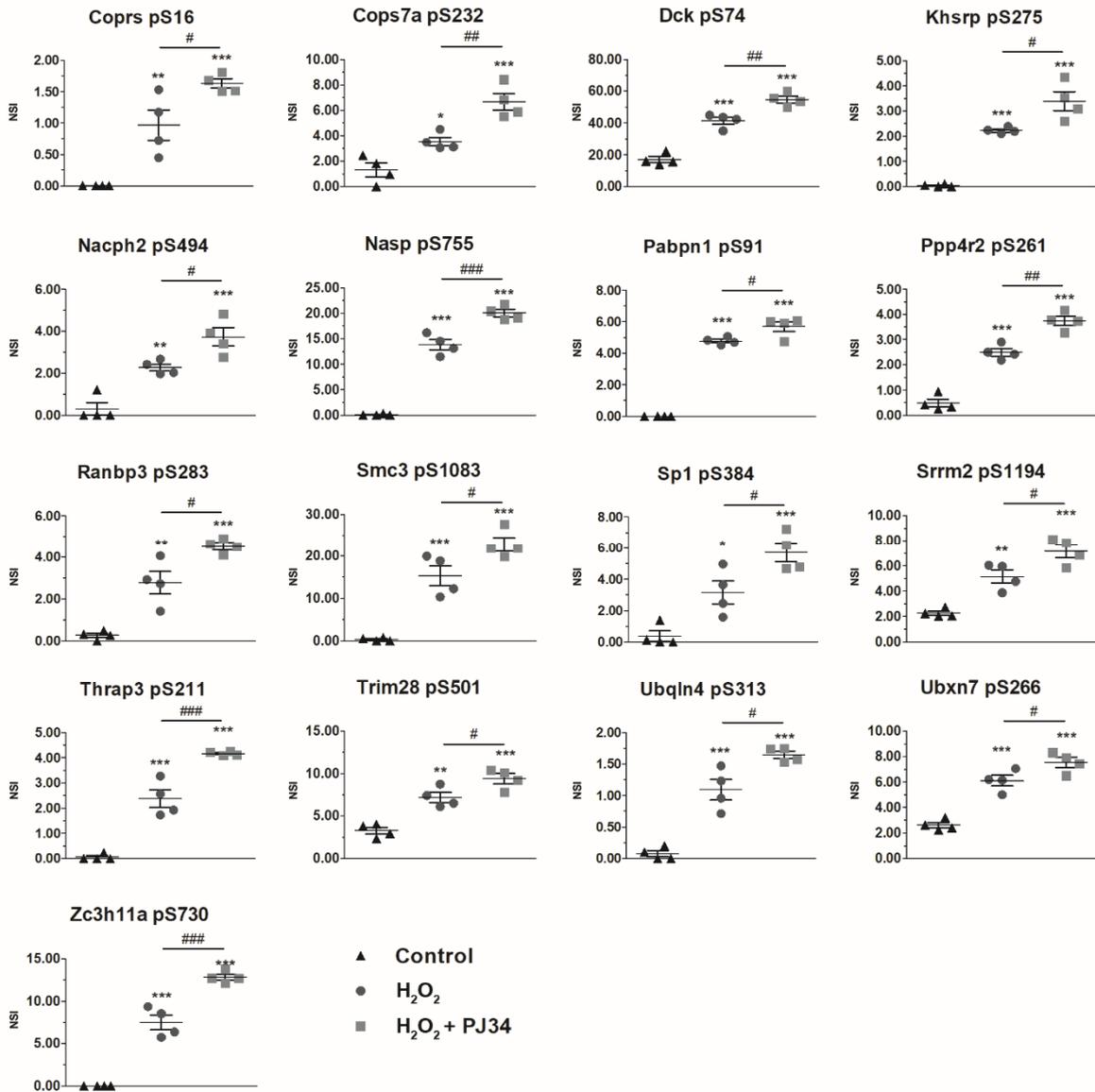


Figura 30. Efecto de la inhibición de PARP-1 en el ciclo celular y en la densidad celular de la línea celular 661W. A) Histogramas representativos del análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo en la línea celular 661W tratada con H₂O₂ (30 minutos) e incubada en medio fresco 24 horas en ausencia y presencia del inhibidor de PARP-1 PJ34. Se analizaron las distintas fases del ciclo celular (G₁, S y G₂/M) en cada uno de los tratamientos. Debajo de cada histograma se indica el porcentaje de células (media ± SEM) de cada fase obtenido de tres ensayos independientes (*p < 0.05 respecto al control, y #p < 0.05 respecto a H₂O₂). **B)** Cuantificación de la densidad celular tras 0, 24, 48 y 72 horas de incubación en medio fresco tras la exposición con H₂O₂ (30 minutos) de la línea celular 661W en ausencia y presencia del inhibidor PJ34. Se muestra la densidad óptica obtenida tras la medida de la absorbancia a 492nm de la sulforrodamina B en cada uno de los tiempos indicados. Para cada tiempo se muestra la media (± SEM) de tres ensayos independientes (*p < 0.05 respecto al control y #p < 0.05 respecto a H₂O₂).

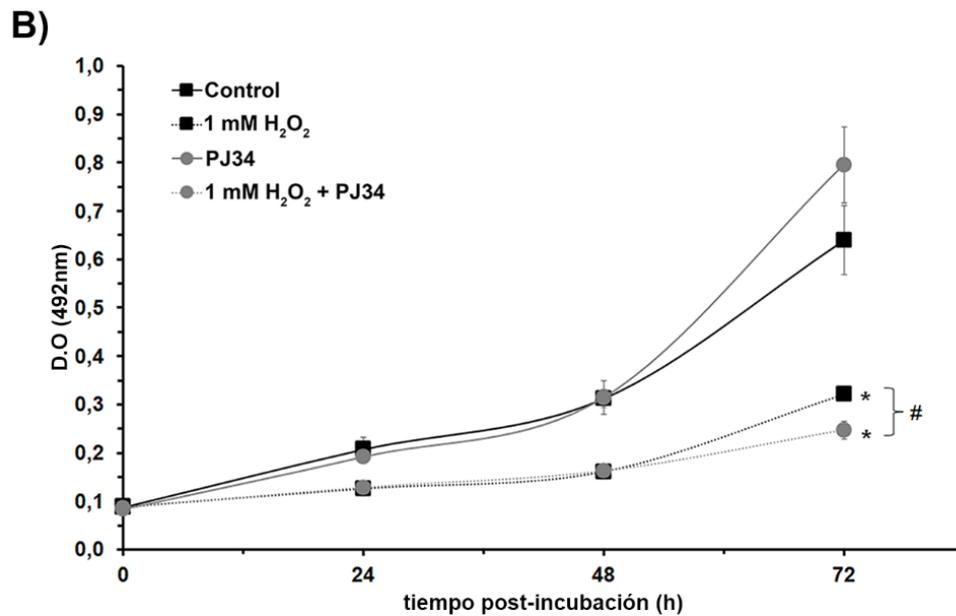
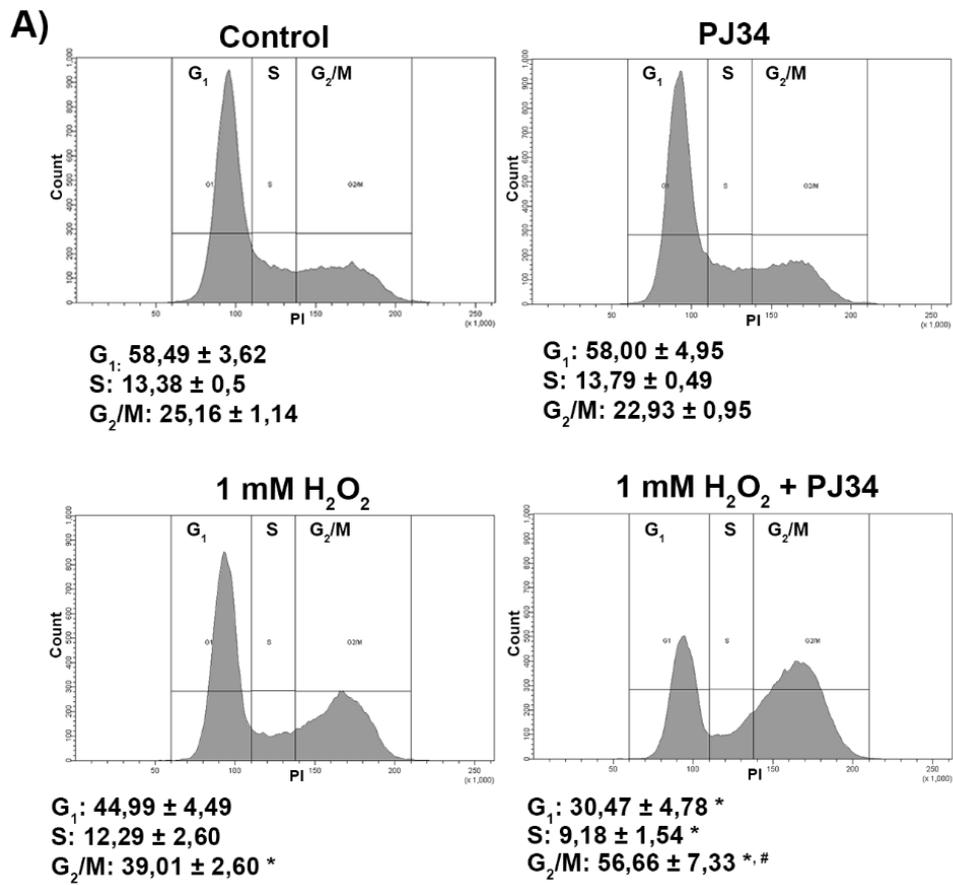
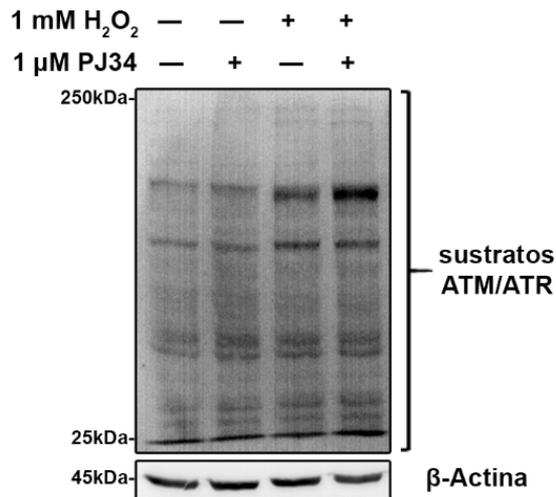
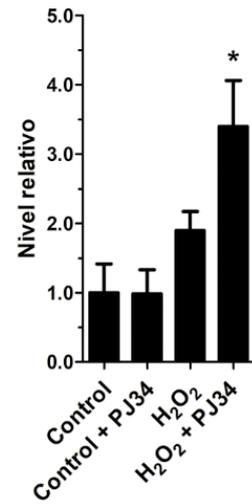


Figura 31. Actividad de las quinasas ATM/ATR tras el tratamiento con H₂O₂ e inhibición de PARP-1. **A)** *Western Blot* para la detección de sustratos fosforilados por las quinasas ATM/ATR en la línea celular retiniana tratada con H₂O₂ (30 minutos) e incubada posteriormente (6 horas) en medio fresco, en presencia o ausencia del inhibidor PJ34. La cantidad de proteínas se normalizó frente a β -actina. *Western Blot* representativo de 3 ensayos independientes. **B)** Cuantificación de los niveles de sustratos ATM/ATR mediante densitometría de tres *Western Blots* independientes. Se cuantificó la misma banda (más representativa) en todos los *Western Blots* realizados. Las barras representan la media (\pm SEM) de los *blots* analizados (*p < 0.05 respecto al control). **C)** *Western Blot* para la detección de sustratos fosforilados por las quinasas ATM/ATR en de explantes de retina de ratón P12 tratados con H₂O₂ (30 minutos) e incubados posteriormente (12 horas) en medio fresco, en presencia o ausencia del inhibidor PJ34. La cantidad de proteínas se normalizó frente a β -tubulina. *Western Blot* representativo de 3 ensayos independientes **D)** Cuantificación de los niveles de sustratos ATM/ATR mediante densitometría de tres *Western Blot* independientes de explantes de retina. Se cuantificó la misma banda (más representativa) en todos los *Western Blot* realizados. Las barras respresentan la media (\pm SEM) de los *blots* analizados.

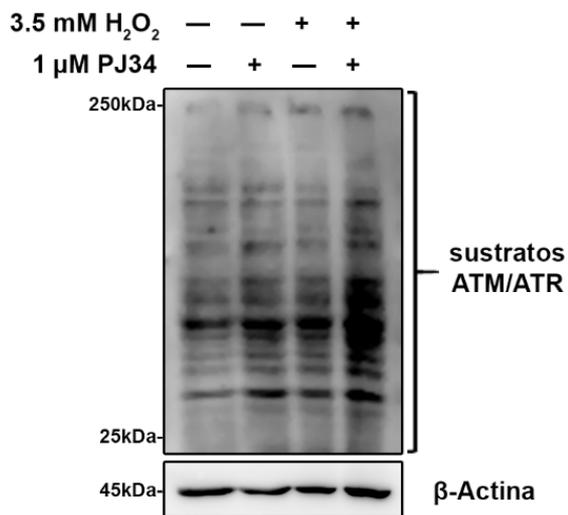
A) Línea celular 661W



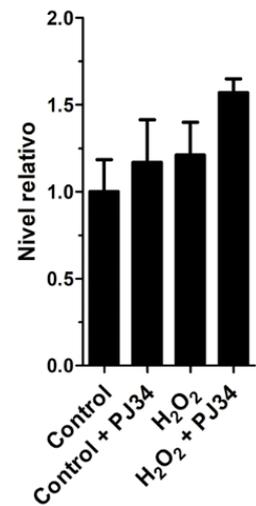
B) Línea celular 661W



C) Explantes de retina



D) Explantes de retina



4.3. La inhibición de PARP-1 previene la fragmentación mitocondrial y la muerte celular de hepatocitos sometidos a estrés oxidativo

El hígado es un órgano con un papel importante en la detoxificación, por lo que alteraciones en su composición o daños en sus componentes puede ocasionar el desarrollo de patologías. Al igual que sucedía en la retina, el estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo y la progresión de enfermedades hepáticas (Muriel, 2009). Anteriormente, en el modelo de retina, se ha establecido que el tratamiento con peróxido de hidrógeno, agente inductor de ROS, estimula la activación de la enzima PARP-1, y que la inhibición de esta potencia la muerte celular desencadenada por dicho estrés. Dado que la presencia de altos niveles de ROS está asociada con procesos degenerativos en hepatocitos, y puesto que una situación de estrés oxidativo puede conllevar a la activación de PARP-1 (tal y como se ha visto en el modelo de retina), en esta sección se ha evaluado el papel de PARP-1 en la supervivencia y funcionalidad de los hepatocitos humanos sometidos a estrés oxidativo. Para ello, se ha utilizado la línea celular humana WRL68, considerada como un modelo *in vitro* de hepatocitos humanos (Gutierrez-Ruiz et al., 1994), a la que se le ha sometido a un tratamiento con H₂O₂ en presencia o ausencia de distintos inhibidores de PARP-1.

4.3.1. El estrés oxidativo reduce la viabilidad celular de la línea celular hepática WRL68

El efecto del tratamiento oxidativo sobre la viabilidad celular en las células WRL68 se evaluó mediante el tratamiento de las células durante 30 minutos con distintas concentraciones de H₂O₂ y tras la posterior incubación de las mismas en medio fresco durante 24 horas (Figura 32). Al final de este periodo se midió la viabilidad usando el ensayo MTT. Los resultados mostraron una bajada de la viabilidad celular conforme se incrementaba la dosis de H₂O₂ (Figura 33A). Por ello, dicho descenso fue interpretado como dosis dependiente, de tal manera que a concentraciones bajas y media de H₂O₂ el descenso en la viabilidad era menos acusado (desde 0.25 a 1 mM de H₂O₂), en

comparación con el uso de dosis más elevadas de H₂O₂ (entre 2.5 y 5 mM) (Figura 33A).

Con la finalidad de demostrar que el descenso en la viabilidad celular se asociaba con la generación intracelular de ROS inducidas con el tratamiento con H₂O₂, se llevó a cabo un análisis de la cantidad intracelular de ROS mediante la detección por citometría de flujo del compuesto fluorescente DCF (Figura 33B). Este estudio mostró que el mayor porcentaje de células positivas para DCF (indicativo de la presencia intracelular de ROS) se obtenían a los 15 y 30 minutos de iniciado el tratamiento con H₂O₂ (a una concentración de 3.5 mM); dicho porcentaje disminuía drásticamente a tiempos posteriores (Figura 33B). Asimismo, solo concentraciones de H₂O₂ a partir de 2.5 mM fueron capaces de generar niveles significativos de ROS durante los primeros 15 minutos de tratamiento (Figura 33C), correlacionándose estos niveles con el descenso acusado en la viabilidad celular mostrados por estas células cuando fueron tratadas con las concentraciones más elevadas de peróxido (Figura 33A).

4.3.2. El tratamiento con H₂O₂ induce la activación de PARP-1 en las células hepáticas

La presencia de ROS en el interior celular puede generar roturas en el ADN que a su vez pueden desencadenar la activación de la enzima PARP-1 (Hegedus y Virag, 2014); por ello, en el presente epígrafe se estudió la posible activación de PARP-1 en las células hepáticas sometidas al tratamiento con H₂O₂ mediante la detección por inmunofluorescencia del polímero PAR (Figura 34). En primer lugar, se estableció el tiempo óptimo para la visualización de la actividad de PARP-1, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la línea celular 661W, donde el tiempo transcurrido desde el inicio de tratamiento oxidativo hasta la visualización del polímero de PAR resultó ser relativamente corto (15 minutos). En este caso, se pudo comprobar que en las células hepáticas la activación de PARP-1 tras el daño oxidativo era un proceso rápido, semejante a lo visto en las células derivadas de fotorreceptores: el mayor

número de células que presentaban marcaje para el polímero de PAR se observaron a los 15 minutos de iniciado el tratamiento (Figura 34A), produciéndose posteriormente un drástico descenso de este marcaje. Cabe destacar que el mayor marcaje del polímero de PAR, y por tanto la mayor activación de PARP-1, coincidió temporalmente con el periodo donde se generó una mayor cantidad de ROS intracelular.

Una vez determinado el periodo en el que se producía la mayor activación de PARP-1, a los 15 minutos del tratamiento con 3.5 mM de H₂O₂, se analizó el grado de activación de PARP-1 en este tiempo utilizando distintas concentraciones de H₂O₂. Estos experimentos mostraron un aumento progresivo de la actividad de PARP-1 conforme se incrementaba la concentración de H₂O₂ (Figura 34B), del mismo modo que sucedía con los niveles intracelulares de ROS (Figura 33C).

En resumen, analizando los resultados anteriores se puede concluir que el tratamiento de las células hepáticas con concentraciones bajas de H₂O₂ (entre 0.25 y 0.5 mM) apenas induce la formación intracelular ROS (Figura 33C) y la activación de PARP-1 (Figura 34B, C), generando una leve disminución de la viabilidad celular (Figura 33A). Por el contrario, concentraciones elevadas de H₂O₂ (entre 2.5 y 5 mM) inducen la formación de grandes cantidades de ROS (Figura 33C), que se correlacionan con una mayor actividad de PARP-1 (Figura 34B, C) y con un descenso acusado de la viabilidad celular (Figura 33A). De todas las concentraciones de H₂O₂ ensayadas, la correspondiente a 3.5 mM fue seleccionada como concentración a usar en los sucesivos experimentos dado que producía una fuerte activación de PARP-1, incrementaba considerablemente la presencia de ROS e inducía notablemente una bajada de la viabilidad celular.

4.3.3. Los inhibidores de PARP-1 y el sustrato NAD⁺ incrementan la viabilidad de las células hepáticas sometidas a estrés oxidativo

Como se ha comentado en la Introducción de esta Tesis, la sobreactivación de PARP-1 ha sido relacionada con la inducción de procesos de muerte celular (Ha y Snyder, 1999). Por tanto, a continuación, se quiso evaluar si dicha activación estaba relacionada con la bajada en la viabilidad celular observada en las células hepáticas sometidas a estrés oxidativo. Con esta finalidad, se procedió a llevar cabo la inhibición de la actividad enzimática de PARP-1 mediante los inhibidores farmacológicos PJ34 y AG14361, ambos a una concentración final de 1 μ M, dado que concentraciones más altas resultaron ser por sí mismas citotóxicas (Figura 35A). Previamente se evaluó mediante inmunofluorescencia el efecto inhibitorio de estos inhibidores sobre la actividad de poli-ADP-ribosilación (Figura 35B). Los resultados de viabilidad mostraron la capacidad de los inhibidores de PARP-1 para contrarrestar la bajada de viabilidad inducida con el tratamiento con H₂O₂, observándose un incremento de la viabilidad de un $27.3 \pm 6.1\%$ y $32.7 \pm 5.5\%$ cuando se usó el inhibidor PJ34 o el AG14361, respectivamente (Figura 36A). Dada la estructura química de los inhibidores (Figura 11), se quiso descartar que los efectos observados en la viabilidad celular no se debieran a una interacción directa de estos con ROS, y por tanto, que estuvieran bloqueando directamente la generación de estas especies. Por ello se cuantificó de nuevo los niveles de ROS en presencia de estos inhibidores, y se observó que a los 15 minutos de iniciado el tratamiento con H₂O₂ seguían produciéndose niveles de ROS idénticos a los obtenidos en ausencia de los inhibidores (Figura 36B). En su conjunto, estos resultados indican que los inhibidores de PARP-1 (PJ34 y AG14361) incrementan la supervivencia de las células hepáticas sometidas al tratamiento oxidativo con H₂O₂ debido exclusivamente al bloqueo de la actividad de poli-ADP-ribosilación de esta enzima. Además, dado que el inhibidor PJ34 es específico tanto para la enzima PARP-1 como PARP-2, y el AG14361 solo para PARP-1, y dado que los resultados en cuanto a la recuperación de la viabilidad celular son muy semejantes para ambos inhibidores, se puede concluir que la enzima implicada en la actividad de poli-

ADP-ribosilación, y por tanto, responsable de la bajada de la viabilidad en las células hepáticas es PARP-1 y no PARP-2.

Una de las vías por la que una excesiva sobreactivación de la enzima PARP-1 puede derivar en la muerte de la célula tiene su origen en el excesivo consumo del sustrato NAD^+ que se produce en estas condiciones al activarse PARP-1, lo que induce una situación de deficiencia energética que conlleva la muerte de la célula (Ha y Snyder, 1999). En nuestro modelo se estudió si el incremento de la actividad de PARP-1 podría estar ocasionando una situación similar a la descrita anteriormente, es decir, si la bajada de viabilidad observada en la línea celular WRL68 estaba ocasionada por una deficiencia de NAD^+ . Para ello se administró al cultivo celular el sustrato NAD^+ , a una concentración final de 0.25 mM (Pillai et al., 2005; Zhu et al., 2016), tanto en la etapa de tratamiento con H_2O_2 (durante 30 minutos) como en el periodo de post-incubación en medio fresco (durante 24 horas), tras lo cual se analizó la viabilidad celular (Figura 32). Este ensayo puso de manifiesto que la administración exógena de NAD^+ , al igual que ocurría con los inhibidores de PARP-1, tenía un efecto positivo en la recuperación de los valores de viabilidad celular tras el tratamiento oxidativo (Figura 36C). Este resultado apoyaría la hipótesis de que la activación de PARP-1 inducida por el H_2O_2 podría estar causando una caída severa en los niveles intracelulares de NAD^+ , lo cual tendría un efecto negativo sobre la supervivencia celular.

4.3.4 La muerte celular inducida en las células hepáticas mediante el tratamiento oxidativo posee características de apoptosis y es contrarrestada por el inhibidor PJ34

Un aspecto clave en este estudio era comprobar si la bajada de la viabilidad celular tras el daño oxidativo se correspondía con un aumento de los procesos de muerte celular, y sobre todo, determinar qué tipo de muerte se estaba produciendo en estas condiciones oxidativas. En este caso, la muerte celular se determinó mediante la detección de la traslocación del fosfolípido fosfatidilserina (utilizando la sonda fluorescente anexina V-FITC) y la captación

por parte de las células de una solución de yoduro de propidio, usando para ello la citometría de flujo. Mediante esta técnica se pudo comprobar que el descenso en la viabilidad celular tras el tratamiento oxidativo se correlacionaba con un incremento significativo en la cantidad de células positivas para el marcaje anexina V e yoduro de propidio, indicativo de eventos de apoptosis tardía (Figura 37A, B); en cambio, en las condiciones oxidativas el inhibidor PJ34 mostró una marcada reducción del porcentaje de células positivas para anexina V e yoduro de propidio (Figura 37A, B). Estos resultados indican que el proceso de muerte celular inducido por el tratamiento oxidativo, y en el que PARP-1 parece tener un papel relevante, presenta características similares a la apoptosis versus necrosis. Para probar lo anterior, se analizó además la liberación al medio extracelular de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), ensayo utilizado para detectar la presencia de necrosis en los cultivos celulares (Chan et al., 2013). De esta manera se pudo comprobar que no existía una liberación significativa de la enzima LDH al medio extracelular cuando las células eran sometidas al tratamiento con H_2O_2 (Figura 37C), lo que sugiere que este tratamiento no induce procesos de necrosis. Un dato que apoya estos resultados es que en los citogramas de la Figura 37B apenas se observan en las condiciones oxidativas (3.5 mM de H_2O_2) células que únicamente muestren marcaje para el yoduro de propidio, lo que demuestra de nuevo la no existencia de necrosis. Por otro lado, el inhibidor PJ34 tampoco afectó a la liberación de LDH en estas condiciones (Figura 37C). Estos resultados muestran claramente como la muerte celular que se produce en las células hepáticas tras el tratamiento con H_2O_2 es de tipo apoptótica y no necrótica.

4.3.5. El tratamiento oxidativo induce una fragmentación mitocondrial en las células hepáticas que es revertida con la inhibición de PARP-1 y con la administración de NAD^+

El estrés oxidativo desencadenado por altos niveles de ROS intracelular puede producir daños en la mitocondria y desencadenar la muerte celular (Guo et al., 2013). Puesto que el tratamiento con H_2O_2 en nuestro modelo generaba

altos niveles de ROS intracelular, así como un descenso significativo en la viabilidad celular, se quiso determinar si en estas condiciones se estaban produciendo alteraciones en la función mitocondrial que pudieran justificar los procesos de muerte celular observados. En primer lugar, se estudió los cambios en la morfología mitocondrial, ya que estos se pueden relacionar con alteraciones en su función mitocondrial (Galloway y Yoon, 2012), de tal manera que una morfología globular es indicativo de procesos de fragmentación (o fisión mitocondrial) que se asocian a estados de baja fosforilación oxidativa, mientras que una morfología tubular o ramificada (o fusión mitocondrial) es indicativo de una mayor tasa de fosforilación oxidativa, y por tanto, de un estado energéticamente favorable en la célula. Para realizar este estudio sobre la morfología mitocondrial se usó el programa informático MicroP (Peng et al., 2011), a partir de inmunocitoquímicas teñidas con el marcador mitocondrial *Mitotracker*, tras la exposición de las células hepáticas al H₂O₂ y su posterior incubación en medio fresco durante 2 y 4 horas. Las mitocondrias fueron clasificadas de acuerdo a su morfología y tamaño en dos tipos principales, mitocondrias tipo I o globulares, y mitocondrias tipo II o tubulares (ver sección 3.15.1 de materiales y métodos). Las mitocondrias tipo I se corresponden con mitocondrias de pequeño tamaño, morfología esférica o globular; mientras que el tipo II o mitocondrias tubulares se corresponde con mitocondrias de morfología alargada con presencia o no de ramificaciones. El análisis de la morfología mitocondrial mostró que las células sin tratar (control) presentaban amplias redes mitocondriales organizadas a lo largo de todo el citoplasma con una morfología mayoritariamente de tipo tubular (tipo II, Figura 38A). Sin embargo, 2 horas después del tratamiento oxidativo se produjeron cambios significativos en la distribución y morfología mitocondrial, observándose las mitocondrias agrupadas en la zona perinuclear y con un predominio de mitocondrias globulares (tipo I, Figura 38A). La cuantificación de los subtipos mitocondriales, mostró que los controles presentaban un $50.1 \pm 1.7\%$ de mitocondrias tipo II y un $48.6 \pm 1.4\%$ de mitocondrias tipo I (Figura 38B). A diferencia de los controles, las células tratadas con H₂O₂ mostraron un descenso significativo en el porcentaje de mitocondrias tipo II, observándose solo un $33.5 \pm 1.6\%$ de mitocondrias tipo II, y a su vez mostrando un

incremento significativo del subtipo I (valor = $65.9 \pm 1.7\%$, Figura 38B). En segundo lugar, se cuantificó el índice de elongación de las mitocondrias, un indicador obtenido a partir del eje mayor y menor de la mitocondria (ver sección 3.16.1 de materiales y métodos). Respecto a este parámetro, el tratamiento con H_2O_2 indujo un descenso significativo en este índice (Figura 38C) con respecto al valor obtenido para la situación control, lo que indica una disminución en la elongación de las mitocondrias, compatible con una pérdida de la morfología tubular tras el tratamiento oxidativo. Además, se evaluó el área de las mitocondrias, y se observó de nuevo un descenso significativo de esta área en las células tratadas con H_2O_2 en comparación con los controles (Figura 38D). En su conjunto, todos estos datos apoyan la hipótesis de que el tratamiento oxidativo induce una rápida fragmentación mitocondria que podría estar relacionada con el descenso de NAD^+ descrito anteriormente.

El análisis de los parámetros anteriores a tiempos posteriores, 4 horas después del tratamiento oxidativo, mostró un incremento más acusado en la cantidad de mitocondrias tipo I, así como una mayor reducción en el índice de elongación y en el área mitocondrial (Figura 39). Estos resultados muestran que una exposición corta de 30 minutos a altas concentraciones de H_2O_2 induce cambios significativos en la distribución, morfología y tamaño mitocondrial en las células hepáticas, apareciendo estos cambios en etapas tempranas tras la exposición con H_2O_2 .

Con la finalidad de corroborar que las ROS generadas por el tratamiento con H_2O_2 eran las responsables de los cambios observados en la morfología mitocondrial, se procedió a neutralizar las ROS y evaluar de nuevo los cambios en la morfología mitocondrial. Para ello se incubó con piruvato sódico (PS), compuesto ampliamente utilizado para la eliminación y neutralización de ROS (Hinoi et al., 2006; Kladna et al., 2015; Wang et al., 2007), las células sometidas al tratamiento oxidativo con H_2O_2 . En primer lugar, se corroboró la capacidad del PS para neutralizar la generación de ROS; y efectivamente, se pudo comprobar que el PS en las células tratadas con H_2O_2 bloqueaba de manera efectiva la producción de grandes cantidades de ROS (Figura 40A). Por tanto, a continuación, se analizó la morfología mitocondrial y se observó

que la presencia de PS, agente neutralizador de ROS, era capaz de disminuir la cantidad de mitocondrias tipo I inducidas por el tratamiento con H_2O_2 , e incrementar la cantidad de mitocondrias de tipo II, mostrando valores muy similares a la situación control (Figura 40B). Estos resultados confirman que las ROS asociadas al tratamiento con H_2O_2 eran capaces de generar cambios en la distribución, morfología y tamaño mitocondrial en las células hepáticas, compatibles con un proceso de fragmentación mitocondrial, dado que la aparición de mitocondrias de pequeño tamaño, con morfología globular y distribución perinuclear se ha relacionado con eventos de fragmentación o fisión mitocondrial, que cuando aparecen en exceso pueden desencadenar la muerte de la célula (Boland et al., 2013).

A continuación, se evaluó si la inhibición de PARP-1 era capaz de revertir los cambios morfológicos inducidos en las mitocondrias tras el tratamiento oxidativo; la inhibición de PARP-1, bien con el inhibidor PJ34 o con el AG14361, produjo a las 2 horas posteriores al tratamiento oxidativo un notable incremento en la proporción de mitocondrias con morfología tubular (tipo II) en comparación con la situación sin inhibidor (Figura 41A, B). Además, se observó en presencia de los inhibidores una clara redistribución de las mitocondrias en el citoplasma celular, distribuyéndose de nuevo a modo de redes mitocondriales por todo el citoplasma (Figura 41A). Asimismo, la inhibición de PARP-1 disminuyó la presencia de mitocondrias globulares (tipo I) tras el tratamiento con H_2O_2 (Figura 41A, B). Además, las mitocondrias analizadas en presencia de los inhibidores de PARP-1 en condiciones oxidativas mostraron un índice de elongación y un área muy próximo a la situación control (Figura 41C, D). Por último, el análisis de la morfología mitocondrial en estas condiciones de inhibición de PARP-1, pero a tiempos posteriores de incubación (4 horas), mostró similares resultados que los obtenidos a tiempos más cortos (2 horas), con la salvedad que los cambios observados en la morfología mitocondrial fueron mucho más acusados (Figura 42).

Previamente se ha mostrado que la administración exógena de NAD^+ incrementa la viabilidad de las células hepáticas sometidas al tratamiento con

H₂O₂, al igual que lo hacían los inhibidores de PARP-1 (Figura 36C). Por ello se analizó también si la administración de NAD⁺ era capaz de revertir los cambios observados en la morfología y distribución mitocondrial tras el daño oxidativo, comprobándose que efectivamente la administración de NAD⁺ revertía dichos cambios, observándose de nuevo una distribución homogénea de las mitocondrias por el citoplasma celular (Figura 41A), un descenso en el porcentaje de mitocondrias globulares (tipo I) y un incremento en el porcentaje de mitocondrias tubulares o de tipo II (Figura 41B). De igual forma, el NAD⁺ incrementó tanto el índice de elongación como el área mitocondrial tras el tratamiento con H₂O₂ (Figura 41C, D).

Finalmente, los resultados obtenidos sobre la morfología mitocondrial usando el programa MicroP y las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal fueron corroborados mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) analizando la ultraestructura de las mitocondrias. Las micrografías obtenidas a partir de células control mostraban mitocondrias con morfología mayoritariamente tubular que presentaban gran cantidad de crestas (Figura 43A, B); sin embargo, las micrografías obtenidas a partir de las células tratadas con H₂O₂ e incubadas posteriormente durante 2 horas mostraban mitocondrias de pequeño tamaño con morfología esférica y ausencia de crestas en la mayoría de los casos (Figura 43A, B). Cuando se administró el inhibidor PJ34 a las células tratadas con el H₂O₂ se pudo observar que las mitocondrias presentaban de nuevo mitocondrias con morfología tubular y con gran cantidad de crestas en su interior (Figura 43A, B).

En definitiva, los resultados anteriores indican que el tratamiento oxidativo con H₂O₂ induce una clara fragmentación y disfunción mitocondrial (motivada por la pérdida de crestas mitocondriales) en las células hepáticas, fenómeno que es revertido tanto por los inhibidores de la enzima PARP-1 como por la administración exógena de NAD⁺, sustrato de dicha enzima.

4.3.6. La inhibición de PARP-1 evita la caída de los niveles intracelulares de ATP inducida por el tratamiento oxidativo

Un aspecto clave para determinar que en una célula se está produciendo una disfunción mitocondrial es cuantificar los niveles intracelulares de ATP, ya que si estos son bajos indicarían un incorrecto funcionamiento de las mitocondrias, con graves consecuencias para la célula (Galloway y Yoon, 2012). Para comprobar esta posibilidad, se midieron los niveles intracelulares de ATP en las células hepáticas, en presencia o ausencia del inhibidor AG14361, a las 2 horas de iniciado el tratamiento oxidativo. Los resultados mostraron una caída significativa de los niveles intracelulares de ATP tras el tratamiento oxidativo (Figura 44A), indicativo de una alteración en la función mitocondrial; sin embargo, la administración del inhibidor AG14361 en estas condiciones contrarrestó significativamente dicha caída, manteniéndose dichos valores muy próximos a la situación control (Figura 44A). De igual forma, la administración exógena de NAD⁺ mostró un efecto protector, restaurando los niveles intracelulares de ATP (Figura 44B).

En resumen, estos resultados muestran como la activación de PARP-1 durante el tratamiento oxidativo induce un proceso de fragmentación y disfunción mitocondrial que culmina con la muerte de la célula. Este proceso parece estar desencadenado por un déficit de NAD⁺ como consecuencia de la sobreactivación de PARP-1. Por ello, bien la inhibición de PARP-1 o la administración exógena del sustrato NAD⁺, en estas condiciones oxidativas, contrarresta dichos fenómenos e incrementa la viabilidad de los hepatocitos.

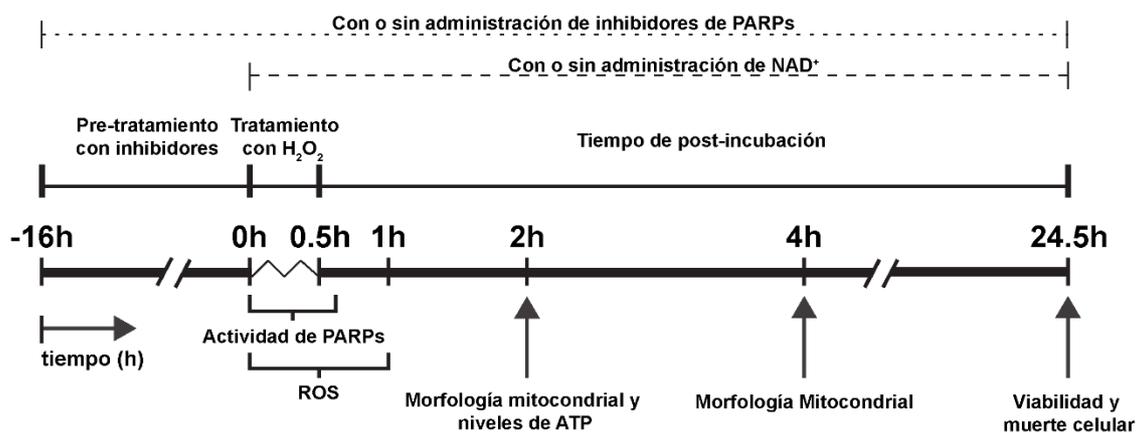


Figura 32. Resumen de tratamientos y metodología empleada en la línea celular hepática WRL68. La inducción de estrés oxidativo se generó mediante el tratamiento de la línea celular con una única dosis de H₂O₂ durante 30 minutos y su posterior incubación en medio fresco sin H₂O₂. La actividad de PARP-1 se cuantificó durante los 30 minutos de tratamiento, y 15 minutos posteriores tras la sustitución del medio por medio fresco. Los niveles de ROS intracelulares se midieron durante los primeros 30 minutos de tratamiento, y hasta una hora después del tratamiento con H₂O₂. La viabilidad y muerte celular se evaluó 24 horas después del tratamiento. La morfología mitocondrial se evaluó tras el tratamiento con H₂O₂ (30 minutos) y la posterior incubación en medio fresco durante 2 y 4 horas. Los niveles de ATP midieron tras el tratamiento con H₂O₂ y la posterior incubación de 2 horas en medio fresco. Los inhibidores se administraron 16 horas antes del tratamiento con H₂O₂ y estuvieron presentes durante toda la duración de los ensayos. La administración exógena de NAD⁺, se realizó durante el tratamiento con H₂O₂ y durante la posterior incubación en medio fresco.

Figura 33. Análisis de la viabilidad celular y la producción de ROS tras el tratamiento con H₂O₂ en la línea celular WRL68. **A)** Viabilidad celular de la línea WRL68, medida con MTT, tras el tratamiento con distintas dosis de H₂O₂ durante 30 minutos, y su posterior incubación en medio fresco durante 24 horas. La viabilidad celular se muestra como el porcentaje de viabilidad respecto al control (células no tratadas), el cual se considera con una viabilidad del 100%. Se muestra la media (\pm SEM) del porcentaje de viabilidad de tres ensayos independientes (*p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001 respecto al control). **B)** Cuantificación de los niveles de ROS por citometría de flujo (expresado como el porcentaje de células DCF positivas) durante el tratamiento con H₂O₂ (0-30 minutos) y tras el tratamiento (15 y 30 minutos de post-incubación en medio fresco, referidos como 45 y 60 minutos en el gráfico). Se muestra la media (\pm SEM) del porcentaje de células DCF positivas de tres ensayos independientes (*p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001 respecto al control). **C)** Cuantificación de los niveles de ROS (expresado como porcentaje de células positivas para DCF) durante los primeros 15 minutos de tratamiento con diferentes dosis de H₂O₂. Se muestra la media (\pm SEM) del porcentaje de células DCF positivas de tres ensayos independientes (***p < 0.001 respecto al control).

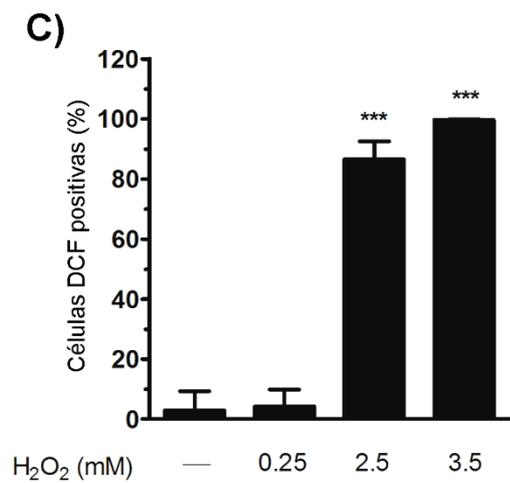
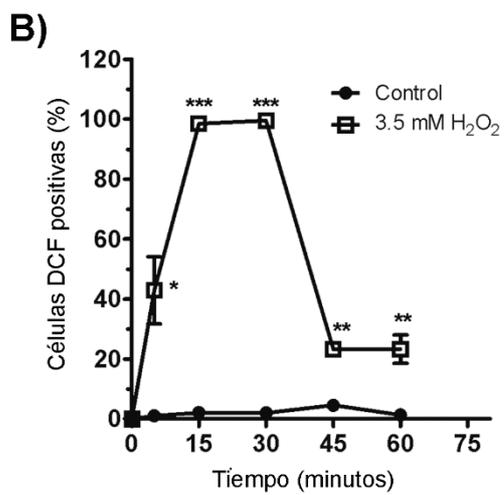
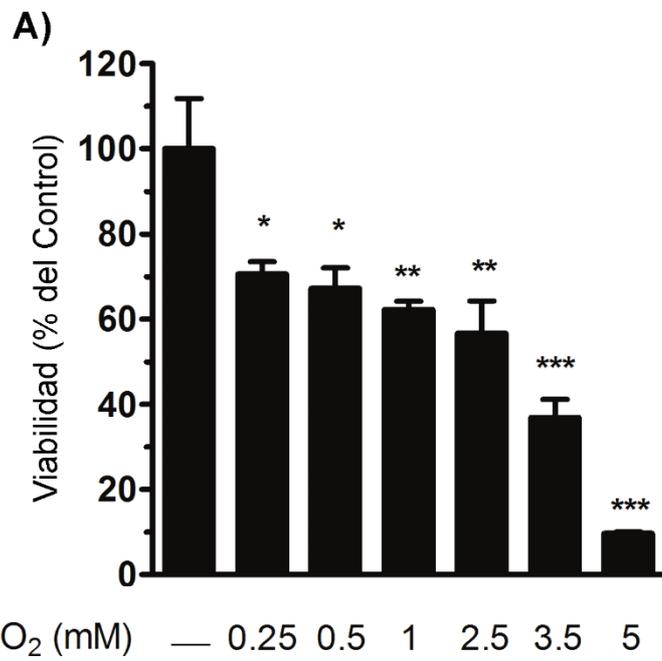


Figura 34. Activación de PARP-1 tras el tratamiento con H₂O₂ en la línea celular WRL68.

A) Cuantificación del porcentaje de núcleos positivos para el polímero PAR en células tratadas con H₂O₂ durante 0, 15 y 30 minutos, y su posterior incubación durante 15 minutos en medio fresco (referido como 45 minutos en el gráfico). Se cuantificaron 200 núcleos por cada condición teñidos con Hoechst y se calculó el porcentaje de núcleos positivos para polímero PAR. Se muestra la media (\pm SEM) de núcleos positivos para polímero PAR de tres ensayos independientes (**p < 0.01 y ***p < 0.001 respecto al control). **B)** Cuantificación del porcentaje de núcleos positivos para el polímero PAR en células tratadas con diferentes dosis de H₂O₂ durante los primeros 15 minutos de tratamiento con H₂O₂. Se cuantificaron 200 núcleos por cada condición teñidos con Hoechst y se calculó el porcentaje de núcleos positivos para polímero PAR. Se muestra la media (\pm SEM) de núcleos positivos para polímero PAR de tres ensayos independientes (*p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001 respecto al control). **C)** Inmunocitoquímica representativa que muestra los núcleos celulares teñidos con Hoechst (azul) y el polímero PAR (verde) de células tratadas con diferentes dosis de H₂O₂ durante 15 minutos (barra de escala: 50 μ m). Imagen representativa de tres ensayos independientes.

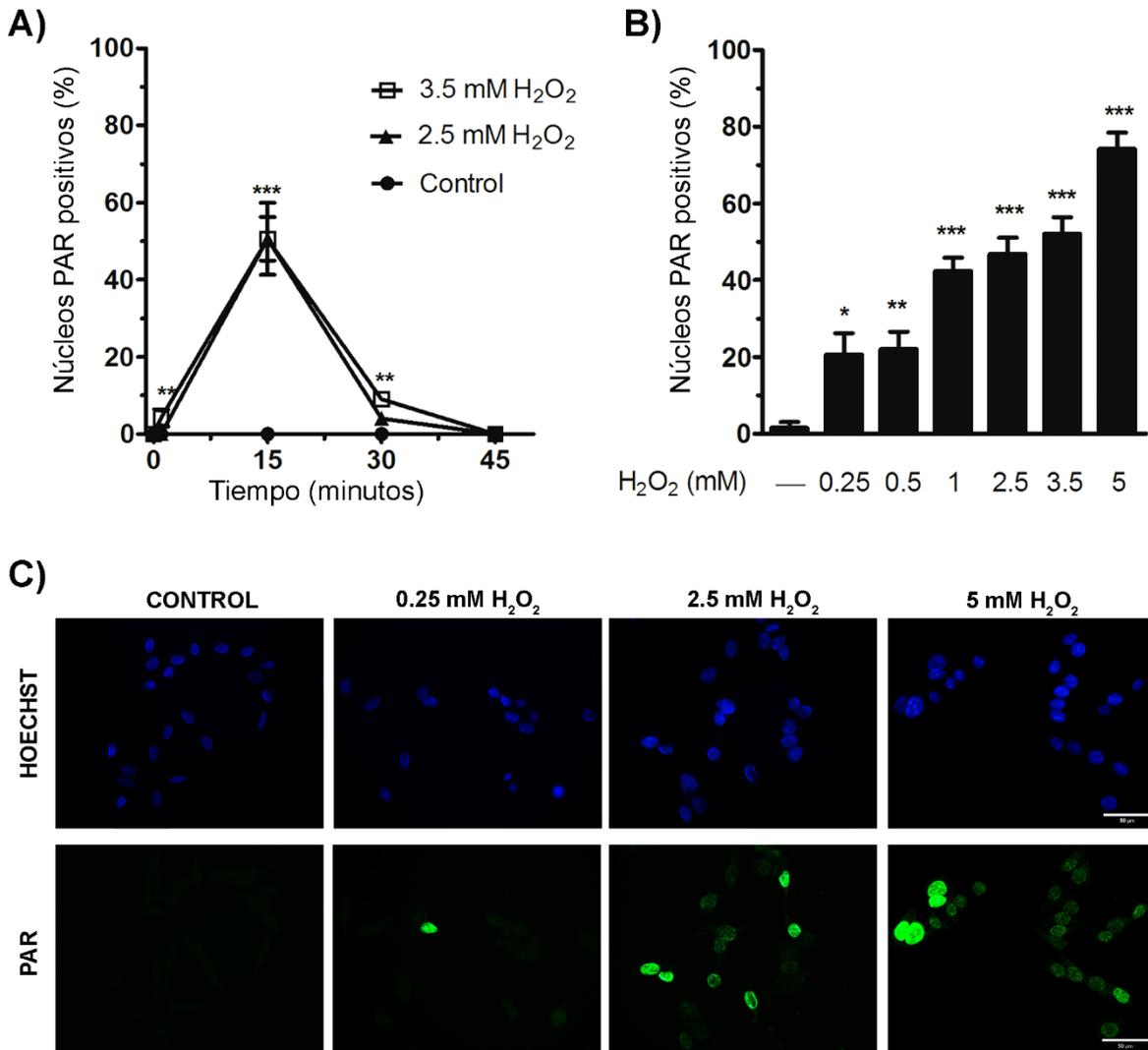
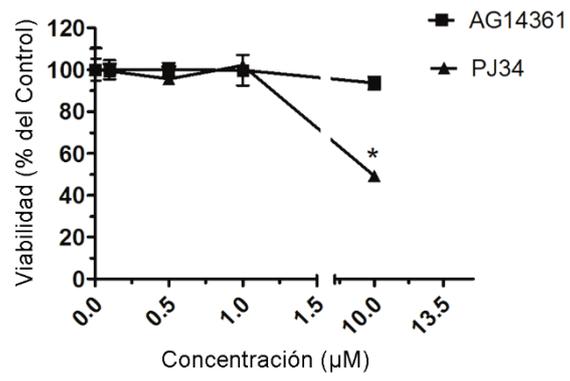


Figura 35. Inhibición de PARP-1 en la línea celular WRL68. A) Viabilidad celular de la línea celular WRL68, medida con MTT, tratada con distintas concentraciones de los inhibidores de PARP-1, PJ34 y AG14361. Para ello las células fueron tratadas 40 horas con los inhibidores, simulando las 16 horas de pretratamiento y las 24 horas posteriores al tratamiento con H₂O₂. La viabilidad celular se muestra como el porcentaje de viabilidad respecto al control (células no tratadas con inhibidor, concentración de 0 μM), el cual se considera con una viabilidad del 100%. Se muestra la media (± SEM) del porcentaje de viabilidad de tres ensayos independientes (*p < 0.05 respecto al control). **B)** Inmunodetección de PAR (verde) y tinción de los núcleos celulares con Hoechst (azul) tras el tratamiento con H₂O₂ durante 15 min en ausencia y en presencia del inhibidor PJ34 a una concentración de 1 μM (barras de escala: 50 μm).

A)



B)

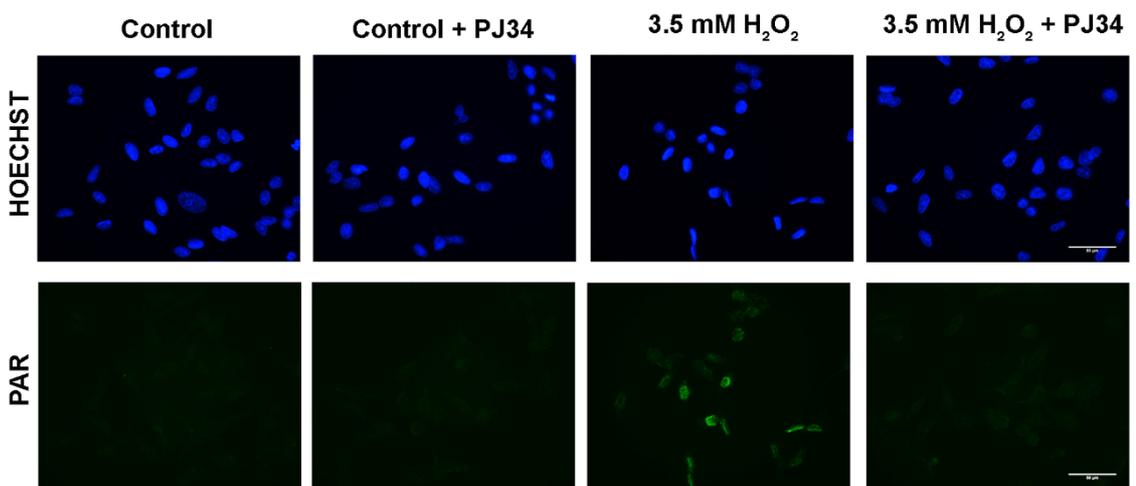


Figura 36. Efecto de los inhibidores de PARP-1 o la administración de NAD⁺ en la viabilidad celular de hepatocitos tratados con H₂O₂. **A)** Viabilidad celular de la línea celular WRL68, medida con MTT, tras el tratamiento con H₂O₂ durante 30 minutos, y su posterior incubación en medio fresco durante 24 horas. Los inhibidores de PARP-1, PJ34 y AG14361, se administraron 16 horas previas al tratamiento y se mantuvieron durante todo el ensayo. La viabilidad celular se muestra como el porcentaje de viabilidad respecto al control (células no tratadas), el cual se considera con una viabilidad del 100%. Se muestra la media (\pm SEM) del porcentaje de viabilidad de cinco ensayos independientes para el inhibidor PJ34, y de tres ensayos independientes para el inhibidor AG14361 (**p < 0.01 y ***p < 0.001 respecto al control; ## p < 0.01 respecto a H₂O₂). **B)** Cuantificación de los niveles de ROS (expresado como porcentaje de células DCF positivas) mediante citometría de flujo durante los primeros 15 minutos de tratamiento con H₂O₂. Los inhibidores de PARP-1, PJ34 y AG14361, se administraron 16 horas previas al tratamiento y se mantuvieron durante todo el ensayo. Se muestra la media (\pm SEM) del porcentaje de células DCF positivas de tres ensayos independientes (***p < 0.001 respecto al control). **C)** Viabilidad celular de la línea celular WRL68, medida con MTT, tras el tratamiento con H₂O₂ durante 30 minutos, y su posterior incubación en medio fresco durante 24 horas, en presencia de 250 μ M de NAD⁺. El NAD⁺ se administró durante el tratamiento con H₂O₂ y se mantuvo hasta el final del ensayo. La viabilidad celular se muestra como el porcentaje de viabilidad respecto al control (células no tratadas), el cual se considera con una viabilidad del 100%. Se muestra la media (\pm SEM) del porcentaje de viabilidad de cuatro ensayos independientes (***p < 0.001 respecto al control; ##p < 0.01 respecto a H₂O₂).

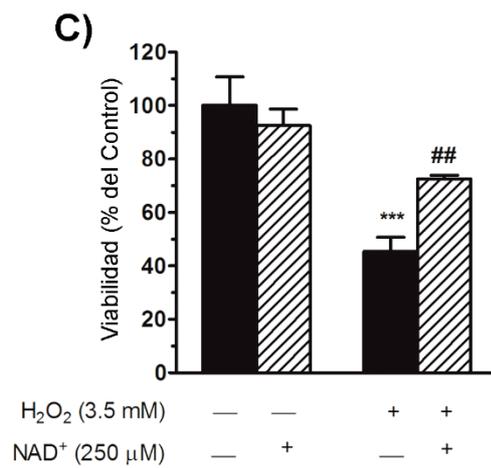
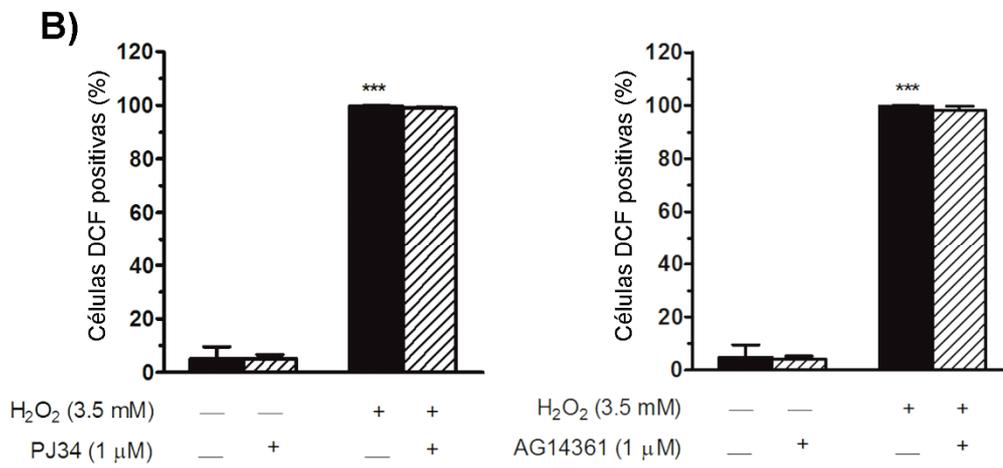
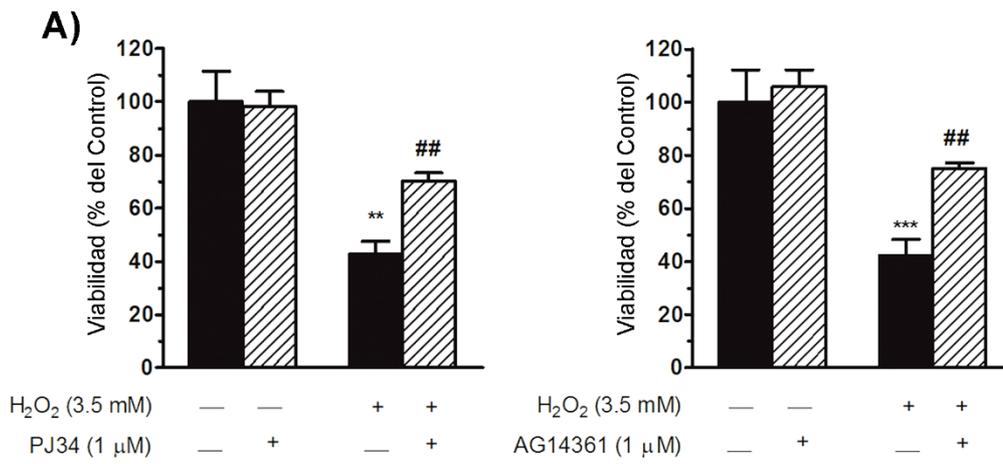


Figura 37. Efecto de la inhibición de PARP-1 en la muerte celular inducida por H₂O₂ en la línea celular WRL68. A) La muerte celular se analizó por citometría de flujo mediante el uso de las sondas fluorescentes anexina V-FITC e ioduro de propidio a las 24 horas del tratamiento con H₂O₂ en presencia o ausencia del inhibidor PJ34. Se muestra un *dot plot* representativo, donde las células se encuentran distribuidas en cuatro cuadrantes (cuadrante inferior izquierdo: células vivas; inferior derecho: células Anexina-V positivas; superior izquierdo: células IP positivas; superior derecho: células Anexina V e IP positivas). **B)** Cuantificación del porcentaje de células apoptóticas (cuadrantes inferior y superior derecho) en células tratadas con H₂O₂ en ausencia y presencia del inhibidor PJ34. Células tratadas con Tritón X-100 1% y STS 6 μM se usaron como controles positivos de necrosis y apoptosis, respectivamente. Se muestra la media (± SEM) del porcentaje de células apoptóticas de tres ensayos independientes (**p < 0.01 respecto al control; #p < 0.05 respecto a 3.5 mM de H₂O₂). **C)** Cuantificación del porcentaje de enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio extracelular, marcador de necrosis, tras el tratamiento con H₂O₂ en presencia y ausencia del inhibidor PJ34, y su posterior incubación durante 24 horas. Células tratadas con Tritón X-100 1% y STS 6 μM se usaron como controles positivos de necrosis y apoptosis, respectivamente. Se muestra la media (± SEM) del porcentaje de LDH liberada de tres ensayos independientes (*p < 0.05 y ***p < 0.001 respecto al control).

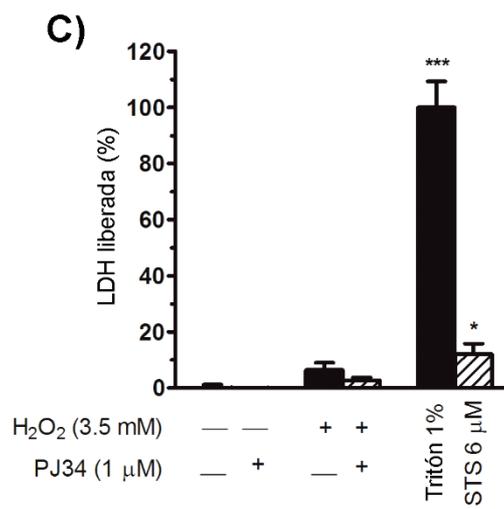
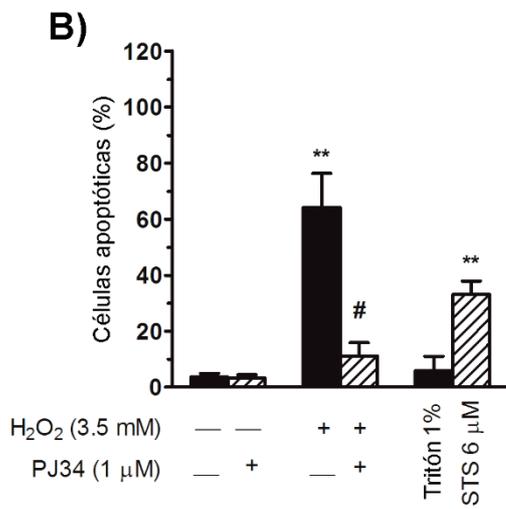
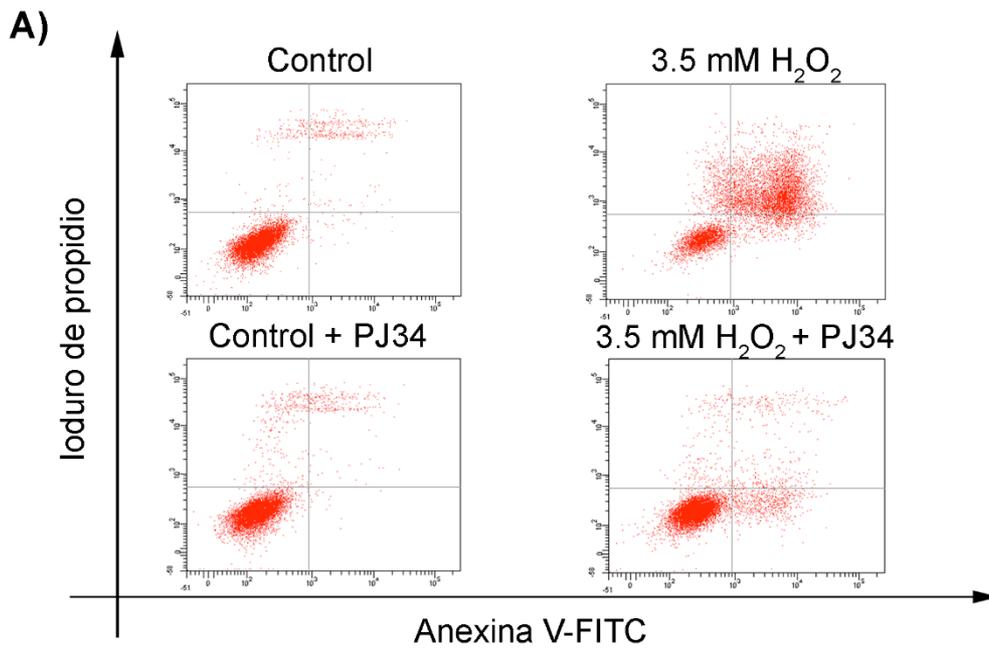
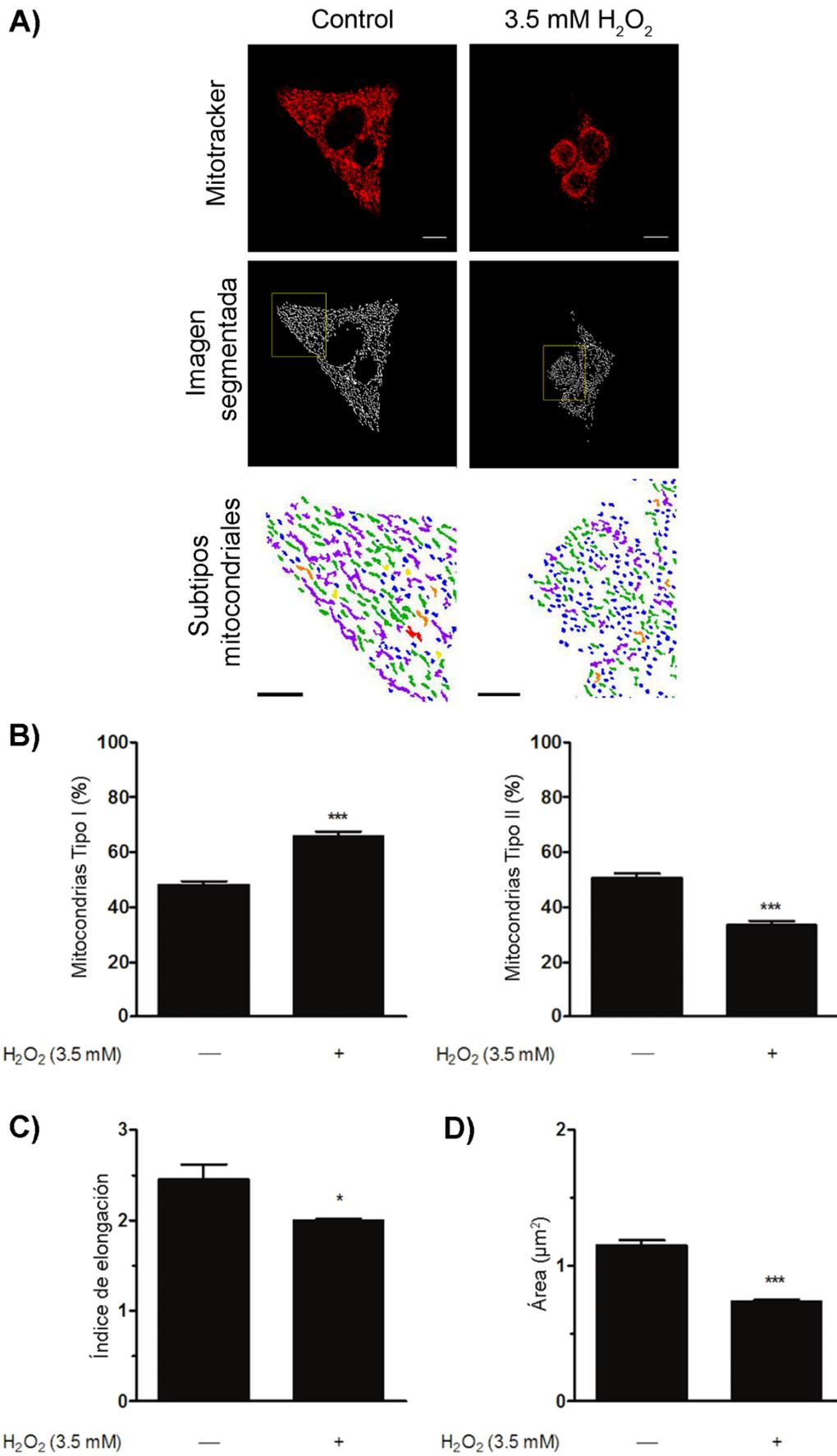


Figura 38. Análisis de la morfología mitocondrial tras el tratamiento con H₂O₂ y 2 horas de post-incubación. **A)** Imágenes de microscopía confocal que muestran células hepáticas teñidas con la sonda mitocondrial *Mitotracker* (rojo) en células tratadas y sin tratar con H₂O₂ durante 30 minutos e incubadas posteriormente 2 horas en medio fresco. Las imágenes eran introducidas en el programa de análisis MicroP (Peng et al., 2011), donde se segmentaban, y finalmente, se obtenía una clasificación en función de la morfología de cada mitocondria en seis subtipos mitocondriales diferentes (ver sección 3.15.1 de materiales y métodos; mitocondrias globulares pequeñas, azul; globulares de mayor tamaño, amarillo; tubulares simples, verde; tubulares curvadas, naranja; tubulares ramificadas, morado, y tubulares en forma de rosquilla, rojo; barra de escala en *Mitotracker*: control 5 μ m y 3.5 mM de H₂O₂ 8 μ m; barra de escala en la clasificación mitocondrial: control 10 μ m y 3.5 mM de H₂O₂ 18 μ m). **B)** Cuantificación del porcentaje de mitocondrias tipo I o globulares, y de mitocondrias tipo II o tubulares, tras la cuantificación con el programa MicroP. **C)** Representación del índice de elongación calculado como el cociente entre la longitud del eje mayor y el eje menor, ambos valores proporcionados por el programa MicroP. **D)** Área mitocondrial obtenida a partir del programa MicroP expresada en μ m. Tanto en B, C y D se cuantificó un mínimo 7000 mitocondrias por condición en cada ensayo; se muestra la media (\pm SEM) de tres ensayos independientes (*p < 0.05 y ***p < 0.001 respecto al control).



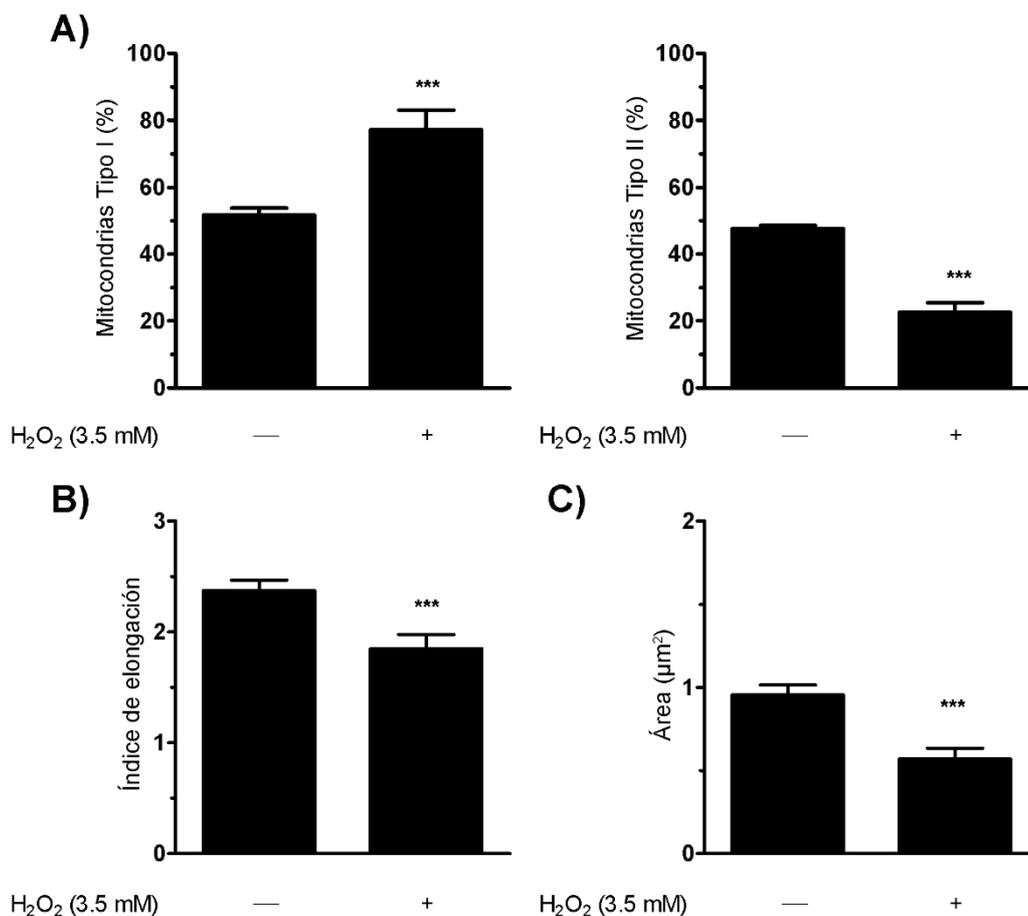


Figura 39. Análisis de la morfología mitocondrial tras el tratamiento con H₂O₂ y 4 horas de post-incubación. **A)** Cuantificación del porcentaje de mitocondrias tipo I o globulares, y de mitocondrias tipo II o tubulares, tras la cuantificación con el programa MicroP, en células tratadas y sin tratar con H₂O₂ durante 30 minutos, incubadas posteriormente 4 horas y teñidas con la sonda *Mitotracker*. Las imágenes eran introducidas en el programa de análisis MicroP, donde se segmentaban, y finalmente, se obtenía una clasificación de cada mitocondria, en seis subtipos mitocondriales diferentes según su morfología (ver Materiales y métodos, sección 3.15.1). **B)** Representación del índice de elongación calculado como el cociente entre la longitud del eje mayor y el eje menor, valores proporcionados por el programa MicroP. **C)** Área mitocondrial obtenida a partir del programa MicroP expresada en μm. Tanto en A, B y C se cuantificó un mínimo 7000 mitocondrias por condición en cada ensayo; se muestra la media (± SEM) de cuatro ensayos independientes (**p < 0.001 respecto al control).

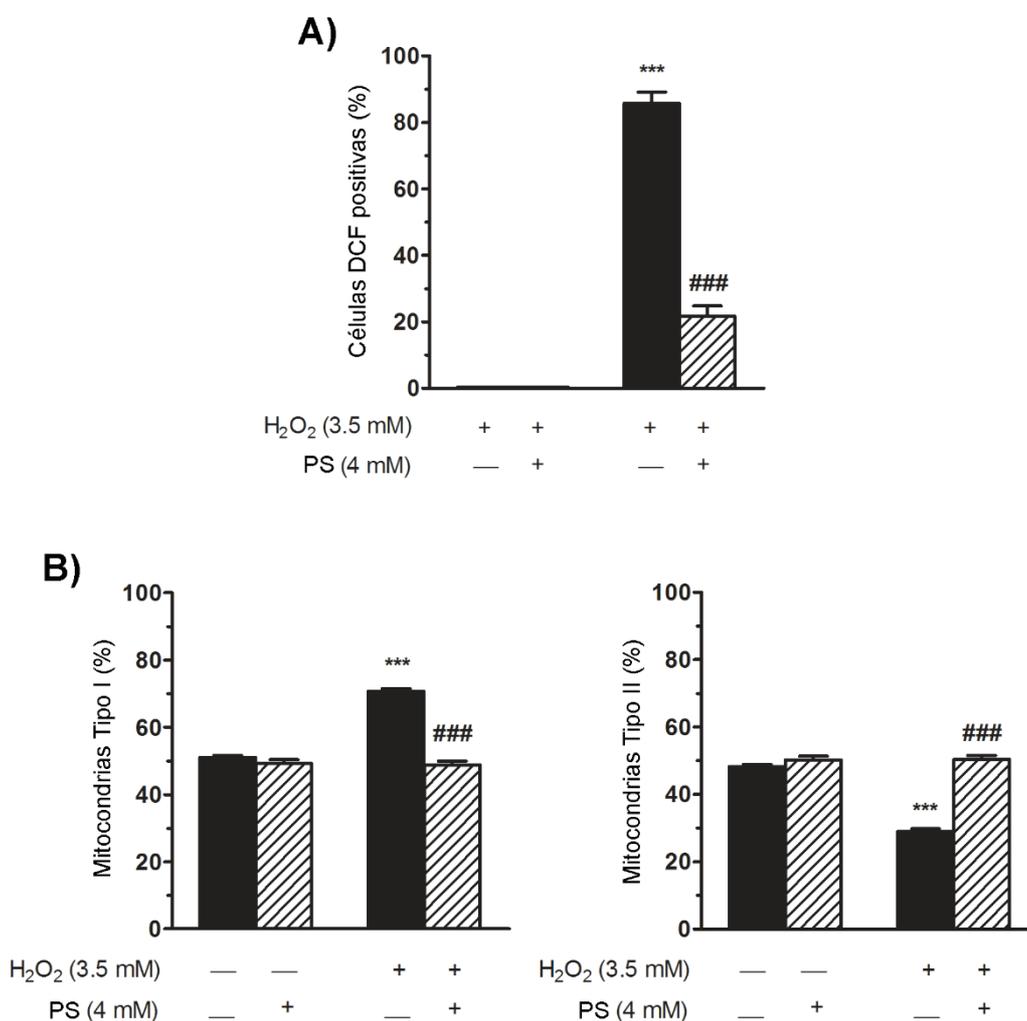
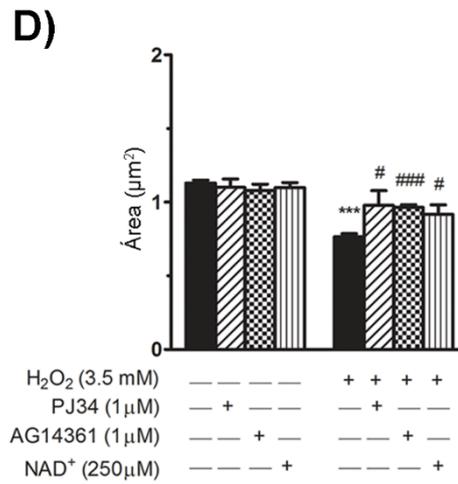
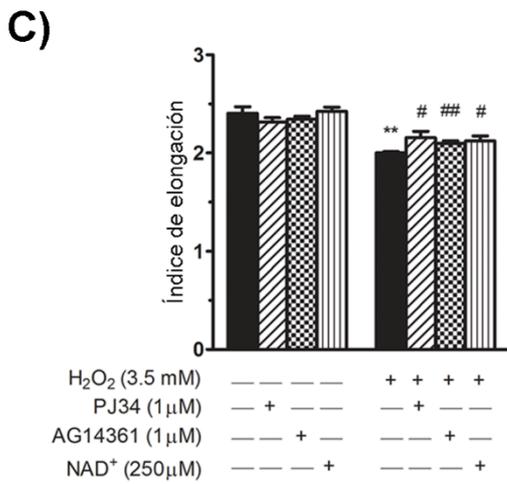
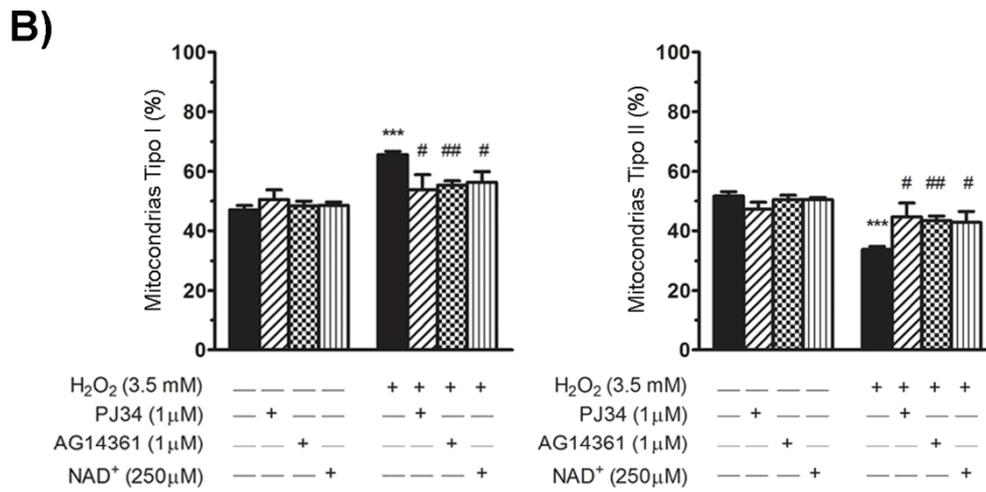
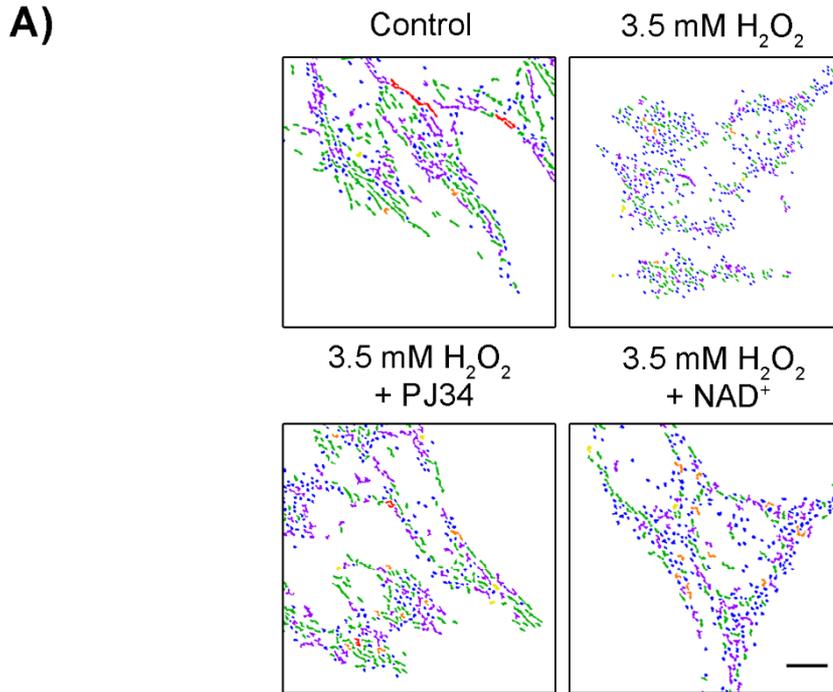


Figura 40. Neutralización de las ROS con piruvato sódico. A) Cuantificación de los niveles de ROS generados tras el tratamiento durante 15 minutos con H₂O₂ en presencia y ausencia de piruvato sódico 4 mM (PS). Se cuantificó el porcentaje de células DCF positivas, y se muestra la media (\pm SEM) de tres ensayos independientes (***) $p < 0.001$ respecto al control, ### $p < 0.001$ respecto a H₂O₂). **B)** Cuantificación del porcentaje de mitocondrias tipo I o globulares, y de mitocondrias tipo II o tubulares, tras la cuantificación con el programa MicroP. Se cuantificó un mínimo 7000 mitocondrias por condición en cada ensayo; se muestra la media (\pm SEM) de tres ensayos independientes (***) $p < 0.001$ respecto al control; ### $p < 0.001$ respecto a H₂O₂).

Figura 41. Efecto de la inhibición de PARP-1 o la administración de NAD⁺ en la morfología mitocondrial tras el tratamiento con H₂O₂ y 2 horas de post-incubación. A) Imágenes procesadas con el programa MicroP, tras al tratamiento con H₂O₂ (30 minutos) en presencia o ausencia de inhibidores de PARP-1 o NAD⁺, su incubación posterior de 2 horas y tinción con *Mitotracker*. Se muestra la clasificación por colores de los diferentes subtipos mitocondriales según su morfología (ver sección 3.15.1 de materiales y métodos; mitocondrias globulares pequeñas, azul; globulares de mayor tamaño, amarillo; tubulares simples, verde; tubulares curvadas, naranja; tubulares ramificadas, morado, y tubulares en forma de rosquilla, rojo; barra de escala en *Mitotracker*: 10 μm). Imágenes representativas de cuatro ensayos independientes. **B)** Cuantificación del porcentaje de mitocondrias tipo I o globulares, y de mitocondrias tipo II o tubulares, tras la cuantificación con el programa MicroP. **C)** Representación del índice de elongación calculado como el cociente entre la longitud del eje mayor y el eje menor, valores proporcionados por el programa MicroP. **D)** Área mitocondrial obtenida a partir del programa MicroP expresada en μm. Tanto en B, C y D se cuantificó un mínimo 7000 mitocondrias por condición en cada ensayo, se muestra la media (± SEM) de cuatro ensayos independientes (**p < 0.01 y ***p < 0.001 respecto al control; #p < 0.05, ##p < 0.01 y ###p < 0.001 respecto a H₂O₂).



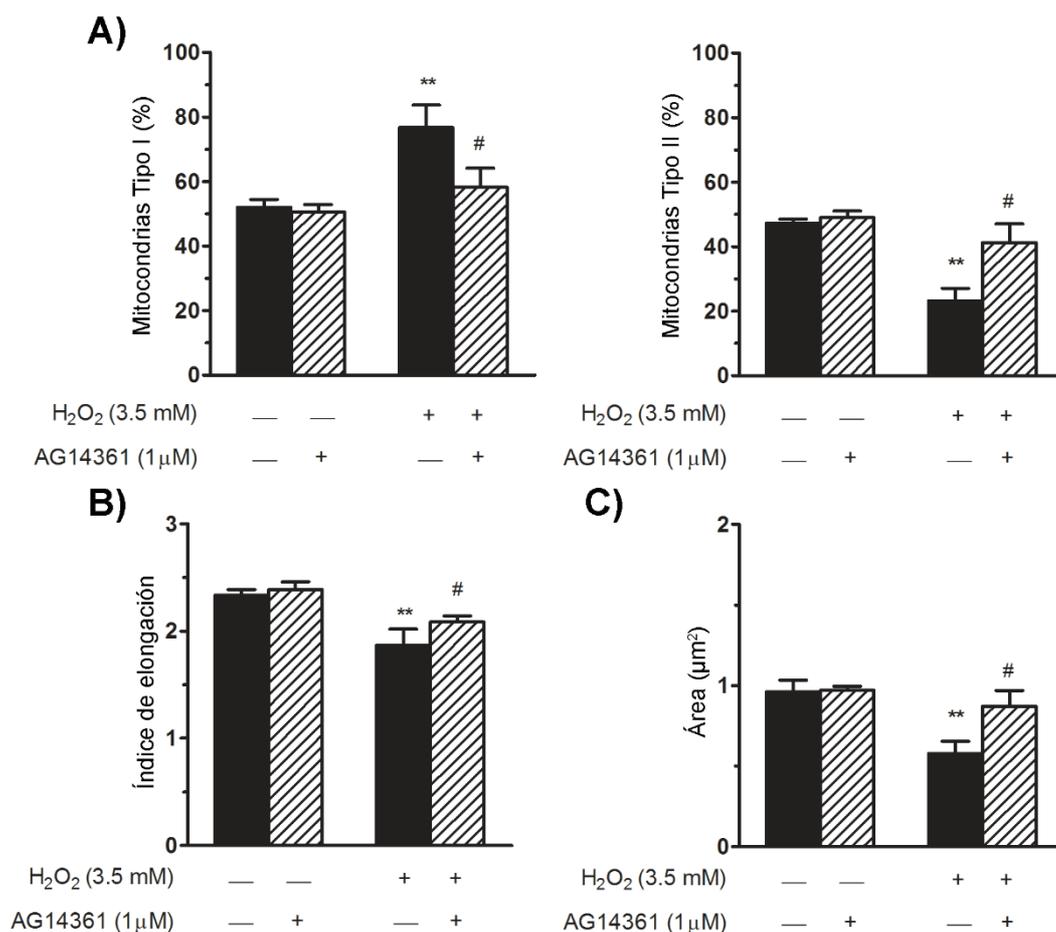


Figura 42. Efecto de la inhibición de PARP-1 en la morfología mitocondrial tras el tratamiento con H₂O₂ y 4 horas de post-incubación. **A)** Cuantificación del porcentaje de mitocondrias tipo I o globulares, y de mitocondrias tipo II o tubulares, tras la cuantificación con el programa MicroP, en células tratadas y sin tratar con H₂O₂ durante 30 minutos en ausencia y presencia del inhibidor AG14361, incubadas posteriormente 4 horas y teñidas con la sonda *Mitotracker*. Las imágenes eran introducidas en el programa de análisis MicroP, donde se segmentaban, y finalmente, se obtenía una clasificación de cada mitocondria, en seis subtipos mitocondriales diferentes según su morfología (ver materiales y métodos, sección 3.15.1). **B)** Representación del índice de elongación calculado como el cociente entre la longitud del eje mayor y el eje menor, valores proporcionados por el programa MicroP. **C)** Área mitocondrial obtenida a partir del programa MicroP expresada en μm. Tanto en A, B y C se cuantificó un mínimo 7000 mitocondrias por condición en cada ensayo; se muestra la media (± SEM) de tres ensayos independientes (**p < 0.01 respecto al control; #p < 0.05 respecto a H₂O₂).

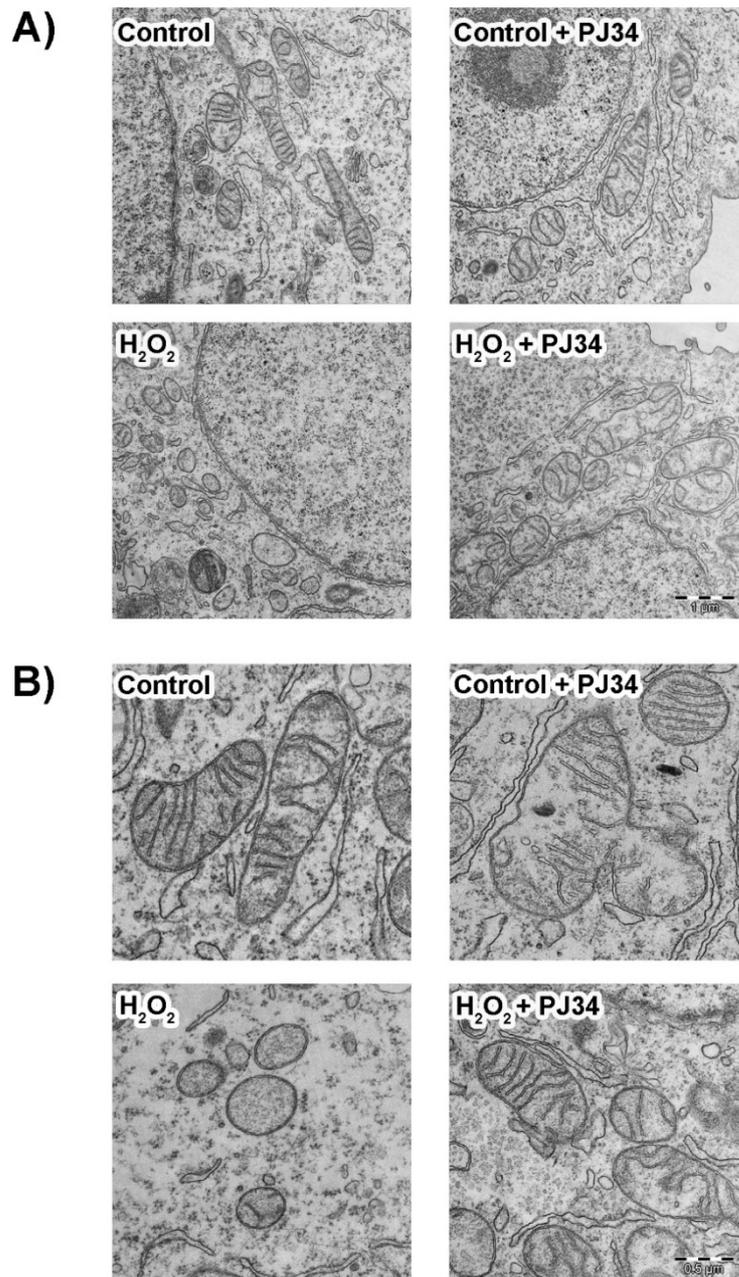


Figura 43. Análisis de la ultraestructura mitocondrial. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (MET) de la línea celular WRL68 tratada con H₂O₂ (30 minutos) en presencia y ausencia del inhibidor de PARP-1, PJ34, y su posterior incubación de 2 horas en medio fresco. **A)** Secciones con una magnificación de 4000x (barra de escala: 1 μ m). **B)** Secciones con una magnificación de 8000x (barra de escala: 0.5 μ m).

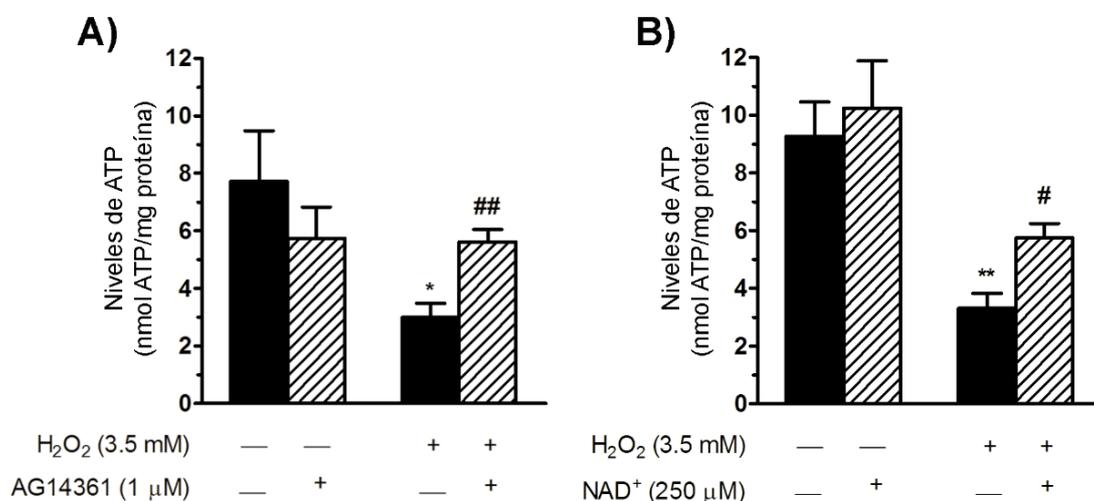


Figura 44. Niveles intracelulares de ATP. Cuantificación de los niveles intracelulares de ATP tras el tratamiento con H₂O₂ (30 minutos) y posterior incubación en medio fresco durante 2 horas en ausencia o presencia del inhibidor de PARP-1 AG14361 (**A**), o del sustrato NAD⁺ (**B**). La cantidad de ATP intracelular se expresa como nmol de ATP normalizado al contenido total de proteínas (mg) de la muestra. Se muestra la media (± SEM) de cuatro ensayos independientes realizados con el inhibidor AG14361 y tres ensayos independientes con NAD⁺ (*p < 0.05 y **p < 0.01 respecto al control; #p < 0.05 y ##p < 0.01 respecto a H₂O₂).

4.4. Análisis de los cambios inducidos por el estrés oxidativo en el fosfoproteoma de las células hepáticas: implicaciones de PARP-1

La fosforilación de proteínas es considerada como un mecanismo clave para regular la actividad de cientos de proteínas implicadas en las distintas vías de señalización celular. En esta última sección de resultados se ha analizado los cambios que se producen en el fosfoproteoma de la línea celular hepática WRL68 cuando es sometida a una situación de estrés oxidativo. Además, se ha estudiado la implicación de la enzima PARP-1 en la inducción de estos cambios. Para ello, se han llevado a cabo ensayos de fosfoproteómica sobre dichas células sometidas a estrés oxidativo en varias situaciones: en ausencia o presencia del inhibidor de PARP-1 PJ34, en condiciones donde se administró el cofactor NAD⁺ y, por último, en situaciones de silenciamiento de PARP-1.

4.4.1. La inhibición de PARP-1 o la administración de NAD⁺ modifica la expresión de fosfoproteínas inducidas por el estrés oxidativo

El análisis de fosfoproteómica o de expresión de las proteínas fosforiladas se realizó sobre las células WRL68 tratadas durante 30 minutos con H₂O₂ e incubadas 2 horas en medio fresco (Figura 45A); al final de este periodo se procesaron las células para la obtención y enriquecimiento de los fosfopéptidos previo a su análisis mediante LC-MS/MS, tal y como se indicó en la sección correspondiente de Materiales y Métodos. Los resultados mostraron que el tratamiento con H₂O₂ incrementó significativamente ($p < 0.05$) el grado de fosforilación de 1377 fosfopéptidos (mostrando un valor de “*fold change*” ≥ 1 respecto a las células sin tratar o control; fosfopéptidos representados en el cuadrante superior derecho del *volcano plot* de la Figura 46A), y redujo significativamente la fosforilación de 717 péptidos ($p < 0.05$; valor de “*fold change*” ≤ -1 respecto a las células control; fosfopéptidos representados en el cuadrante superior izquierdo del *volcano plot* de la Figura 46A).

Por otro lado, la inhibición de PARP-1 mediante el inhibidor PJ34 tras el daño oxidativo produjo un incremento de las fosforilaciones en 1182

fosfopéptidos ($p < 0.05$; valor de “*fold change*” ≥ 1 respecto a las células control; fosfopéptidos representados en el cuadrante superior derecho del *volcano plot* de la Figura 46B) y un descenso de la fosforilaciones en 847 fosfopéptidos ($p < 0.05$; valor de “*fold change*” ≤ -1 respecto a las células control; fosfopéptidos representados en el cuadrante superior izquierdo del *volcano plot* de la Figura 46B). Este primer análisis arrojó datos importantes respecto al número de fosfopéptidos afectados tras el tratamiento con H_2O_2 : 1º) se produjo una reducción de 195 fosfopéptidos en el grupo de fosfopéptidos con fosforilación incrementada (“*fold change*” ≥ 1) en presencia del inhibidor de PARP-1 con respecto al tratamiento oxidativo en ausencia del inhibidor, y 2º) se incrementó en 130 fosfopéptidos el grupo de fosfopéptidos cuya expresión se veía reducida (“*fold change*” ≤ -1) en presencia del inhibidor en comparación con el tratamiento oxidativo en ausencia del inhibidor (compárese los *volcano plots* de la Figura 46A y 46B). Un segundo análisis mostró que el inhibidor PJ34 era capaz de revertir el estado de fosforilación de determinados fosfopéptidos. Concretamente, se determinó que la inhibición de PARP-1 lograba reducir la fosforilación de 67 fosfopéptidos (mostrando en esta situación valores de “*fold change*” ≤ -1 en la comparación $H_2O_2 + PJ34$ versus H_2O_2), los cuales previamente tras el tratamiento con H_2O_2 habían mostrado valores de “*fold change*” ≥ 1 ; igualmente, la inhibición de PARP-1 incrementó la fosforilación de 3 fosfopéptidos (mostrando valores de “*fold change*” ≥ 1 en la comparación $H_2O_2 + PJ34$ versus H_2O_2) que previamente con el tratamiento oxidativo y en ausencia del inhibidor PJ34 habían mostrado valores de “*fold change*” ≤ -1 (ver Tabla V del Anexo III).

En cuanto a la administración de NAD^+ durante el tratamiento oxidativo, esta también fue capaz de modificar el número de péptidos tanto con fosforilaciones incrementadas (mostrando valores de “*fold change*” ≥ 1 respecto a las células control) como de fosforilaciones reducidas (mostrando valores de “*fold change*” ≤ -1 respecto a las células control), detectándose 892 y 789 fosfopéptidos respectivamente (Figura 46C), lo que indicaba que la administración de NAD^+ : 1º) redujo en 485 péptidos el grupo de fosfopéptidos con fosforilación incrementada (“*fold change*” ≥ 1) en comparación al

tratamiento oxidativo con H_2O_2 en ausencia de NAD^+ , y 2^º) incrementó en 72 péptidos el grupo de fosfopéptidos con expresión reducida (“*fold change*” ≤ -1) en comparación al tratamiento oxidativo con H_2O_2 en ausencia de NAD^+ (compárese los *volcanos plots* de la Figura 46A y 46C). Al igual que el inhibidor PJ34, la administración de NAD^+ era capaz de revertir el estado de fosforilación de determinados fosfopéptidos tras el tratamiento con H_2O_2 . Concretamente, el NAD^+ redujo de forma significativa la fosforilación de 49 fosfopéptidos (mostrando en esta situación valores de “*fold change*” ≤ -1 en la comparación $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NAD}^+$ *versus* H_2O_2), los cuales previamente tras el tratamiento con H_2O_2 había mostrado valores de “*fold change*” ≥ 1 ; asimismo, la administración de NAD^+ incrementó la fosforilación de 24 fosfopéptidos (mostrando valores de “*fold change*” ≥ 1 en la comparación $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NAD}^+$ *versus* H_2O_2) que con el tratamiento oxidativo y en ausencia de NAD^+ habían mostrado valores de “*fold change*” ≤ -1 (ver Tabla VI del Anexo III).

Por tanto, los resultados anteriores indican que la inhibición de PARP-1 o la administración de NAD^+ modifican en parte el patrón de fosforilación inducido por el tratamiento oxidativo, y que en ciertos fosfopéptidos los cambios inducidos en su estado de fosforilación pueden ser contrarrestados mediante el inhibidor PJ34 o por la administración de NAD^+ .

Finalmente, se relacionaron los fosfopéptidos detectados anteriormente con los procesos celulares en los que estos intervienen. Para ello, aquellos fosfopéptidos que mostraron cambios significativos en su estado de fosforilación (con valores de “*fold change*” ≥ 1 o ≤ -1 con respecto a la situación control) fueron sometidos a un análisis de enriquecimiento de GO mediante la herramienta bioinformática DAVID (Huang da et al., 2009). Globalmente, los términos resultantes de dicho análisis que incluían un mayor número de fosfopéptidos en cada situación experimental (H_2O_2 *versus* control; $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{PJ34}$ *versus* control; y $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NAD}^+$ *versus* control) fueron aquellos relacionados mayoritariamente con el proceso biológico de la transcripción (Figura 47A, B y C). Curiosamente, la inhibición de PARP-1 o la administración de NAD^+ (Figura 47B, C) en las células sometidas a estrés oxidativo incrementó el número de fosfopéptidos incluidos en este proceso biológico con

respecto al tratamiento solo con H₂O₂ (Figura 47A), lo que sugiere que en las anteriores situaciones (presencia del inhibidor PJ34 o administración de NAD⁺) se están produciendo importantes cambios en la fosforilación de proteínas implicadas en la regulación de la expresión génica.

4.4.2. El silenciamiento de PARP-1 en las células hepáticas sometidas a estrés oxidativo genera cambios en la fosforilación de proteínas

Una vez comprobado el efecto del inhibidor de PARP-1 y de la administración exógena de NAD⁺ sobre la fosforilación de proteínas inducidas por el estrés oxidativo, se quiso evaluar si el silenciamiento de PARP-1 también producía similares resultados; para ello se utilizó el abordaje experimental descrito en la Figura 45B. El silenciamiento de PARP-1 se realizó mediante la técnica de *siRNA*; en esta técnica además de usar los *siRNA* específicos para PARP-1 (*siPARP-1*) se utilizó secuencias aleatorias de *siRNA* “*Non-target*” (*siNT*) como controles negativos. El silenciamiento de PARP-1 se corroboró mediante el análisis por *Western Blot* de los niveles de expresión de la proteína PARP-1 (Figura 48A).

El ensayo de fosfoproteómica utilizando el *siPARP-1* en las células hepáticas tratadas con H₂O₂ mostró un incremento de 210 fosfopéptidos en el grupo de péptidos con fosforilación reducida (1303 fosfopéptidos mostraron un valor de “*fold change*” ≤ -1 ; Figura 48B, cuadrante superior izquierdo) en comparación a lo mostrado en las células silenciadas con *siNT* y tratadas con H₂O₂, donde 1093 fosfopéptidos mostraron un valor de “*fold change*” ≤ -1 (Figura 48C, cuadrante superior izquierdo). Sin embargo, en cuanto al número de fosfopéptidos con fosforilaciones incrementadas, es decir, mostrando valores de “*fold change*” ≥ 1 , no hubo diferencias entre ambos grupos (Figura 48B, C; cuadrantes superiores derecho), mostrando ambos prácticamente el mismo número de péptidos con fosforilaciones incrementadas (2559 y 2558 en *siNT* y *siPARP-1* tras el tratamiento con H₂O₂ con respecto a su correspondiente control, respectivamente).

Un análisis más exhaustivo para conocer qué fosfopéptidos en concreto podrían estar revirtiendo su estado de fosforilación en las condiciones oxidativas y de silenciamiento de PARP-1 mostró que 30 fosfopéptidos presentaban en estas condiciones experimentales una significativa ($p < 0.05$) y reducida fosforilación (mostrando valores de “*fold change*” ≤ -1 en la comparación siPARP-1 + H₂O₂ *versus* siNT + H₂O₂), los cuales previamente tras el tratamiento con H₂O₂ y en condiciones de silenciamiento con siNT habían mostrado valores de “*fold change*” ≥ 1 ; asimismo, el silenciamiento de PARP-1 en condiciones oxidativas incrementó significativamente ($p < 0.05$) la fosforilación de 22 fosfopéptidos (mostrando valores de “*fold change*” ≥ 1 en la comparación siPARP-1 + H₂O₂ *versus* siNT + H₂O₂) que previamente tras el tratamiento con H₂O₂ y en condiciones de silenciamiento con siNT habían mostrado valores de “*fold change*” ≤ -1 (ver Tabla VII del Anexo III).

En resumen, el análisis de fosfoproteómica en las condiciones oxidativas y de silenciamiento de PARP-1 mostró una tendencia similar a lo observado en presencia del inhibidor PJ34 o del NAD⁺, ya que además de incrementarse el número de fosfopéptidos que muestran fosforilaciones reducidas (fosfopéptidos con valores de “*fold change*” ≤ -1), también se observó que el siPARP-1 era capaz de revertir parte de los cambios desencadenados por el tratamiento oxidativo.

4.4.3. El silenciamiento de PARP-1 disminuye en las células hepáticas sometidas a estrés oxidativo la actividad de ciertas quinasas, entre ellas la proteína quinasa activada por AMP (AMPK)

A lo largo de los epígrafes anteriores se ha mostrado en las células hepáticas sometidas a estrés oxidativo una relación entre la activación de PARP-1 y el patrón de fosforilación de distintas proteínas. Dicha relación puede estar promovida por el estrés energético inducido por la sobreactivación de PARP-1, ya que como se describió en el epígrafe 4.3.5, la elevada activación de PARP-1 induce una caída en los niveles de ATP intracelulares, caída que puede ser contrarrestada por la inhibición de PARP-1 o por la administración

exógena de NAD⁺ (Figura 44A, B). Además, tanto la inhibición de PARP-1 como la administración exógena de NAD⁺ induce cambios significativos en el estado de fosforilación de diversos fosfopéptidos tras el tratamiento oxidativo (Tabla V y VI del Anexo III). No obstante, si tenemos en cuenta que PARP-1 carece de actividad quinasa, los cambios observados en el fosfoproteoma celular tras la activación de PARP-1 (o como consecuencia del consumo drástico del sustrato NAD⁺) deben estar desencadenados por modificaciones en la actividad de una o varias quinasas.

Para poder corroborar la hipótesis anterior, se procedió a analizar la actividad de las quinasas en las células sometidas al tratamiento oxidativo en las condiciones de silenciamiento descritas anteriormente (Figura 45B). Para ello se utilizó una herramienta desarrollada por el Dr. Cutillas y colaboradores (2013), que consiste en un análisis de enriquecimiento de sustratos de quinasas (KSEA, del inglés *Kinase substrate enrichment analysis*). Con esta herramienta se puede estimar el grado de activación de una quinasa en función del nivel de fosforilación de los sustratos presentes en la muestra analizada por LC-MS/MS (Casado et al., 2013). El valor obtenido, denominado “*KSEA score*”, nos indica el grado de activación de la quinasa correspondiente; un valor positivo indica un mayor grado de activación debido a que los sustratos analizados por LC-MS/MS presentan una mayor fosforilación en comparación a la situación control (Casado et al., 2013). En nuestro estudio, se incluyeron todos los fosfopéptidos identificados y cuantificados en los ensayos de silenciamiento para realizar el KSEA, y se seleccionaron aquellas quinasas cuyos valores de “*KSEA score*” resultaron ser significativos para las células silenciadas con siNT y tratadas con H₂O₂ con respecto a la situación sin tratamiento (Figura 49A). Finalmente, se comparó para cada quinasa (10 en total) el valor del “*KSEA score*” en estas condiciones (siNT) con el obtenido en las células silenciadas con siPARP-1 y tratadas con H₂O₂ en relación a la situación sin tratamiento (Figura 49A).

Respecto a las quinasas detectadas en el KSEA, las únicas que no mostraron cambios significativos con respecto a la situación control fueron AMPK (también denominada como PRKAA1) y mTOR, pero solo en las células

tratadas con H₂O₂ en la situación de silenciamiento con siPARP-1 (Figura 49A); en particular, AMPK mostró valores inferiores de “KSEA score” en estas condiciones oxidativas en comparación con la condición experimental de silenciamiento con siNT, lo que indica que en ausencia de la proteína PARP-1 los niveles de activación de AMPK son inferiores. En cambio, mTOR mostró valores ligeramente menos negativos de “KSEA score” en la condición experimental de silenciamiento con siPARP-1, lo que sugiere una menor inactivación de esta quinasa cuando PARP-1 fue silenciada.

Para corroborar lo anterior, se analizó el grado de fosforilación (valor de “fold change”) de todos los sustratos identificados mediante LC-MS/MS pertenecientes a las quinasas AMPK y mTOR (Figura 49B, C); el silenciamiento de PARP-1 redujo en mayor medida el grado de fosforilación de los sustratos para AMPK tras el tratamiento oxidativo (Figura 49B), mientras que incrementaba en menor medida el grado de fosforilación de los sustratos de mTOR (Figura 49C). Además, se analizó de manera más detallada sustratos específicos de AMPK y mTOR (Figura 49D, E). En el caso de AMPK, se analizó la fosforilación de la enzima Acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1 o ACACA) en el residuo serina 80 (S80) (Wei et al., 2016), y se comprobó que este residuo en las células tratadas con H₂O₂ mostraba una significativa y clara reducción en su estado de fosforilación cuando PARP-1 fue silenciada (Figura 49D, gráfico de la izquierda). El análisis de la fosforilación de otro sustrato de AMPK, la proteína activadora de GTPasa TBC1D1 (fosforilación en la serina 237; S237) (Treebak et al., 2014) mostró la misma tendencia anterior, aunque en este caso las diferencias no fueron tan acusadas (Figura 49D, gráfico de la derecha). En el caso de los sustratos de mTOR, se analizaron las fosforilaciones en la proteína de unión al factor eucariótico de inicio de la traducción 4E (EIF4EBP1) en las treoninas 68 (T68) y 70 (T70) (Qin et al., 2016), y la fosforilación en el residuo serina 766 (S766) de la proteína LARP-1 (Fonseca et al., 2018) (Figura 49E). En ambos casos, la fosfoproteómica mostró que el silenciamiento de PARP-1 en las células tratadas con H₂O₂ incrementó ligeramente la fosforilación de estos sustratos cuando se comparaba con la condición siNT + H₂O₂ (Figura

49E); sin embargo, estas diferencias en ningún caso resultaron ser significativas en el análisis estadístico.

En conjunto, los resultados anteriores indican que en las células hepáticas sometidas a tratamiento oxidativo, el silenciamiento de PARP-1 induce una clara disminución en la actividad de AMPK. Por otro lado, AMPK se activa cuando los niveles intracelulares de ATP son bajos (Hardie et al., 2003; Kemp et al., 2003). En este modelo la sobreactivación de PARP-1 induce una drástica bajada en los niveles de ATP (Figura 44), que es revertida con la administración de NAD^+ ; por eso, se quiso evaluar si la administración de NAD^+ en las células tratadas con H_2O_2 producía algún efecto sobre la actividad de AMPK. Para ello se analizó el estado de fosforilación del sustrato TBC1D1 (S237); los resultados mostraron que tanto el NAD^+ como el inhibidor PJ34 inducían una clara disminución en el estado de fosforilación del residuo S237 de dicho sustrato (Figura 49F), de igual manera a lo observado cuando PARP-1 era silenciada (Figura 49D, gráfico de la derecha). Por tanto, los resultados mostrados parecen indicar que el estrés energético ocasionado por la sobreactivación de PARP-1 tras el tratamiento oxidativo estimula la activación de AMPK, y que el bloqueo de la actividad de PARP-1 reduce dicha activación, disminuyendo por tanto la fosforilación de sus sustratos.

4.4.4. El silenciamiento de PARP-1 incrementa la viabilidad celular en las células WRL68 sometidas a tratamiento oxidativo

Finalmente, tras corroborar que el silenciamiento de PARP-1 era capaz de modificar el fosfoproteoma inducido por el tratamiento oxidativo, al igual que lo hacía el inhibidor de PARP-1 o el cofactor NAD^+ , se quiso comprobar que en ausencia de PARP-1 (siPARP-1) se reprodujera el incremento de la viabilidad observado en presencia del inhibidor PJ34 y del NAD^+ (Figura 36A, C) tras el tratamiento oxidativo.

El tratamiento con H_2O_2 en células hepáticas silenciadas con siNT indujo una acusada bajada de la viabilidad celular (Figura 50); en cambio, el

silenciamiento de PARP-1 (siPARP-1) en las células tratadas con H₂O₂ incrementó de forma significativa la viabilidad celular (Figura 50), al igual que sucedía con los inhibidores de PARP-1 (Figura 36A), confirmando que la sobreactivación de PARP-1 es un factor clave en el descenso de la viabilidad de la línea celular WRL68 tras el tratamiento oxidativo.

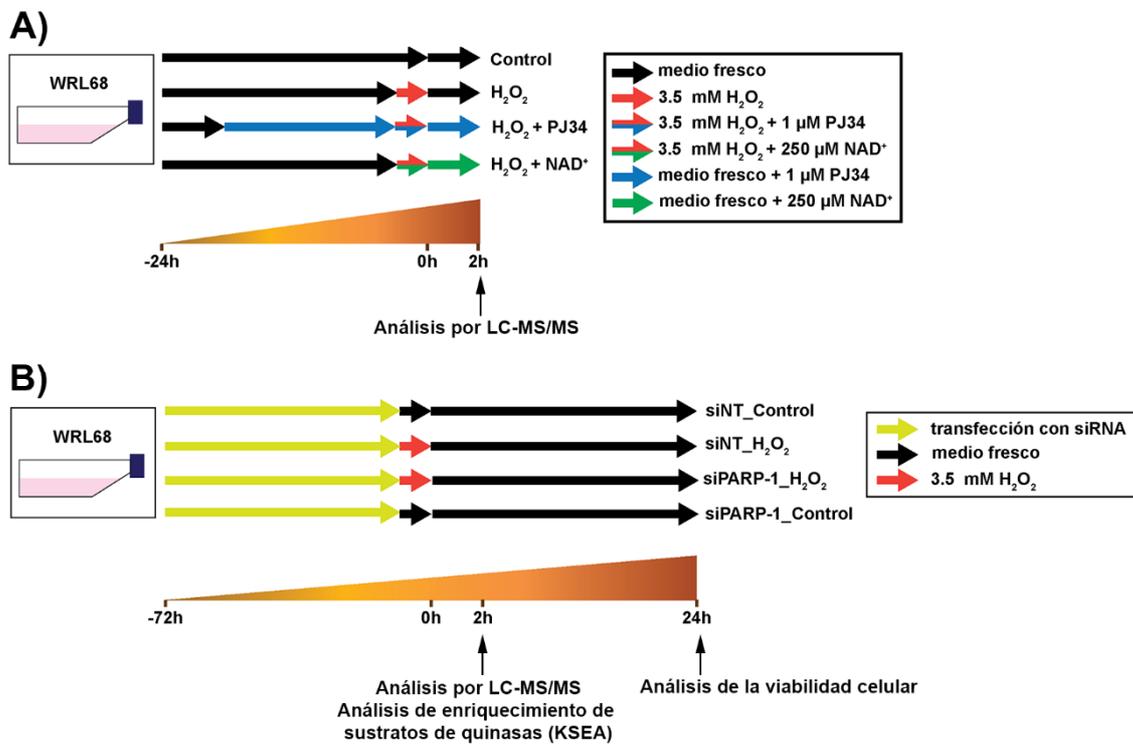


Figura 45. Esquema de tratamiento con H_2O_2 en la línea celular WRL68. **A)** La inducción de una situación de estrés oxidativo se generó mediante el tratamiento de la línea celular WRL68 con una única dosis de H_2O_2 durante 30 minutos y su posterior incubación en medio fresco sin H_2O_2 durante 2 horas para su análisis por LC-MS/MS. El inhibidor de PARP-1, PJ34, se administró 16 horas antes del tratamiento con H_2O_2 y estuvo presente durante toda la duración de los ensayos. La administración exógena de NAD^+ se realizó durante el tratamiento con H_2O_2 y posterior incubación en medio fresco. **B)** El silenciamiento de la expresión de la proteína PARP-1 se llevó cabo mediante el uso de *siRNA*. Para ello la línea celular WRL68 se incubó 72 horas con el agente transfectante y el *siRNA* (siPARP-1 o con el control de transfección, siNT). Transcurridas las 72 horas de transfección, se llevó cabo el tratamiento con H_2O_2 tal y como se ha descrito en A. Las células se incubaron 2 horas en medio fresco para su análisis por LC-MS/MS y 24 horas para el análisis de la viabilidad celular.

Figura 46. Fosfoproteoma celular de la línea celular WRL68 tras el tratamiento oxidativo y/o la inhibición de PARP-1 o la administración de NAD⁺. A), B) y C) *Volcano plots* que muestran el grado de fosforilación de los péptidos identificados tras el tratamiento con H₂O₂ (A), con H₂O₂ en presencia del inhibidor PJ34 (H₂O₂ + PJ34) (B) y con H₂O₂ en presencia del cofactor NAD⁺ (H₂O₂ + NAD⁺) (C). En el eje X se muestra el grado de fosforilación de cada fosfopéptido identificado respecto a la condición control en escala logarítmica de base 2 (denominado “*fold change*”, ver sección 3.22.5 de Materiales y Métodos), y en el eje Y la transformación en escala logarítmica del correspondiente p-valor (p) obtenido mediante la prueba T de Student (-Log₁₀ p-valor). En azul se resaltan los fosfopéptidos con un “*fold change*” respecto al control ≤ -1 y $p < 0.05$. En rojo se resaltan los fosfopéptidos con un “*fold change*” respecto al control ≥ 1 y $p < 0.05$. Las líneas de puntos horizontales indican el límite de significancia establecido como $p < 0.05$; y líneas de puntos verticales indican los valores mínimos de “*fold change*” considerados, 1 y -1, respectivamente.

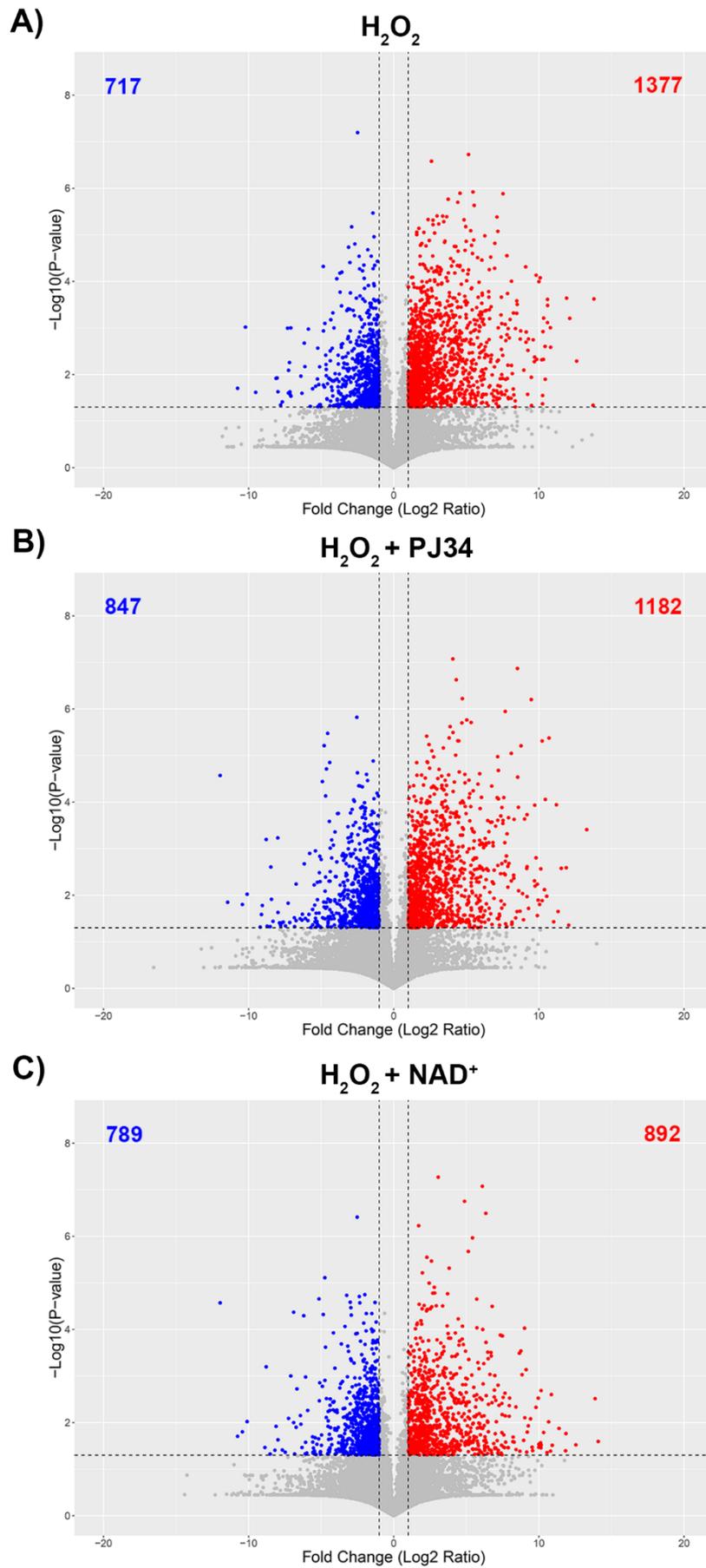
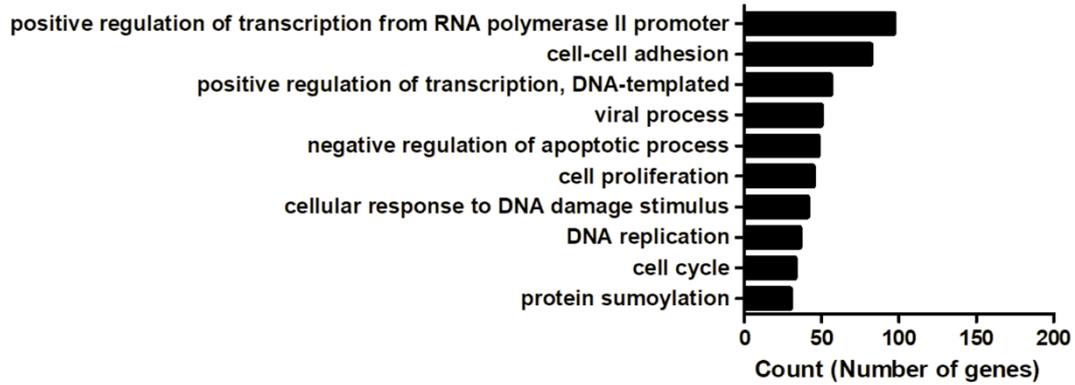


Figura 47. Análisis de ontología de genes tras el tratamiento oxidativo y/o la inhibición de PARP-1 o la administración de NAD⁺. **A)** Análisis de GO de los péptidos cuya fosforilación se veía afectada significativamente por el H₂O₂ con respecto al control (“*fold change*” ≥ 1 y “*fold change*” ≤ -1 con respecto al control y p < 0.05; cuadrantes superiores izquierdo y derecho del *volcano plot* de la figura 46A). Se representan los términos significativos relacionados con procesos biológicos con mayor número de péptidos identificados por término. **B)** Análisis de GO de los péptidos cuya fosforilación se veía afectada significativamente por el H₂O₂ + PJ34 con respecto al control (“*fold change*” ≥ 1 y “*fold change*” ≤ -1 con respecto al control y p < 0.05; cuadrantes superiores izquierdo y derecho del *volcano plot* de la figura 46B). Se representan los términos significativos relacionados con procesos biológicos con mayor número de péptidos identificados por término. **C)** Análisis de GO de los péptidos cuya fosforilación se veía afectada significativamente por el H₂O₂ + NAD⁺ con respecto al control (“*fold change*” ≥ 1 y “*fold change*” ≤ -1 con respecto al control y p < 0.05; cuadrantes superiores izquierdo y derecho del *volcano plot* de la figura 46C). Se representan los términos significativos relacionados con procesos biológicos con mayor número de péptidos identificados por término.

A)

H₂O₂ versus control

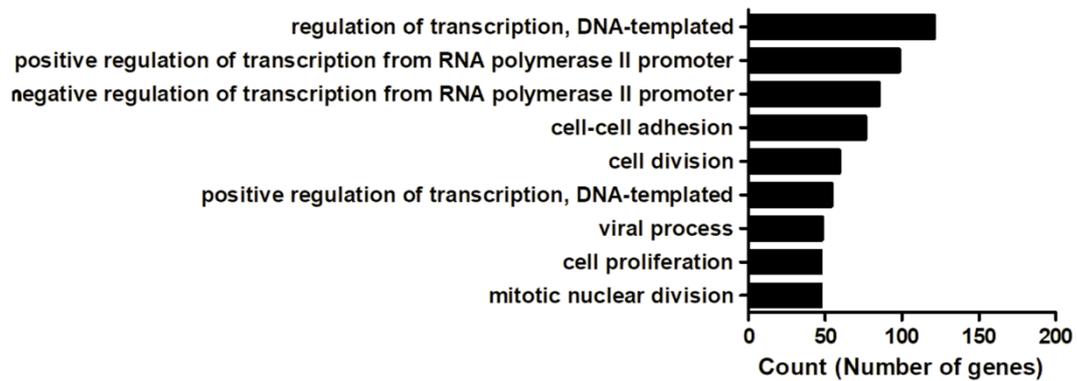
GO: Biological Process



B)

H₂O₂ + PJ34 versus control

GO: Biological Process



C)

H₂O₂ + NAD⁺ versus control

GO: Biological Process

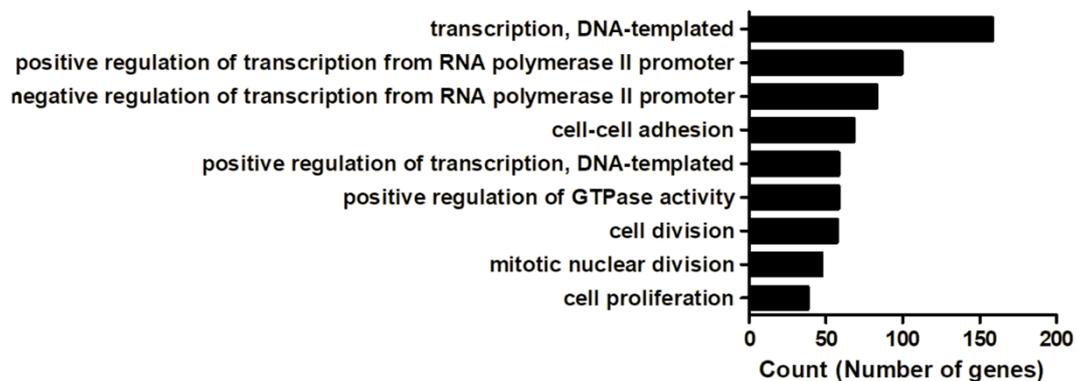
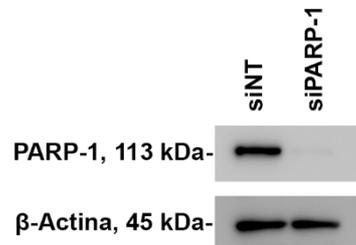
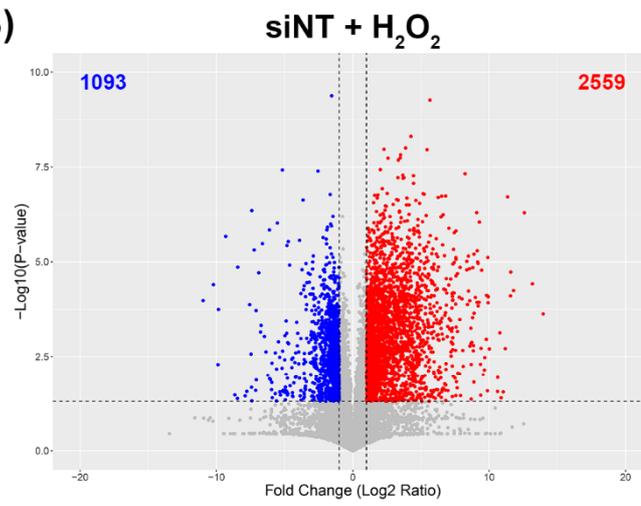


Figura 48. Fosfoproteoma de la línea celular WRL68 tras el silenciamiento de PARP-1 y el tratamiento oxidativo. **A)** *Western Blot* para la detección de la expresión de PARP-1 en células tratadas con *siRNA*. *siNT*, *siRNA* control negativo y *siPARP-1*, *siRNA* para PARP-1. Imagen representativa de tres ensayos independientes. La cantidad de proteínas se normalizó frente a β -actina. **B)** y **C)** *Volcano plots* que muestran el grado de fosforilación de los péptidos identificados tras el tratamiento con H_2O_2 en el control de la transfección (*siNT* + H_2O_2 , **B**) y en células con PARP-1 silenciada (*siPARP-1* + H_2O_2 , **C**). En el eje X se muestra el grado de fosforilación de cada fosfopéptido identificado respecto a la condición control en escala logarítmica de base 2 (denominado “*fold change*”), y en el eje Y la transformación en escala logarítmica del correspondiente p-valor (p) obtenido mediante la prueba T de Student (-Log₁₀ p-valor). En azul se resaltan los fosfopéptidos con un “*fold change*” respecto al control ≤ -1 y $p < 0.05$. En rojo se resaltan los fosfopéptidos con un “*fold change*” respecto al control ≥ 1 y $p < 0.05$. Las líneas de puntos horizontales indican el límite de significancia establecido como $p < 0.05$; y líneas de puntos verticales indican los valores mínimos de “*fold change*” considerados, 1 y -1, respectivamente.

A)



B)



C)

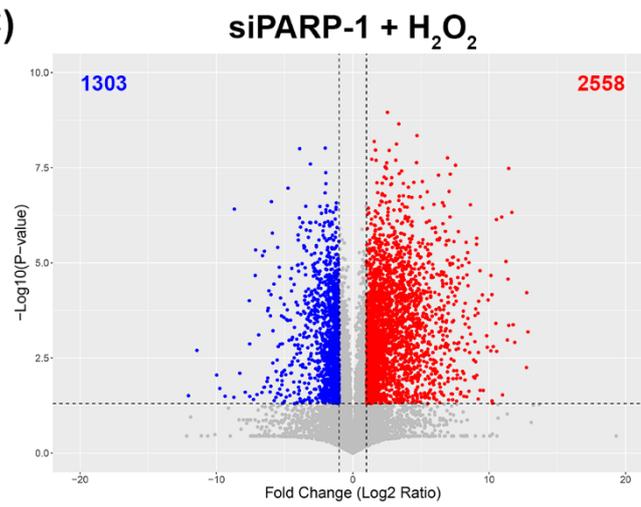
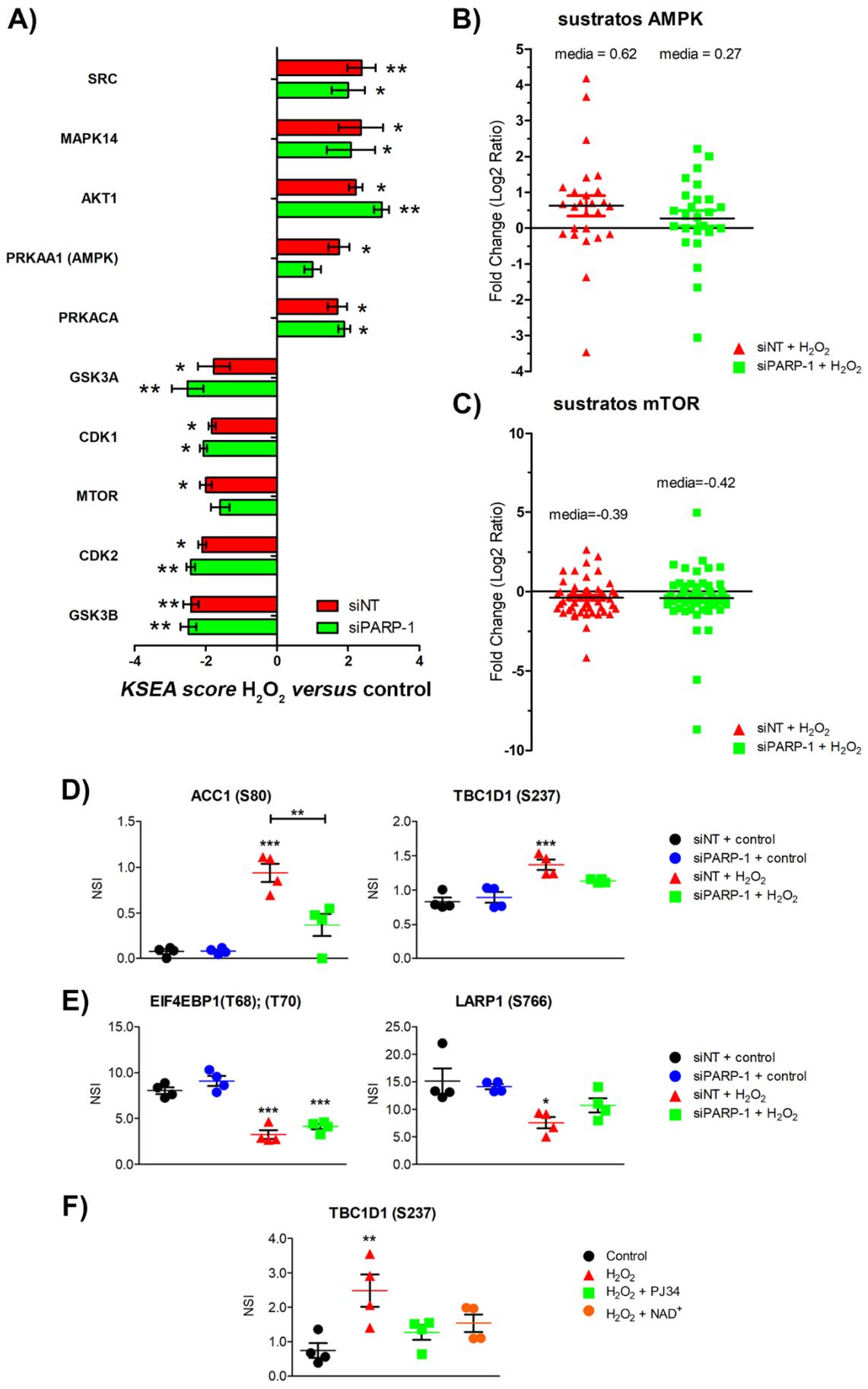


Figura 49. Evaluación de la actividad de quinasas tras el silenciamiento de PARP-1 y el tratamiento oxidativo. A) Estimación de la actividad de quinasas en la línea celular WRL68 tratada con H₂O₂ con/sin silenciamiento de PARP-1 (siNT y siPARP-1, respectivamente), obtenida mediante el análisis KSEA de los datos de fosfoproteómica (ver sección 3.22.6 de materiales y métodos). Se muestra el “KSEA score” de cada quinasa obtenido para células tratadas con siNT + H₂O₂, y se compara con el correspondiente “KSEA score” obtenido en células tratadas con siPARP-1 + H₂O₂ (*p < 0.05 respecto a su correspondiente control). **B y C)** Representación del “fold change” respecto a su correspondiente control de cada uno de los sustratos identificados para las quinasas AMPK (PRKAA1) y mTOR en células tratadas con siNT + H₂O₂ o con siPARP-1 + H₂O₂. **D)** Gráficos que muestran la señal de intensidad normalizada (NSI) de los fosfopéptidos de dos sustratos representativos de la quinasa AMPK, la enzima Acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1 o ACACA) fosforilada en la serina 80 (S80) y la proteína activadora de GTPasas TBC1D1 fosforilada en la serina 237 (S237). Se muestra la señal de intensidad de cada uno de los replicados biológicos (indicada con puntos), la media (línea horizontal) y la SEM (**p < 0.01 y ***p < 0.001 respecto al control o entre la comparación indicada). **E)** Gráficos que muestran la señal de intensidad normalizada (NSI) de los fosfopéptidos de dos sustratos representativos de la quinasa mTOR, la proteína de unión al factor eucariótico de inicio de la traducción 4E (EIF4EBP1) fosforilada en los residuos de treonina 68 y 70 (T68 y T70, respectivamente), y la proteína LARP-1 fosforilada en la serina 766 (S766). Se muestra la señal de intensidad de cada uno de los replicados biológicos (indicada con puntos), la media (línea horizontal) y la SEM (*p < 0.05 y **p < 0.01 respecto su correspondiente control). **F)** Gráficos que muestra la señal de intensidad normalizada (NSI) de la proteína activadora de GTPasas TBC1D1 fosforilada en la serina 237 (S237) tras el tratamiento oxidativo en presencia o ausencia del inhibidor de PARP-1, PJ34, o el sustrato NAD⁺. Se muestra la señal de intensidad de cada uno de los replicados biológicos (indicada con puntos), la media (línea horizontal) y la SEM (**p < 0.01 respecto al control).



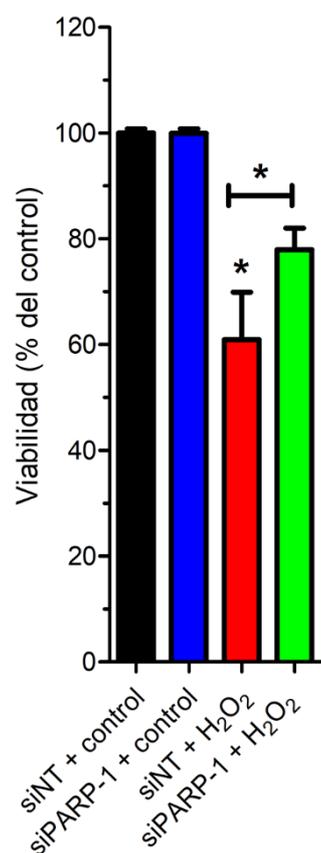


Figura 50. Efecto del silenciamiento de PARP-1 sobre la viabilidad celular de la línea WRL68 tras el tratamiento oxidativo. A) Viabilidad celular, medida con MTS, de la línea celular WRL68 transfectada con siNT o siPARP-1, y tratada con H₂O₂ durante 30 minutos e incubada en medio fresco durante 24 horas. La viabilidad celular se muestra como el porcentaje de viabilidad respecto al control (células no tratadas), el cual se considera con una viabilidad del 100%. Se muestra la media (\pm SEM) del porcentaje de viabilidad de cuatro ensayos independientes (* $p < 0.05$ respecto al siNT + control o entre la comparación indicada).

5. DISCUSIÓN

En la presente Tesis doctoral, en primer lugar, se ha evaluado la presencia de daños oxidativos durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón, relacionando dicho daño con la actividad de PARP-1 y con la presencia de γ -H2AX. Además, se muestra la dualidad del enzima PARP-1 ante situaciones inducidas de daño oxidativo, tomando como modelo la retina de ratón y el cultivo *in vitro* de hepatocitos humanos. Por un lado, en los cultivos organotípicos de retina de ratón y en la línea celular retiniana murina 661W (derivada de fotorreceptores) el uso del inhibidor de PARP-1 PJ34 conlleva a una potenciación del daño inducido en el ADN con el tratamiento oxidativo, incrementando finalmente los eventos de muerte celular. Asimismo, se observa un incremento de la activación de enzimas implicadas en la respuesta al daño en el ADN, como ATM y ATR. En este caso la inhibición de PARP-1 se realizó con el inhibidor PJ34, capaz de inhibir el proceso de poli-ADP-ribosilación tanto de PARP-1 como de PARP-2. Dado que hasta el 90% de la formación de polímero PAR es atribuida a la actividad de PARP-1 (Shieh et al., 1998) consideramos a lo largo de esta Tesis que los efectos observados al usar el inhibidor PJ34 se deben principalmente al bloqueo de la actividad de PARP-1. En cambio, en el modelo *in vitro* de hepatocitos humanos (línea celular WRL68), la inhibición de PARP-1 confiere protección al daño inducido, reduciéndose en este caso los eventos de muerte celular desencadenados por la presencia de ROS. En este modelo se utilizó el inhibidor PJ34, así como el inhibidor específico de PARP-1 AG14361 (Calabrese et al., 2004), obteniéndose los mismos resultados, lo que sugería que dichos efectos dependerían de la actividad de PARP-1. Por otro lado, el papel protector observado se debe a que la inhibición de PARP-1 previene la caída de los niveles de NAD^+ producida por una activación excesiva de PARP-1. El mantenimiento de los niveles de NAD^+ , bien por la inhibición de PARP-1 o por la propia administración de NAD^+ , contribuye a reducir los fenómenos de fragmentación mitocondrial y de disfunción mitocondrial desencadenados por el estrés oxidativo. Además, tanto la inhibición de PARP-1 como su silenciamiento son capaces de revertir los cambios en el fosfoproteoma celular desencadenados por la activación de PARP-1 tras el tratamiento oxidativo; la administración de NAD^+ también produjo en el fosfoproteoma un efecto similar

al observado tras el bloqueo de la actividad de PARP-1. Por tanto, esto indica que el estrés energético ocasionado por la disminución de los niveles de NAD⁺ tras la activación de PARP-1 ante el tratamiento oxidativo podría ser el responsable de los cambios observados en el fosfoproteoma; dicho estrés modularía además la actividad de una o varias quinasas, entre ellas AMPK, crucial en este tipo de respuestas. El silenciamiento de PARP-1 también resultó en un incremento de la viabilidad celular tras el tratamiento oxidativo, de igual manera a lo obtenido con los inhibidores PJ34 y AG14361, confirmando que los efectos observados dependían de la actividad de PARP-1.

Estas observaciones ponen de manifiesto el doble papel de la activación de PARP-1 en la modulación de la respuesta al daño oxidativo; ante un estímulo similar, el tratamiento con H₂O₂, el efecto de los inhibidores de PARP-1 pueden tener un papel perjudicial o beneficioso dependiendo de la naturaleza del sistema objeto de estudio. Además, se pone de manifiesto que la actividad y respuesta de PARP-1 ante estas situaciones abarca muchos más aspectos de los estudiados hasta la fecha, reflejando la complejidad de la función de PARP-1 y su interconexión con otras rutas de señalización.

5.1. Activación de PARP-1 y daño oxidativo durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón

Este estudio muestra que durante la primera semana de desarrollo postnatal de la retina de ratón apenas existen daños oxidativos, pero sin embargo, éstos se incrementan de manera progresiva a partir del día 14 de desarrollo. Hay que tener en cuenta que en los ratones durante la segunda semana de desarrollo postnatal la retina comienza a estar expuesta a nuevos estímulos, especialmente a partir del estadio P14, cuando los ojos comienzan a abrirse y la retina es estimulada por primera vez por la luz (Hoffpauir et al., 2009; Rodgers et al., 2016). Estas nuevas condiciones podrían ser en parte responsables del incremento del daño oxidativo observado a partir de este estadio, dado el inicio de los procesos de fototransducción. Por otro lado, la acumulación de daño oxidativo a lo largo de la vida de los organismos es

responsable del deterioro de los componentes celulares y del envejecimiento (Hamilton et al., 2001; Ishii, 2000), hecho que podría justificar el incremento del daño oxidativo observado a lo largo del desarrollo postnatal de la retina y en el estadio adulto (P60).

La presencia en la retina de estrés oxidativo y de daño en el ADN también están relacionados con la progresión de patologías en la retina como la retinopatía diabética, la degeneración macular asociada a la edad u otros desórdenes degenerativos (Beatty et al., 2000; Komeima et al., 2006; Kowluru et al., 2003). Precisamente, uno de los mecanismos propuestos en la patogenia de estas enfermedades sugiere que el estrés oxidativo genera un daño en el ADN que desencadena procesos de apoptosis (Carmody y Cotter, 2000; Sanvicens et al., 2004). Ante estas evidencias se ha planteado el uso de antioxidantes para retrasar la progresión de estas enfermedades (O'Driscoll et al., 2011; Payne et al., 2014). De hecho, la sobreexpresión de la enzima MnSOD protege frente al daño oxidativo en retinas diabéticas (Kanwar et al., 2007; Kowluru et al., 2006a; Kowluru et al., 2006b). Nuestras observaciones muestran un incremento de la expresión de la enzima MnSOD a partir de la segunda semana de desarrollo postnatal, sin embargo, los niveles de daño oxidativo no se ven reducidos a lo largo del desarrollo postnatal. Estos resultados podrían indicar que los niveles de MnSOD no son suficientes para reducir el daño oxidativo que acontece en la retina postnatal. Además, en la retina en desarrollo se ha observado un incremento en la producción de H₂O₂ por la enzima MnSOD junto con un descenso en la actividad de la catalasa (Liles et al., 1991), lo que podría sugerir que la presencia de ROS es necesaria para el desarrollo y maduración de la retina, tal y como se ha visto en otras regiones del SNC (Massaad y Klann, 2011; Sunico et al., 2005).

PARP-1 se activa en respuesta a daños en el ADN, tanto SSBs como DSBs (De Vos et al., 2012); reconoce dichos daños y participa en el reclutamiento y activación de la maquinaria de reparación (Dantzer et al., 2000; de Murcia et al., 1997; Trucco et al., 1998). En nuestras observaciones, la actividad de PARP-1 es notable durante la primera semana de desarrollo coincidiendo con el periodo donde el daño oxidativo es reducido, lo que

sugiere que la actividad de PARP-1 estaría contribuyendo a mantener el daño oxidativo reducido gracias a una reparación efectiva del daño en el ADN, tal y como se ha visto en otros modelos (Swindall et al., 2013). Otros autores muestran que una actividad excesiva de PARP-1 puede contribuir a la muerte de la retina en situaciones patológicas, ya que estaría promoviendo la muerte celular en vez de la reparación del daño (Li y Osborne, 2008; Obrosova y Julius, 2005; Paquet-Durand et al., 2007; Weise et al., 2001). Estas evidencias sugieren que ante un daño moderado, tal y como sucede en situaciones fisiológicas, PARP-1 promovería la reparación del daño, mientras que una activación excesiva conduciría a la muerte celular (Ha y Snyder, 1999; Kauppinen y Swanson, 2007; Virag y Szabo, 2002).

Durante los procesos de diferenciación celular tienen lugar reestructuraciones de la cromatina que pueden dar lugar a la generación de DSBs (Falk et al., 2010; Falk et al., 2014). Concretamente, durante el desarrollo del sistema nervioso se genera daño en el ADN como consecuencia del estrés replicativo que ocurre durante los fenómenos de neurogénesis (McKinnon, 2013). En concordancia con esta idea, Baleriola y colaboradores (2010) muestran un incremento de γ -H2AX, marcador de DSBs, a lo largo del desarrollo embrionario y en las etapas tempranas de desarrollo postnatal de la retina de ratón, sugiriendo que la presencia de DSBs se asocia a los procesos de diferenciación que acontecen en la retina en estos estadios. Nuestro estudio extiende dichas observaciones mostrando que la expresión de γ -H2AX incrementa a lo largo del desarrollo postnatal de la retina hasta el día 21 de desarrollo postnatal, descendiendo en etapas posteriores. Este incremento de γ -H2AX observado durante la segunda semana de desarrollo postnatal podría deberse a la generación de daños en el ADN durante los procesos de diferenciación que acontecen durante estas etapas, ya que el descenso de los niveles de γ -H2AX a partir del día 21 coincide con el periodo en el que la gran mayoría de las células retinianas se encuentran ya diferenciadas y han comenzado a establecer la sinaptogénesis (Tian, 2011; Xu y Tian, 2004).

Cabe destacar que a lo largo del desarrollo postnatal las células cuentan con toda la maquinaria necesaria para la reparación del ADN, observándose un

descenso en la disponibilidad de esta una vez que se ha alcanzado el grado de diferenciación (Barzilai et al., 2008; Fortini et al., 2013). Nuestras observaciones, muestran un descenso en la actividad de PARP-1 a partir del estadio P7, periodo que se corresponde con la aparición de marcadores de diferenciación en la retina y el inicio del establecimiento de las capas definitivas de esta (Sharma et al., 2003). Estos datos sugieren que a partir del estadio P7 se iniciaría un descenso en la expresión o activación de proteínas implicadas en la de reparación del daño, entre las que se encuentra PARP-1, al iniciarse el establecimiento de las capas definitivas de la retina. No obstante, aquí mostramos que el descenso de la actividad de PARP-1 coincide con el incremento en la expresión de la histona γ -H2AX. Es importante tener en cuenta que el estado maduración definitivo de la retina no se alcanza hasta semanas después del establecimiento de las capas de la retina (Nguyen-Ba-Charvet y Chedotal, 2014), por lo que a partir de la segunda semana de desarrollo continúan existiendo procesos de diferenciación que podrían dar lugar a la aparición y acumulación de DSBs. De hecho, nuestros datos muestran que los niveles de γ -H2AX se incrementan cuando la actividad de PARP-1 desciende, y se mantienen elevadas hasta el estadio P21, cuando gran parte de las células de la retina se encuentran diferenciadas (Tian, 2011; Xu y Tian, 2004). Estas observaciones sugieren que el incremento de γ -H2AX observado puede deberse a una incorrecta reparación del daño originado durante los procesos de diferenciación que aún tienen lugar en estas etapas de desarrollo, debido en parte a la ausencia de la actividad de PARP-1.

Por otro lado, gran parte de los núcleos positivos para γ -H2AX observados en el día 14 de desarrollo postnatal no presentan características de núcleos en procesos de muerte celular (tales como picnosis o marcaje positivo para TUNEL), lo que indicaría que el marcaje de γ -H2AX estaría más bien relacionado con eventos de reparación del daño que con procesos de muerte celular. En cambio, en P7, una alta proporción de núcleos que muestran marcaje para γ -H2AX son también positivos para TUNEL, lo que indica que en este estadio gran parte de los núcleos con daño en el ADN (del tipo DSBs) inician un proceso de muerte celular. Además, en P14, aunque los eventos de

muerte siguen produciéndose, estos son menores en comparación con los estadios anteriores (Martin-Oliva et al., 2011), sugiriendo que durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón se producen dos tipos de muerte celular, una dependiente de la generación de DSBs (en P7), y otra independiente (en P14).

En resumen, durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón se produce un aumento del daño oxidativo coincidiendo con el descenso de mecanismos implicados en la reparación del daño en el ADN, entre ellos PARP-1.

5.2. Inhibición de PARP-1, daños en el ADN y muerte celular en la retina sometida a estrés oxidativo

El estrés oxidativo parece tener un papel importante en el desarrollo de ciertas patologías en la retina (Masuda et al., 2017). Asimismo, aquellos estímulos con capacidad de inducir daños en los fotorreceptores pueden originar situaciones de estrés oxidativo en la retina, generando daños en el ADN, peroxidación lipídica y nitrosilación de proteínas (Lohr et al., 2006), fenómenos observados en modelos de degeneración retiniana (Shen et al., 2005). En esta Tesis doctoral se evaluó, en segundo lugar, la respuesta de los cultivos organotípicos de retina de ratón, así como de la línea celular 661W (derivada de fotorreceptores), al tratamiento con un agente inductor de ROS, y se determinó el papel que podría estar ejerciendo PARP-1 en la modulación de dicha respuesta.

El tratamiento oxidativo mediante el uso del H₂O₂ como agente inductor de estrés oxidativo en los explantes de retina y en las células 661W se llevó a cabo como un intento de reproducir la situación de estrés oxidativo a la que están sometidos los fotorreceptores durante el desarrollo de enfermedades retinianas (Nishimura et al., 2017). En los explantes de retina el tratamiento con H₂O₂ resultó en un incremento de los eventos de muerte celular. Sin embargo, a diferencia de lo observado en algunos modelos de degeneración retiniana

(Sahaboglu et al., 2016), la inhibición de PARP-1 no reducía los eventos de muerte celular, sino que dichos fenómenos se veían potenciados; la inhibición de PARP-1 incrementaba el porcentaje de células apoptóticas y el número de núcleos TUNEL positivos, especialmente en la capa nuclear externa, donde se encuentran los núcleos de los fotorreceptores. Estos resultados indican un papel perjudicial de los inhibidores de PARP-1 sobre la viabilidad de los fotorreceptores de las retinas sometidas a estrés oxidativo.

La inhibición de PARP-1 incrementó de igual manera la expresión de γ -H2AX en la CNE, indicativo de la presencia de un mayor daño de doble cadena en el ADN; fenómeno que mostró una tendencia similar a lo observado durante el desarrollo postnatal de la retina cuando la actividad de PARP-1 era reducida. Gran parte del daño en el ADN y del marcaje TUNEL se observó en los núcleos de la CNE de los cultivos organotípicos, sugiriendo que el daño en el ADN y la muerte celular se podrían estar exacerbando en la capa donde se sitúan los núcleos de los fotorreceptores. Dado que la retina está constituida por diferentes tipos celulares, se seleccionó la línea celular 661W, la cual exhibe características propias de los conos de la retina (Tan et al., 2004), para llevar a cabo un estudio más exhaustivo de los cambios observados tras la inhibición de PARP-1. Por eso, el tratamiento de la línea celular 661W con H_2O_2 se empleó como modelo *in vitro* de daño oxidativo en fotorreceptores (Kunchithapautham y Rohrer, 2007).

En general, el tratamiento de las células con H_2O_2 genera roturas en el ADN, y por tanto, induciendo lesiones que favorecen el inicio de una cascada de señalización de respuesta al daño inducido en el ADN, para de este modo, intentar contrarrestar los daños ocasionados por las ROS y evitar la transmisión de dichos daños a las células hijas (Hoeijmakers, 2001). En esta cascada de señalización se produce la fosforilación de diversas proteínas, entre ellas la histona γ -H2AX, en residuos SQ por parte de las quinasas ATM y ATR (Marechal y Zou, 2013). Los estudios de fosfoproteómica realizados sobre la línea celular 661W mostró que el tratamiento con H_2O_2 producía un ligero incremento en la fosforilación de ATM en la serina 1987, fosforilación relacionada con su activación (Pellegrini et al., 2006), potenciándose esta tras

la inhibición de PARP-1 (Tabla II, Anexo III). Cabe destacar que ATM es una enzima que responde a DSBs (Paull, 2015), por lo que los resultados aquí indicados sugieren que en presencia del inhibidor de PARP-1 se estaría incrementado la cantidad de DSBs tras el tratamiento oxidativo.

Como ya se mencionó anteriormente, uno de los sustratos de ATM es la histona γ -H2AX, la cual es fosforilada en la serina 139 en respuesta al daño en el ADN (Podhorecka et al., 2010); esta modificación facilita el reagrupamiento de las proteínas implicadas en la reparación del daño en la zona de la lesión. De hecho, se considera a γ -H2AX como un marcador de DSBs en el ADN, aunque también está involucrada en otros procesos biológicos relacionados con el control de la división celular (Savic et al., 2009; Turinetti y Giachino, 2015). Siguiendo la misma tendencia mostrada en los explantes de retina tratados con H_2O_2 , el análisis de fosfoproteómica en la línea 661W mostró un incremento de la fosforilación de γ -H2AX en la S139 (indicada como S140 al tener en cuenta la metionina iniciadora) cuando PARP-1 era inhibida. Lo mismo sucedía con otros sustratos de ATM, entre ellos BRCA1 y MDC1, en los que se observó un incremento de la fosforilación en residuos SQ cuando PARP-1 era inhibida. BRCA1 y MDC1 son proteínas involucradas en la respuesta al daño en el ADN y en el control del ciclo celular (Traven y Heierhorst, 2005). En concreto, BRCA1 es fosforilada en residuos SQ por ATM en respuesta a DSBs y por ATR en respuesta a otro tipo de lesiones (Gatei et al., 2001). En nuestro estudio se observó un incremento significativo de la fosforilación de BRCA1 en la serina 1422 (S1422) ante la inhibición de PARP-1, fosforilación asociada con el papel de BRCA1 en la regulación de la parada del ciclo celular en la fase G_2/M (Traven y Heierhorst, 2005; Xu et al., 2002). En el caso de MDC1, se observó un incremento de la fosforilación en la serina 975 y en la treonina 325, aunque en este caso no están descritas las posiciones concretas de fosforilación por parte de ATM/ATR (Traven y Heierhorst, 2005). Estas observaciones parecen indicar que la inhibición de PARP-1 potencia la respuesta celular al daño en el ADN inducida por el tratamiento oxidativo en la línea 661W, debido principalmente a un incremento de la actividad de las quinasas ATM/ATR.

El tratamiento con H_2O_2 produce mayoritariamente SSBs a concentraciones intermedias (alrededor de 0.5 mM), mientras que a concentraciones elevadas (superiores a 50 mM) predomina la formación de DSBs (Dahm-Daphi et al., 2000; Driessens et al., 2009). Además, está demostrado que el tratamiento con H_2O_2 induce la activación de PARP-1 (Bakondi et al., 2002; Zhang et al., 2007). Aunque PARP-1 es capaz de reconocer DSBs (Beck et al., 2014), son las SSBs las que mayoritariamente son detectadas por PARP-1, desencadenando su activación y la poli-ADP-ribosilación de proteínas implicadas en la reparación del daño (De Vos et al., 2012; Morgan et al., 2014). En el caso de la presencia de DSBs, estas son detectadas por ATM/ATR, llevando a cabo la fosforilación de sustratos implicados en la DDR, como BRCA1 y MDC1 (Traven y Heierhorst, 2005). Entonces, los tratamientos oxidativos realizados con el H_2O_2 , tanto en explantes de retina (a una concentración de 3.5 mM) como en la línea celular 661W (a una concentración de 1 mM), estarían desencadenando la activación de PARP-1 gracias a la generación de SSBs; si estas roturas no son reparadas correctamente por la célula, en el siguiente ciclo de replicación del material genético o debido a los procesos de transcripción se convierten en DSBs (Lindahl et al., 1995; Woodbine et al., 2011), con graves consecuencias para la supervivencia celular. En este sentido, se ha descrito que la inhibición de PARP-1 reduce la correcta reparación de las SSBs, lo que resulta en la formación de DSBs, y en una mayor susceptibilidad al daño en el ADN inducido por el H_2O_2 (Smith et al., 2016). En relación a estas observaciones, Aguilar-Quesada y colaboradores (2007) muestran que una inhibición prolongada de PARP-1 también induce la formación de DSBs así como una activación de ATM. En concordancia con estos estudios, nuestras observaciones también muestran un mayor daño de doble cadena en el ADN (tanto en los explantes de retina como en la línea celular 661W), así como un mayor grado de fosforilación de los sustratos de ATM/ATR en presencia del inhibidor de PARP-1. Estos resultados parecen indicar que las SSBs generadas por el tratamiento con H_2O_2 no serían reparadas cuando PARP-1 está inhibida, convirtiéndose en DSBs; lo anterior promovería la activación de ATM y la fosforilación de proteínas implicadas en la DDR, cuya consecuencia sería el aumento observado

en la parada del ciclo celular (en las células 661W) y en la muerte celular de la retina neural (Figura 51A). Otros estudios sugieren una regulación negativa entre PARP-1 y ATM. Watanabe y colaboradores (2004) en sus estudios indican que PARP-1 ejercería una regulación negativa sobre ATM, modulando su activación, de tal forma que la inhibición de PARP-1 eliminaría dicho control y permitiría la activación de ATM en respuesta a DSBs. Aguilar-Quesada y colaboradores (2007) también muestran que la inhibición de PARP-1 resulta en la activación de ATM, apoyando la teoría de Watanabe y colaboradores (2004). En nuestro modelo, la inhibición de PARP-1 también podría estimular la activación de ATM, y en tal caso, incrementándose la fosforilación de proteínas implicadas en la DDR, lo cual afectaría a la supervivencia de los fotorreceptores (Figura 51B).

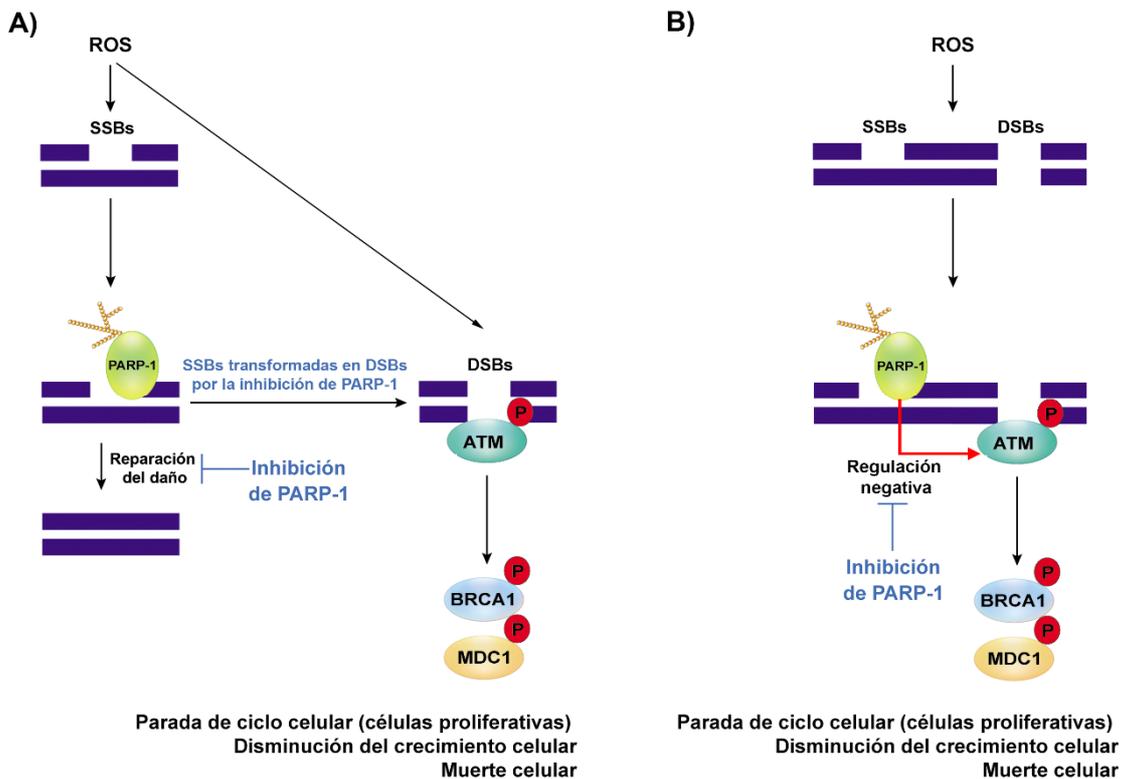


Figura 51. Papel de PARP-1 en la retina neural sometida a estrés oxidativo. A) El tratamiento con H_2O_2 favorece la formación de SSBs en el ADN de las células que componen la retina, en concreto, en los fotorreceptores. Estas SSBs son detectadas por PARP-1, que tras su activación, lleva a cabo la modificación y activación de proteínas involucradas en la reparación del daño en el ADN. El uso de inhibidores de PARP-1 impide la activación de las proteínas implicadas en la reparación del daño. Como consecuencia las SSBs no son

reparadas y se convierten en DSBs. La presencia de DSBs estimula la activación de la quinasa ATM, que fosforila proteínas implicadas en la DDR, tales como BRCA1 y MDC1, que contribuyen en la parada de ciclo celular (en células proliferativas) y en la inducción de la muerte celular. **B)** PARP-1 regula negativamente la actividad de ATM, de tal forma que la inhibición de PARP-1 evita dicha regulación permitiendo la activación de ATM y la fosforilación de proteínas implicadas en la DDR como se ha descrito en A.

Como se ha descrito, la inhibición de PARP-1 bloquea la progresión del ciclo celular en la línea celular 661W; sin embargo, este resultado no puede trasladarse a los cultivos organotípicos de retina, puesto que en este caso los cultivos están constituidos por células post-mitóticas que no se encuentran en ciclo. En este sentido, se ha descrito que las neuronas post-mitóticas sometidas a estímulos agudos (como el estrés oxidativo) intentan reingresar en el ciclo celular (Frade y Ovejero-Benito, 2015), pero al encontrarse con una situación de bloqueo de la progresión del ciclo debido al daño inducido, terminan por no dividirse y acaban muriendo por apoptosis (Becker y Bonni, 2004). Por lo tanto, el incremento de la muerte celular en los cultivos organotípicos de retina tras la inhibición de PARP-1 podría venir precedido por un intento de las neuronas de volver a entrar en el ciclo celular, tal como se ha observado en enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo el Alzheimer (Frade y Ovejero-Benito, 2015). La incorrecta reparación de las DSBs en las neuronas conlleva a una activación continua de la respuesta DDR, lo que ocasiona una desregulación del ciclo celular y la reentrada aberrante de neuronas en fase G₁ que conduce a disfunción neuronal, apoptosis y senescencia (Herrup et al., 2004). Además, este fenómeno de muerte celular derivado de la reentrada en ciclo de las neuronas post-mitóticas parece compartir mecanismos moleculares similares a los observados en la respuesta al daño en el ADN (Frade y Ovejero-Benito, 2015) en la cual participa ATM (Folch et al., 2012). En relación a estas evidencias, se ha observado que en enfermedades neurodegenerativas, los fotorreceptores reactivan proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular durante los fenómenos de apoptosis (Zencak et al., 2013). Estos trabajos, así como los resultados obtenidos en esta Tesis, sugieren que ciertas neuronas post-mitóticas intentarían entrar de nuevo en el ciclo celular tras el tratamiento oxidativo,

proceso abortivo que culminaría con la muerte de las neuronas. La inhibición de PARP-1 generaría un mayor bloqueo de la progresión del ciclo celular, exacerbando los fenómenos de muerte celular.

Los resultados de esta Tesis indican que la inhibición de PARP-1 ejerce un efecto negativo en la supervivencia de las células que componen la retina tras el tratamiento oxidativo, en parte debido al incremento en el daño del ADN. No obstante, estos resultados van en contradicción con otros estudios donde se observa que la inhibición de PARP-1 incrementa la supervivencia de los fotorreceptores en modelos murinos de degeneración retiniana (Sahaboglu et al., 2016), o en los que la sobreactivación de las enzimas PARPs promueven la muerte de los fotorreceptores en ratones con degeneración retiniana (Pearl et al., 2015). Estos estudios están en concordancia con otros en los que la sobreactivación de PARP-1 es capaz de inducir muerte celular (Andrabi et al., 2006; Aredia y Scovassi, 2014), debido al consumo excesivo de NAD⁺, lo que desencadena una caída de los niveles de ATP, contribuyendo a un fallo energético dentro de la célula (Kauppinen y Swanson, 2007). Estas evidencias sugieren que la inhibición de PARP-1 podría tener un papel beneficioso para contrarrestar la muerte celular en ciertos modelos de degeneración retiniana; sin embargo, en el modelo de degeneración inducida por el daño oxidativo, estudiado en esta Tesis, la inhibición de PARP-1 potencia la muerte celular.

Como se ha comentado anteriormente, la reducción en la actividad de PARP-1 resulta en una menor pérdida de fotorreceptores en modelos genéticos de degeneración retiniana (Paquet-Durand et al., 2007; Sahaboglu et al., 2016), tendencia totalmente opuesta a lo observado en nuestro modelo. El diferente comportamiento de PARP-1 aquí observado podría deberse a la naturaleza del estímulo usado para inducir la degeneración de las células retinianas. Los modelos de degeneración retiniana comentados anteriormente se basan en la presencia de mutaciones en los fotorreceptores (Paquet-Durand et al., 2007; Sahaboglu et al., 2016), mientras que en nuestro estudio empleamos un modelo de estrés oxidativo inducido mediante el tratamiento con H₂O₂. Además, estos autores también establecen que la eficacia de la inhibición de PARP-1 para incrementar la supervivencia de los fotorreceptores depende de

la mutación responsable de la degeneración celular (Jiao et al., 2016), lo que indica que no todos los procesos degenerativos acontecerían de la misma forma. Por otro lado, en los modelos de degeneración retiniana empleados habitualmente, la mutación afecta únicamente a los bastones, y no a los conos. En la degeneración retiniana, en primer lugar, se produce la muerte de los bastones como consecuencia directa de las mutaciones en su material genético, mientras que la causa exacta de la muerte de los conos que sucede posteriormente aun no está esclarecida (Narayan et al., 2016). Para ello, se ha propuesto que la muerte inicial de los bastones puede generar una situación de hiperoxia en la retina, lo que puede derivar en la generación de estrés oxidativo, que desencadenaría la posterior muerte de los conos (Campochiaro y Mir, 2018). En este caso, en nuestro modelo oxidativo se estaría generando una situación de estrés similar a la que podría originarse tras la muerte de los bastones en el modelo de degeneración genética y que afectaría a la supervivencia de los conos. En este caso la inhibición de PARP-1 potenciaría la muerte de los conos inducida por el estrés oxidativo, y no la de los bastones. En este sentido, otros autores también han mostrado que la inhibición de PARP-1 potencia el daño oxidativo en las células del ojo (Smith et al., 2016).

En resumen, en esta Tesis queda demostrado que en la retina neural la enzima PARP-1 juega un papel crucial en los procesos de reparación del daño inducido por agentes oxidantes, ya que su inhibición incrementa la presencia de marcadores de daños en el ADN (expresión de γ -H2AX) y la fosforilación de proteínas implicadas en la respuesta al daño en el ADN, resultando todo ello en un incremento de la muerte celular.

5.3. Activación de PARP-1, agotamiento energético y fragmentación mitocondrial en las células hepáticas sometidas a tratamiento oxidativo

Anteriormente se ha discutido como la inhibición de PARP-1 en la retina sometida a estrés oxidativo ejercía un efecto negativo en la supervivencia celular, por lo que no sería recomendable el uso de los inhibidores de PARP-1 en estas condiciones. No obstante, el efecto de los inhibidores de PARP-1

potenciando la muerte celular es la base de su uso en la terapia de ciertos tumores (Bryant et al., 2005; Weston et al., 2010), ya que la inhibición de la reparación del ADN tras la inducción de daños en él, sensibiliza hacia la muerte celular inducida por agentes quimioterápicos, al incrementar el daño en el ADN (Bryant et al., 2005; Weston et al., 2010); en este sentido, los inhibidores de PARP-1 son de gran interés para el tratamiento de ciertos tumores (Pilie et al., 2019). Por otro lado, como se ha visto en modelos de retinitis pigmentosa (Sahaboglu et al., 2016), los inhibidores de PARP-1 pueden tener un papel beneficioso al promover la supervivencia celular. Todo esto indica que PARP-1 puede presentar un doble papel, promoviendo la reparación del daño en el ADN (y por tanto la supervivencia) o induciendo la muerte celular. Ante esta dualidad, en la presente Tesis doctoral se propuso evaluar el papel de PARP-1 en otro modelo o sistema donde se indujo un estrés oxidativo, y de este modo poder determinar si se reproducen los hallazgos obtenidos en el modelo de retina neural.

Entonces, nuestro objeto de estudio fue el hígado, dado que al ser un órgano con una evidente función detoxificadora se encuentra expuesto a altas concentraciones de ROS, y por tanto, siendo susceptible, al igual que la retina, de padecer alteraciones en sus componentes celulares. Precisamente, el desarrollo y progresión de varias enfermedades hepáticas está ligada a la presencia de estrés oxidativo (Cichoz-Lach y Michalak, 2014), por lo que el estudio de los mecanismos moleculares implicados en estas situaciones es crucial para contrarrestar la progresión de dichas patologías. Por este motivo, se escogió a las células hepáticas como modelo para evaluar el papel de PARP-1 en la viabilidad de las células hepáticas sometidas a estrés oxidativo, utilizando para ello la línea celular humana WRL68, que presenta características propias de los hepatocitos y la cual ha sido descrita como un modelo *in vitro* de células hepáticas (Gutierrez-Ruiz et al., 1994).

Lo más relevante del estudio utilizando las células hepáticas fue comprobar que la inhibición de PARP-1, bien con el inhibidor PJ34 (que inhibe la actividad de poli-ADP-ribosilación tanto de PARP-1 como de PARP-2) o con el inhibidor AG14361 (inhibidor específico de PARP-1), no potenció los eventos

de muerte celular como sucedía en el modelo de retina, sino que, en cambio, incrementó la viabilidad de las células WRL68, reduciendo los procesos de muerte celular, lo que indica un papel protector de los inhibidores de PARP-1 en las células hepáticas que sufren situaciones de estrés oxidativo. Estos resultados están en consonancia con otros trabajos donde se describen que una sobreactivación de PARP-1 conduce a la muerte celular, estableciéndose así el concepto de muerte celular mediada por PARP-1 (Bai et al., 2015; Sodhi et al., 2010; Virag y Szabo, 2002). Este proceso de muerte puede deberse a una traslocación del factor inductor de apoptosis (AIF) desde la mitocondria al núcleo y está mediado por el polímero de poli-ADP-ribosa (PAR) (Yu et al., 2006; Yu et al., 2002); por ello, este fenómeno es conocido como *PARthanatos* (Galluzzi et al., 2012). Por otro lado, como se ha comentado en repetidas ocasiones a lo largo de esta Tesis, una sobreactivación de PARP-1 puede generar un consumo excesivo de NAD^+ , ocasionando una alteración del flujo glicolítico y promoviendo la muerte celular (Berger et al., 1983; Ying et al., 2002). En el modelo hepático, la administración exógena de NAD^+ fue capaz de reducir la muerte celular inducida por el H_2O_2 , de igual forma que se conseguía con el uso de los inhibidores de PARP-1. Varios autores muestran también que la administración exógena de NAD^+ contrarresta la caída en los niveles intracelulares de NAD^+ tras la sobreactivación de PARP-1 (Alano et al., 2010; Diani-Moore et al., 2017; Zhu et al., 2016). Por tanto, estos datos indican que en el modelo hepático el tratamiento oxidativo generaría una sobreactivación de PARP-1 que provocaría un agotamiento en los niveles intracelulares de NAD^+ , desencadenando la muerte celular por estrés energético; la inhibición de PARP-1 o la administración exógena de NAD^+ evitarían dicho agotamiento, reduciendo la muerte celular e incrementado la viabilidad de las células hepáticas. De esta forma, el bloqueo de la actividad de PARP-1 podría ser considerado como una nueva diana experimental para aquellas situaciones patológicas en relación con las células hepáticas donde se produzca un exacerbado estrés oxidativo y una excesiva activación de PARP-1.

El tratamiento de la línea WRL68 con concentraciones bajas de H_2O_2 , tales como 0.25 mM, generó una activación moderada de PARP-1 con poca

afectación sobre la viabilidad celular; sin embargo, el tratamiento con concentraciones elevadas (3.5 y 5 mM) resultó en una marcada activación de PARP-1 y en un descenso acusado de la viabilidad celular. En concreto, el tratamiento con una concentración de 3.5 mM de H₂O₂ produjo una reducción de los niveles de ATP, que podían ser restaurados mediante el uso de inhibidores de PARP-1 así como con la administración exógena de NAD⁺. Estos resultados son compatibles con lo descrito en relación a la severidad del daño en el ADN y el destino celular; de tal manera que cuando el daño en el ADN es leve (por ejemplo, usando bajas concentraciones de H₂O₂ como agente oxidante) se produce una ligera activación de PARP-1 y una reparación del daño (Andrabi et al., 2008; Jubin et al., 2016); en cambio, un daño excesivo en el ADN, inducido por altos niveles de ROS (generadas con las concentraciones elevadas de H₂O₂), conduce a una excesiva activación de PARP-1 que ocasiona una caída drástica en los niveles de NAD⁺ intracelulares y una grave alteración en la bioenergética celular, favoreciendo la muerte celular (Andrabi et al., 2008; Jubin et al., 2016).

Diversos autores han establecido que una excesiva activación de PARP-1 desencadena un proceso de necrosis (Ha y Snyder, 1999; Virag et al., 1998a; Virag et al., 1998b); sin embargo, en nuestro estudio el tipo de muerte celular que se estaba induciendo con el tratamiento oxidativo (3.5 mM de H₂O₂ durante 0.5 horas) presentaba características de apoptosis, siendo las células positivas para el marcador anexina V, además de no mostrar liberación al medio de la enzima LDH, marcador de necrosis. En relación a lo anterior, ha sido descrito que el tratamiento de hepatocitos primarios murinos con concentraciones de 3 mM de H₂O₂ durante 16 horas sí genera un incremento de la necrosis celular, que puede ser contrarrestada con los inhibidores de PARP-1 (Mukhopadhyay et al., 2014); en cambio, el tratamiento de la línea celular WRL68 con concentraciones de 0.3 mM de H₂O₂ durante 3 horas induce alteraciones del potencial de membrana mitocondrial (Tapodi et al., 2005), compatible con procesos de apoptosis. Estos trabajos sugieren que en los hepatocitos los mecanismos involucrados en la muerte celular inducida mediante el tratamiento con H₂O₂ dependen del tipo y de la duración del estímulo empleado.

En consonancia con los resultados obtenidos por Tapodi y colaboradores (2005), el tratamiento con H₂O₂ produjo alteraciones en las mitocondrias relacionadas con una disfunción energética. Estudios *in vivo* sugieren que la disfunción mitocondrial observada en distintas enfermedades hepáticas está estrechamente ligada al estado bioenergético de los hepatocitos (Perez-Carreras et al., 2003). De tal modo que los procesos de disfunción mitocondrial se asocian con cambios en la morfología mitocondrial; un estado de escasez de energía se asocia con una morfología mitocondrial del tipo globular, mostrando las mitocondrias un menor tamaño, característico de los procesos de fragmentación o fisión mitocondrial (Westermann, 2012), mientras que un estado energético óptimo o normal se corresponde con la presencia de mitocondrias con formas tubulares e interconectadas (fusión mitocondrial). Por lo tanto, los fenómenos de fisión mitocondrial se asocian con una disminución de la respiración celular y de los niveles de ATP intracelulares, estando también relacionados con la disfunción mitocondrial y la muerte celular (Picard et al., 2013). Asimismo, diversos estudios muestran un incremento de los fenómenos de fragmentación mitocondrial desencadenados por la presencia de ROS (Barsoum et al., 2006; Fan et al., 2010; Jendrach et al., 2008; Yu et al., 2011; Zhang et al., 2010). En nuestro estudio el incremento en la cantidad de mitocondrias globulares y de reducido tamaño tras el tratamiento oxidativo sugiere la inducción de procesos de fragmentación mitocondrial, que se corresponderían con aquellas situaciones donde se produce una mayor tasa de apoptosis. Estos fenómenos pueden ser bloqueados o reducidos mediante el uso de inhibidores de PARP-1; siendo estos resultados los primeros en describir que la inhibición de PARP-1 protege de la fragmentación mitocondrial (Martin-Guerrero et al., 2017b).

El efecto protector de los inhibidores de PARP-1 sobre la fragmentación mitocondrial tras el tratamiento oxidativo sugiere una relación estrecha entre la activación de PARP-1 y la disfunción mitocondrial. De hecho, otros estudios también muestran que la activación de PARP-1 conlleva a una alteración de la función mitocondrial (Bai et al., 2015; Brunyanszki et al., 2016; Burkle y Virag, 2013; Cipriani et al., 2005; Virag et al., 1998a); no obstante, los mecanismos

implicados en esta relación no están totalmente esclarecidos. Varias hipótesis podrían responder a esta cuestión. En primer lugar, el NAD^+ , un coenzima necesario para las rutas metabólicas bioenergéticas (tanto para la glicolisis como para el ciclo de Krebs y la respiración mitocondrial), sufre una acusada caída en sus niveles tras la sobreactivación de PARP-1, generando esta situación un agotamiento en los niveles de ATP intracelulares, lo cual resulta en una pérdida de la función mitocondrial (Cipriani et al., 2005). En segundo lugar, algunos autores sugieren la existencia de una PARP mitocondrial, cuya activación podría promover una disfunción mitocondrial debido a la poli-ADP-ribosilación de proteínas mitocondriales (Bai et al., 2015; Brunyanszki et al., 2016). En tercer lugar, la alteración mitocondrial observada tras la activación de PARP-1 podría deberse a cambios en la proporciones intracelulares de NAD^+/NADH , ya que esta relación es crucial en la biogénesis mitocondrial (Hangen et al., 2015; Stein y Imai, 2012); el NAD^+ es necesario para la generación de NADH, el cual a su vez estimula la importación de proteínas durante la biogénesis de los complejos de la cadena de transporte electrónico, por lo que una reducción en los niveles de NADH desencadenado por el agotamiento del NAD^+ podría afectar a la biogénesis mitocondrial. Por último, la alteración de los niveles de NAD^+ como consecuencia de la actividad de PARP-1 podría interferir con la actividad de la enzima sirtuina 3, localizada en la mitocondria. La sirtuina 3 es esencial para la regulación de la actividad de los complejos respiratorios, de la enzima MnSOD y de otras proteínas necesarias para la regeneración de cofactores implicados en los equilibrios de oxidación y reducción del glutatión (Giralt y Villarroya, 2012). Asimismo, la sirtuina 3 lleva a cabo un papel importante en la producción de energía y en la detoxificación de las ROS. Puesto que la actividad de la sirtuina 3 también depende de la presencia de NAD^+ , no es extraño pensar que compita con PARP-1 por el NAD^+ ; además ha sido descrito que una sobreactivación de PARP-1 desencadena un descenso en la actividad de la sirtuina 3 (Canto et al., 2013), mientras que la inhibición de PARP-1 favorece el incremento de la actividad de la sirtuina 3 y de varias enzimas antioxidantes mitocondriales (Yoon y Kim, 2016). Estas evidencias sugieren que el papel de los inhibidores de PARP-1 en la capacidad de reducir la fragmentación mitocondrial tras el daño oxidativo

estaría relacionado con la activación de la sirtuina 3; no obstante, serían necesarios estudios adicionales para confirmar esta relación. En cualquier caso, el agotamiento de NAD^+ tras el daño oxidativo en las células hepáticas parece tener un papel importante en la inducción de la fragmentación mitocondrial, puesto que la administración exógena del NAD^+ en las condiciones anteriores ejerce un papel protector, al igual que el producido por los inhibidores de PARP-1.

En resumen, una actividad excesiva de PARP-1 como consecuencia de una dosis aguda de ROS ocasionaría un desequilibrio energético, favoreciendo la fragmentación mitocondrial, lo que conduciría a una disfunción mitocondrial y a la muerte celular (Figura 52). La inhibición de PARP-1 o la restauración de los niveles energéticos dentro de la célula evitarían dichas alteraciones mitocondriales favoreciendo la supervivencia celular (Figura 52). Asimismo, nuestro estudio en las células hepáticas muestra un papel prometedor de los inhibidores de PARP-1 en el tratamiento de aquellas alteraciones hepáticas que cursen con altos niveles de ROS, tal y como se observa en distintos modelos murinos de patologías hepáticas (Gariani et al., 2017; Huang et al., 2017; Mukhopadhyay et al., 2017).

5.4. PARP-1, estrés energético y cambios en el fosfoproteoma

PARP-1 modifica a una serie de proteínas mediante la adición del polímero PAR, modulando así la actividad de las mismas; en concreto, se ha descrito que PARP-1 es capaz de regular la actividad de la DNA-PKcs (Ruscetti et al., 1998) y de otras quinasas (Fouquerel et al., 2014; Monaco et al., 2005; Racz et al., 2010). Esta capacidad para modular la actividad de quinasas puede traducirse en una menor o mayor fosforilación de sus sustratos, teniendo un impacto sobre las rutas de señalización intracelular. Ante esta posibilidad, en esta Tesis se analizó el fosfoproteoma tras el tratamiento oxidativo inductor de la actividad de poli-ADP-ribosilación de PARP-1, así como en situaciones de bloqueo de dicha actividad o tras la administración del sustrato NAD^+ .

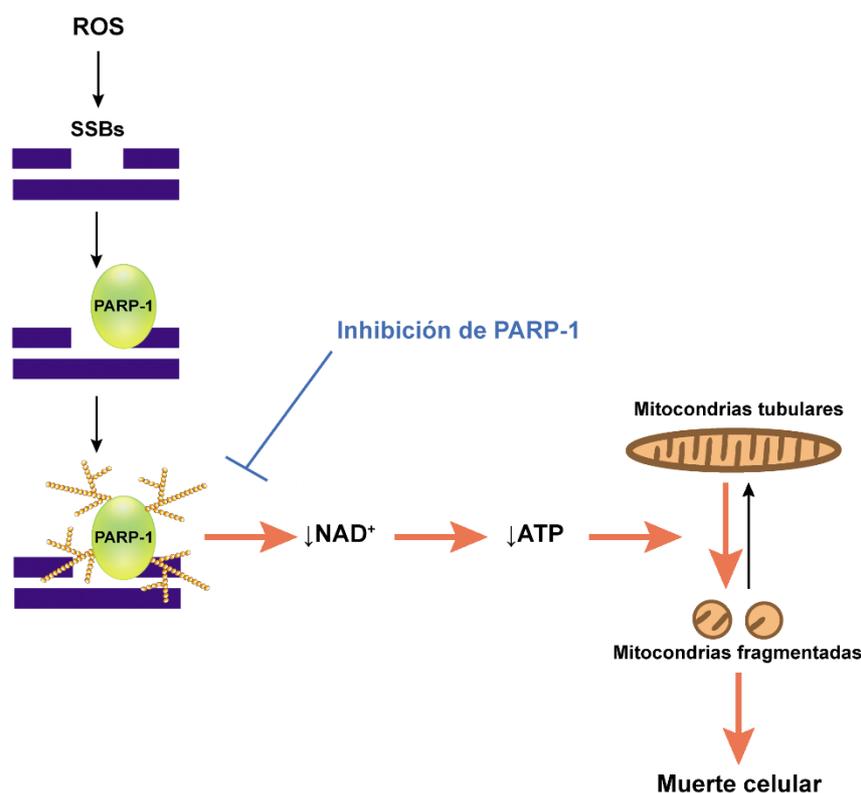


Figura 52. Papel de PARP-1 en la muerte celular inducida por estrés oxidativo en un modelo *in vitro* de hepatocitos. El tratamiento con H₂O₂, agente inductor de ROS, genera daños en el ADN en la línea celular WRL68 (modelo *in vitro* de hepatocitos humanos) lo que conduce a una activación excesiva de PARP-1. Esta activación de PARP-1 provoca una caída drástica en los niveles de NAD⁺ intracelulares, y por tanto agotándose las reservas de ATP, generándose por tanto un estrés energético dentro de la célula. Este estrés energético favorece el proceso de fragmentación mitocondrial, ocasionando una disfunción mitocondrial que culmina con la muerte celular. La inhibición de PARP-1 reduce los eventos de fragmentación mitocondrial y la muerte celular al contrarrestar la caída en los niveles intracelulares de NAD⁺.

El análisis de fosfoproteómica mostró que la inhibición de PARP-1 o su silenciamiento eran capaces de inducir cambios en el grado de fosforilación de las proteínas, principalmente en aquellas quinasas relacionadas con las vías de señalización por un estrés energético, en este caso, inducido por la excesiva activación de PARP-1 tras el estímulo oxidativo, y condicionado por la disminución de los niveles del sustrato NAD⁺.

El NAD⁺ es un coenzima necesario para la producción de ATP, por lo que una caída en sus niveles puede ocasionar graves consecuencias a la célula; PARP-1 es una de las principales enzimas catabolizadoras del NAD⁺,

siendo capaz de agotarlo tras su sobreactivación, dejando a la célula con unos niveles alarmantes de aproximadamente el 10-20% con respecto a una situación normal (Berger, 1985; Goodwin et al., 1978; Skidmore et al., 1979). Esto hace que la célula se vea obligada a sintetizar continuamente NAD^+ o activar las rutas que restauren sus niveles, estimulando las vías energéticas. De hecho, el descenso de los niveles de NAD^+ por la activación excesiva de PARP-1 induce un fallo energético en la célula por alteración del flujo glicolítico (Andrabi et al., 2014; Ying et al., 2002). Por ello, no es sorprendente que el estrés energético induzca cambios en las rutas de señalización intracelulares en respuesta a la sobreactivación de PARP-1.

En este estudio, la actividad de la enzima AMPK, principal sensor energético dentro de la célula, y encargada de restaurar los niveles energéticos ante situaciones de estrés (Garcia y Shaw, 2017), mostró un incremento significativo (actividad determinada en base al grado de fosforilación de sus sustratos) tras la activación de PARP-1 inducida por el H_2O_2 ; en cambio, la actividad de AMPK mostró valores reducidos tras el silenciamiento de PARP-1, y algunos de sus sustratos también veían reducida su fosforilación cuando se administró el NAD^+ . Estos resultados sugerían que parte de la activación de AMPK se producía por el desequilibrio energético (condicionado por la bajada del NAD^+) ocasionado por la activación excesiva de PARP-1. En consonancia con nuestros resultados, Rodríguez-Vargas y colaboradores (2012) han mostrado que en una situación de privación de nutrientes la inhibición de PARP-1 limita la activación de AMPK, estableciendo una relación entre ambas enzimas; además otros estudios también han descrito un incremento de la actividad de AMPK tras la activación de PARP-1 (Meng et al., 2018; Singh et al., 2018). Estas observaciones, junto con los resultados descritos en esta Tesis en relación a las células hepáticas, indican que el estrés energético generado por una sobreactivación de PARP-1 sería suficiente para inducir la activación de la enzima AMPK.

El incremento en los niveles de ADP, y especialmente de AMP, induce la activación de AMPK (Gowans et al., 2013), por lo que aquellas situaciones que desencadenen un incremento del ratio $[\text{AMP/ADP} : \text{ATP}]$, como por ejemplo un

descenso en los niveles de ATP, podría desencadenar la activación de AMPK. En el modelo hepático descrito, la activación de PARP-1 produce una caída significativa en los niveles de ATP, incrementando el ratio [AMP/ADP: ATP], y por tanto, promoviendo la activación de AMPK. En consonancia con nuestras observaciones, otros estudios también han mostrado que una activación de PARP-1 reduce los niveles de ATP e incrementa los niveles de AMP, además de inducir la activación de AMPK (Ethier et al., 2012).

Los resultados aportados por la herramienta KSEA muestran también que el silenciamiento de PARP-1 disminuye la supresión de la actividad de la quinasa mTOR, coincidiendo con el descenso de la actividad de AMPK. Es importante destacar que AMPK ha sido descrita como quinasa reguladora de la actividad de la mTOR, a través de la inhibición del complejo mTORC1, ante situaciones de estrés (Ethier et al., 2012). Por lo tanto, nuestros resultados apoyan esta relación entre AMPK y mTOR tras la inducción de situaciones de estrés celular, aunque las diferencias observadas en nuestro estudio respecto a la actividad de mTOR son menos pronunciadas que las obtenidas para AMPK. En este caso, serían necesarios estudios adicionales para confirmar la posible activación de mTOR cuando la actividad de PARP-1 es bloqueada y su relación con AMPK en el modelo hepático.

Por otro lado, en el estudio de fosfoproteómica para detectar la activación de de quinasas, se observa también un incremento en la actividad de Akt tras el silenciamiento de PARP-1 en las condiciones oxidativas, al igual que lo mostrado por otros autores utilizando la misma línea celular (Tapodi et al., 2005). Este incremento en la actividad de Akt tras el bloqueo de PARP-1 produce un aumento de la supervivencia celular, tal como indica nuestro estudio y el de Tapodi y colaboradores (2005). Por ello, la activación de AMPK y la inactivación de Akt podrían estar relacionadas entre sí en las células que sufren estrés oxidativo y que a su vez muestran una sobreactivación de PARP-1, ya que ante estas situaciones se induce un incremento del ratio [AMP:ATP] que puede generar la activación de AMPK, interfiriendo con la señalización de Akt, reduciendo su actividad y promoviendo la muerte celular (Priebe et al., 2011). Una observación similar a esta disquisición ha sido descrita por Xu y

colaboradores (2014), donde la activación de AMPK conduce a una inhibición de mTOR y de Akt. Por tanto, en nuestro estudio se observa una mayor supresión de la actividad de mTOR y una menor actividad de Akt cuando AMPK presenta mayor grado de actividad; mientras que cuando AMPK ve reducida su actividad, como consecuencia del silenciamiento de PARP-1, se incrementa la actividad de Akt y disminuye la supresión de mTOR. De acuerdo a estas evidencias, es posible que AMPK, ante la crisis energética desencadenada por la sobreactivación de PARP-1, esté modulando las vías de señalización de mTOR y Akt para contrarrestar el descenso en los niveles energéticos; no obstante, serían necesarios estudios adicionales para confirmar la posible relación funcional entre las citadas quinasas en este modelo.

Los resultados discutidos anteriormente sugieren que el estrés energético estimularía la actividad de AMPK, pero su relación con la inducción de la muerte celular desencadenada por dicho estrés no está del todo clara. AMPK, para contrarrestar la deficiencia energética, promueve la activación de rutas catabólicas e inhibe las anabólicas (Hardie et al., 2003). Además, se ha descrito recientemente que ante una situación de estrés energético AMPK promueve los eventos de fisión mitocondrial, probablemente para iniciar el proceso de mitofagia de los fragmentos mitocondriales dañados (Toyama et al., 2016). Otros estudios, en cambio describen cómo la activación de AMPK desencadenada por una sobreactivación de PARP-1 se relaciona con la inducción de autofagia y con una reducción de los eventos de muerte celular (Rodríguez-Vargas et al., 2012; Zhou et al., 2013), indicando un papel positivo de la activación de AMPK sobre la supervivencia celular. Asimismo, se ha visto que la activación de AMPK protege de la muerte celular desencadenada por el tratamiento oxidativo con H₂O₂ en osteoblastos (She et al., 2014). Estos estudios, por tanto, indican que la activación de AMPK promueve la supervivencia celular. No obstante, hay autores que establecen que en determinadas circunstancias AMPK podría desencadenar la muerte celular. De hecho, las primeras evidencias al respecto se obtuvieron en células hepáticas donde una activación prolongada de AMPK inducía la muerte celular por apoptosis a través de la activación de la quinasa JNK y la caspasa 3 (Meisse et

al., 2002). Otros autores indican que AMPK puede promover la muerte celular por la inhibición de la actividad de Akt, tal y como se describió anteriormente (Priebe et al., 2011). De hecho, se ha visto que la activación de AMPK podría estar implicada en la inducción de la muerte celular en cardiomiocitos tratados con H₂O₂ (Chen et al., 2013). Por tanto, los datos aportados anteriormente parecen sugerir que el papel de AMPK respecto a promover la supervivencia o la muerte depende del tipo celular considerado, del estímulo que lo induce, e incluso del periodo del tiempo durante el cual AMPK permanece activa.

Considerando los datos obtenidos en nuestro estudio sobre las células hepáticas y las evidencias aportadas por otros autores, concluimos que aunque AMPK pueda promover la activación de rutas implicadas en el crecimiento celular, en nuestro estudio, esta activación no es suficiente para mantener en un estado viable a la célula; teniendo en cuenta el daño oxidativo derivado de la acción de las ROS sobre las células hepáticas y el incremento de los eventos de fragmentación mitocondrial, la activación de AMPK no es suficiente para mantener a la célula con vida. En cambio, el bloqueo de la actividad de PARP-1 (bien por el uso de inhibidores o por el silenciamiento de la proteína) o la administración exógena de NAD⁺ reducen el estrés energético generado (por tanto, disminuyendo la activación de AMPK) y los fenómenos de fragmentación mitocondrial, reduciendo así la muerte celular.

En resumen, en este último apartado de la Tesis doctoral se ha discutido cómo la activación de PARP-1 tras el tratamiento oxidativo induce cambios en el fosfoproteoma celular, los cuales, en parte, son revertidos mediante la inhibición o el silenciamiento de PARP-1. Dichos cambios estarían desencadenados por un estrés energético derivado de la sobreactivación de PARP-1, ya que la administración exógena de NAD⁺ simula el efecto producido por el inhibidor de PARP-1 o por su silenciamiento.

Finalmente, y antes de esbozar las conclusiones de esta Tesis doctoral, cabe destacar que el diferente destino de las células en los modelos estudiados y desencadenado tras la activación de PARP-1 tras el daño oxidativo puede ser

justificado en base al grado de activación de PARP-1 en respuesta a dicho daño. En el modelo de retina neural, aunque se observa activación de PARP-1 en respuesta al daño oxidativo, dicha activación no sería lo suficientemente elevada para producir un agotamiento en los niveles de NAD⁺ como sucede en el modelo hepático. Tal y como se ha comentado a lo largo de esta Tesis doctoral, ante un daño leve en el ADN, la activación de PARP-1 estaría destinada a promover la reparación de dicho daño; mientras que un daño exacerbado podría conducir a una activación excesiva de PARP-1, que generaría un déficit energético y la muerte celular (Andrabi et al., 2008; Elkholi y Chipuk, 2014; Jubin et al., 2016). De hecho, en el modelo de retina sometido a estrés oxidativo el daño en el ADN se potencia cuando PARP-1 es inhibida, indicando un papel necesario de PARP-1 en la reparación de dicho daño. En el modelo hepático, sin embargo, el daño generado puede estar desencadenando una activación excesiva de PARP-1, que tal y como se ha visto a lo largo de los resultados aquí mostrados, generaría un déficit energético dentro de la célula, causando finalmente la muerte celular. Por tanto, el grado de activación de PARP-1 puede determinar el destino final de la célula, promoviendo la reparación del daño o la muerte celular.

6. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

Primera. Durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón se produce un incremento del daño oxidativo a partir del día 14 de desarrollo, daño que se incrementa progresivamente hasta la etapa adulta.

Segunda. PARP-1 posee una alta actividad en la retina de ratón durante la primera semana de desarrollo postnatal. Esta actividad desciende durante la segunda semana de desarrollo y se mantiene baja hasta la etapa adulta.

Tercera. La aparición de daños oxidativos en la retina postnatal coincide con el periodo donde PARP-1 muestra una baja actividad.

Cuarta. En el día 7 del desarrollo postnatal de la retina, cuando la retina neuroblástica se diferencia en las capas definitivas de la retina, la mayoría de células que poseen daños de doble cadena en el ADN están induciendo procesos de muerte celular.

Quinta. En los cultivos organotípicos de retina de ratón sometidos a un tratamiento oxidativo con H₂O₂ la inhibición de PARP-1 mediante el inhibidor PJ34 incrementa el daño en el ADN y la muerte celular, afectándose principalmente las células de los fotorreceptores.

Sexta. En la línea celular 661W, derivada de fotorreceptores, el tratamiento oxidativo con H₂O₂ estimula la activación de PARP-1 y modifica el fosfoproteoma de estas células. En estas condiciones, la inhibición de PARP-1 potencia los cambios observados en el fosfoproteoma y disminuye la proliferación celular.

Séptima. La fosforilación de proteínas en motivos SQ, relacionadas con el proceso biológico de respuesta celular al daño en el ADN, es incrementada cuando la actividad de PARP-1 es inhibida en las células 661W sometidas al tratamiento oxidativo.

Octava. En los cultivos organotípicos de retina de ratón y en las células 661W sometidas a situaciones de estrés oxidativo el bloqueo de la actividad de PARP-1 induce un aumento en la fosforilación de los sustratos de las quinasas ATM/ATR.

Novena. Tanto en la retina en desarrollo como en la retina cultivada *in vitro*, y sometida a tratamiento oxidativo, la disminución en la actividad de PARP-1 se correlaciona con un incremento del daño en el ADN.

Décima. En la línea celular hepática humana WRL68 el tratamiento oxidativo con H₂O₂ estimula la activación de PARP-1 y reduce la viabilidad celular. En estas condiciones, la inhibición de PARP-1 incrementa la viabilidad celular y reduce los procesos de muerte celular.

Decimoprimera. La activación de PARP-1 induce la fragmentación mitocondrial y reduce los niveles intracelulares de ATP en las células WRL68 sometidas a tratamiento oxidativo. La inhibición de PARP-1 o la administración de NAD⁺, sustrato de PARP-1, contrarrestan dichos fenómenos.

Decimosegunda. El tratamiento oxidativo en la línea celular WRL68 genera cambios en el fosfoproteoma celular y modifica el grado de activación de varias quinasas celulares, entre ellas la enzima AMPK. Estos efectos son contrarrestados en gran medida cuando la actividad de PARP-1 es inhibida o cuando la expresión de PARP-1 es silenciada; también, la administración exógena del NAD⁺ revierte parte de estos cambios.

Decimotercera. La caída en los niveles de NAD⁺ provocada por la activación de PARP-1 en las células WRL68 es la responsable de los cambios a nivel molecular (activación de quinasas) y celular (inducción de los procesos de muerte) asociados al daño oxidativo inducido por el tratamiento con H₂O₂.

Decimocuarta. El estrés oxidativo inducido en las células hepáticas con el H₂O₂ genera a su vez un estrés energético que es paliado cuando la actividad de PARP-1 es bloqueada, potenciando de esta manera la viabilidad celular.

Decimoquinta. Ante una situación de estrés oxidativo, el efecto de la inhibición de PARP-1 sobre el destino celular es dependiente del tipo celular considerado. En el caso de células retinianas dicha inhibición tiene un efecto negativo, mientras que en las células hepáticas la inhibición de PARP-1 posee

un efecto beneficioso, convirtiéndose en una posible diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades hepáticas asociadas con dicho estrés.

First. There is a progressive increase in the oxidative damage of postnatal mouse retina after the 14th day of development that becomes higher at adulthood.

Second. The activity of the PARP-1 enzyme increases during the first week of postnatal retinal development and decreases from the second week until adulthood.

Third. The appearance of oxidative damage in postnatal retina coincides with the period in which PARP-1 shows lower activity.

Fourth. Most of the cells showing double strand breaks in DNA are involved in cell death processes at day 7th of postnatal development, when neuroblastic retinal layers start to differentiate into mature layers.

Fifth. The inhibition of PARP-1 using PJ34 inhibitor in retinal organotypic cultures subjected to oxidative treatment with H₂O₂ increases the oxidative DNA damage and the cell death, being photoreceptors the mainly affected cells.

Sixth. Oxidative treatment of 661W cells, a photoreceptor-derived cell line, with H₂O₂ induces PARP-1 activation and modifies the cellular phosphoproteome. If PARP-1 activity is inhibited in these conditions the phosphoproteomics changes are potentiated and the cell proliferation reduced.

Seventh. The inhibition of PARP-1 in 661W cell subjected to oxidative treatment results in phosphorylation of proteins related with the cellular response to DNA damage at SQ motifs.

Eighth. Blocking PARP-1 activity in both 661W cells and mouse retinal organotypic cultures subjected to oxidative stress results in an increase in the phosphorylation of substrates of the kinases ATM/ATR.

Ninth. The increase in the amount of DNA damage observed in the developing retina, and in *in vitro* models of retina subjected to oxidative treatment, correlates with a decrease in the activity of PARP-1.

Tenth. Oxidative treatment with H₂O₂ in the human hepatic cell line WRL68 induces PARP-1 activation and reduces cell viability. In these conditions, PARP-1 inhibition increases the cell viability and reduces cell death processes.

Eleventh. The activation of PARP-1 in WRL68 cells subjected to oxidative treatment induces fragmentation of the mitochondria and reduces the intracellular levels of ATP. The inhibition of PARP-1 or the supplementation with NAD⁺, the substrate of PARP-1, counteracts such effects.

Twelfth. Oxidative treatment in the cell line WRL68 produces changes in the phosphoproteome and modifies the activity of some kinases, including AMPK. These effects are partially counteracted by the inhibition or silencing of PARP-1; in addition, NAD⁺ supplementation has similar effects.

Thirteenth. The decrease in NAD⁺ levels produced by the activation of PARP-1 in WRL68 cells is responsible for the molecular (e.g. modification of the activity of kinases) and cellular (e.g. induction of cell death processes) effects of the oxidative damage induced by treatment with H₂O₂.

Fourteenth. The oxidative stress generated by the H₂O₂-treatment in hepatic cells generated an energy stress that is mitigated when the activity of PARP-1 is blocked, enhancing cell viability.

Fifteenth. The effect of inhibiting PARP-1 under oxidative stress conditions is cell type dependent. So, the inhibition of PARP-1 has a negative effect in retinal cells, while has a positive effect in hepatic cells. Therefore, the inhibition of PARP-1 should be noxious in the treatment of retinal diseases linked to an oxidative condition, but might be considered as a therapeutic target for the treatment of liver diseases related to oxidative stress.

7. REFERENCIAS

- Abdelkarim, G.E., Gertz, K., Harms, C., Katchanov, J., Dirnagl, U., Szabo, C., Endres, M., 2001. Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in in vitro and in vivo models of stroke. *International journal of molecular medicine* 7, 255-260.
- Abplanalp, J., Leutert, M., Frugier, E., Nowak, K., Feurer, R., Kato, J., . . . Hottiger, M.O., 2017. Proteomic analyses identify ARH3 as a serine mono-ADP-ribosylhydrolase. *Nature communications* 8, 2055.
- Abraham, R.T., 1998. Mammalian target of rapamycin: immunosuppressive drugs uncover a novel pathway of cytokine receptor signaling. *Current opinion in immunology* 10, 330-336.
- Aguilar-Quesada, R., Munoz-Gamez, J.A., Martin-Oliva, D., Peralta, A., Valenzuela, M.T., Matinez-Romero, R., . . . Oliver, F.J., 2007. Interaction between ATM and PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition. *BMC molecular biology* 8, 29.
- Ahsan, H., 2013. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Human immunology* 74, 1392-1399.
- Alano, C.C., Garnier, P., Ying, W., Higashi, Y., Kauppinen, T.M., Swanson, R.A., 2010. NAD⁺ depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 2967-2978.
- Altmeyer, M., Barthel, M., Eberhard, M., Rehrauer, H., Hardt, W.D., Hottiger, M.O., 2010. Absence of poly(ADP-ribose) polymerase 1 delays the onset of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-induced gut inflammation. *Infection and immunity* 78, 3420-3431.
- Altmeyer, M., Messner, S., Hassa, P.O., Fey, M., Hottiger, M.O., 2009. Molecular mechanism of poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic acids research* 37, 3723-3738.
- Alvarez-Gonzalez, R., Althaus, F.R., 1989. Poly(ADP-ribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA-damaging agents. *Mutation research* 218, 67-74.
- Ame, J.C., Rolli, V., Schreiber, V., Niedergang, C., Apiou, F., Decker, P., . . . de Murcia, G., 1999. PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *The Journal of biological chemistry* 274, 17860-17868.
- Ame, J.C., Spenlehauer, C., de Murcia, G., 2004. The PARP superfamily. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26, 882-893.
- Andegeko, Y., Moyal, L., Mittelman, L., Tsarfaty, I., Shiloh, Y., Rotman, G., 2001. Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. *The Journal of biological chemistry* 276, 38224-38230.
- Andrabi, S.A., Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2008. Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147, 233-241.

Referencias

- Andrabi, S.A., Kim, N.S., Yu, S.W., Wang, H., Koh, D.W., Sasaki, M., . . . Dawson, T.M., 2006. Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18308-18313.
- Andrabi, S.A., Umanah, G.K., Chang, C., Stevens, D.A., Karuppagounder, S.S., Gagne, J.P., . . . Dawson, T.M., 2014. Poly(ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 10209-10214.
- Andreone, T.L., O'Connor, M., Denenberg, A., Hake, P.W., Zingarelli, B., 2003. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates activation of activator protein-1 in murine fibroblasts. *J Immunol* 170, 2113-2120.
- Angelov, D., Molla, A., Perche, P.Y., Hans, F., Cote, J., Khochbin, S., . . . Dimitrov, S., 2003. The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Molecular cell* 11, 1033-1041.
- Aredia, F., Scovassi, A.I., 2014. Poly(ADP-ribose): a signaling molecule in different paradigms of cell death. *Biochem Pharmacol* 92, 157-163.
- Arnandis, T., Monteiro, P., Adams, S.D., Bridgeman, V.L., Rajeeve, V., Gadaleta, E., . . . Godinho, S.A., 2018. Oxidative Stress in Cells with Extra Centrosomes Drives Non-Cell-Autonomous Invasion. *Developmental cell* 47, 409-424 e409.
- Arundel-Suto, C.M., Scavone, S.V., Turner, W.R., Suto, M.J., Sebolt-Leopold, J.S., 1991. 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. *Radiation research* 126, 367-371.
- Atasheva, S., Akhrymuk, M., Frolova, E.I., Frolov, I., 2012. New PARP gene with an anti-alphavirus function. *Journal of virology* 86, 8147-8160.
- Babiychuk, E., Van Montagu, M., Kushnir, S., 2001. N-terminal domains of plant poly(ADP-ribose) polymerases define their association with mitotic chromosomes. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 28, 245-255.
- Bai, P., Nagy, L., Fodor, T., Liudet, L., Pacher, P., 2015. Poly(ADP-ribose) polymerases as modulators of mitochondrial activity. *Trends Endocrinol Metab* 26, 75-83.
- Bai, P., Virag, L., 2012. Role of poly(ADP-ribose) polymerases in the regulation of inflammatory processes. *FEBS letters* 586, 3771-3777.
- Bakondi, E., Bai, P., Szabo, E.E., Hunyadi, J., Gergely, P., Szabo, C., Virag, L., 2002. Detection of poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissues using biotinylated NAD substrate. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 50, 91-98.
- Baleriola, J., Suarez, T., de la Rosa, E.J., 2010. DNA-PK promotes the survival of young neurons in the embryonic mouse retina. *Cell death and differentiation* 17, 1697-1706.
- Banasik, M., Komura, H., Shimoyama, M., Ueda, K., 1992. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *The Journal of biological chemistry* 267, 1569-1575.

- Barkauskaite, E., Jankevicius, G., Ladurner, A.G., Ahel, I., Timinszky, G., 2013. The recognition and removal of cellular poly(ADP-ribose) signals. *The FEBS journal* 280, 3491-3507.
- Barsoum, M.J., Yuan, H., Gerencser, A.A., Liot, G., Kushnareva, Y., Graber, S., . . . Bossy-Wetzel, E., 2006. Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *The EMBO journal* 25, 3900-3911.
- Barzilai, A., Biton, S., Shiloh, Y., 2008. The role of the DNA damage response in neuronal development, organization and maintenance. *DNA repair* 7, 1010-1027.
- Beatty, S., Koh, H., Phil, M., Henson, D., Boulton, M., 2000. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Survey of ophthalmology* 45, 115-134.
- Beck, C., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Schreiber, V., Dantzer, F., 2014. Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3. *Experimental cell research* 329, 18-25.
- Becker, E.B., Bonni, A., 2004. Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Progress in neurobiology* 72, 1-25.
- Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Kitagawa, R., Melander, F., Kastan, M.B., Bartek, J., Lukas, J., 2006. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *The Journal of cell biology* 173, 195-206.
- Berger, N.A., 1985. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiation research* 101, 4-15.
- Berger, N.A., Sims, J.L., Catino, D.M., Berger, S.J., 1983. Poly(ADP-ribose) polymerase mediates the suicide response to massive DNA damage: studies in normal and DNA-repair defective cells. *Princess Takamatsu symposia* 13, 219-226.
- Betermier, M., Bertrand, P., Lopez, B.S., 2014. Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS genetics* 10, e1004086.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., . . . Galon, J., 2009. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25, 1091-1093.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal* 5, 9-19.
- Bokhari, B., Sharma, S., 2019. Stress Marks on the Genome: Use or Lose? *International journal of molecular sciences* 20.
- Boland, M.L., Chourasia, A.H., Macleod, K.F., 2013. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Frontiers in oncology* 3, 292.
- Brunyanszki, A., Szczesny, B., Virag, L., Szabo, C., 2016. Mitochondrial poly(ADP-ribose) polymerase: The Wizard of Oz at work. *Free radical biology & medicine* 100, 257-270.
- Bryant, H.E., Helleday, T., 2006. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase activates ATM which is required for subsequent homologous recombination repair. *Nucleic acids research* 34, 1685-1691.

Referencias

- Bryant, H.E., Petermann, E., Schultz, N., Jemth, A.S., Loseva, O., Issaeva, N., . . . Helleday, T., 2009. PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *The EMBO journal* 28, 2601-2615.
- Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., . . . Helleday, T., 2005. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434, 913-917.
- Buddi, R., Lin, B., Atilano, S.R., Zorapapel, N.C., Kenney, M.C., Brown, D.J., 2002. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 50, 341-351.
- Burgoyne, J.R., Madhani, M., Cuello, F., Charles, R.L., Brennan, J.P., Schroder, E., . . . Eaton, P., 2007. Cysteine redox sensor in PKG1a enables oxidant-induced activation. *Science* 317, 1393-1397.
- Burkle, A., 2005. Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD⁺. *The FEBS journal* 272, 4576-4589.
- Burkle, A., Virag, L., 2013. Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes. *Molecular aspects of medicine* 34, 1046-1065.
- Calabrese, C.R., Almassy, R., Barton, S., Batey, M.A., Calvert, A.H., Canan-Koch, S., . . . Curtin, N.J., 2004. Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *Journal of the National Cancer Institute* 96, 56-67.
- Caldecott, K.W., McKeown, C.K., Tucker, J.D., Ljungquist, S., Thompson, L.H., 1994. An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. *Molecular and cellular biology* 14, 68-76.
- Campochiaro, P.A., Mir, T.A., 2018. The mechanism of cone cell death in Retinitis Pigmentosa. *Progress in retinal and eye research* 62, 24-37.
- Canan Koch, S.S., Thoresen, L.H., Tikhe, J.G., Maegley, K.A., Almassy, R.J., Li, J., . . . Hostomsky, Z., 2002. Novel tricyclic poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors with potent anticancer chemopotentiating activity: design, synthesis, and X-ray cocrystal structure. *Journal of medicinal chemistry* 45, 4961-4974.
- Canto, C., Sauve, A.A., Bai, P., 2013. Crosstalk between poly(ADP-ribose) polymerase and sirtuin enzymes. *Molecular aspects of medicine* 34, 1168-1201.
- Carmody, R.J., Cotter, T.G., 2000. Oxidative stress induces caspase-independent retinal apoptosis in vitro. *Cell death and differentiation* 7, 282-291.
- Carney, J.P., Maser, R.S., Olivares, H., Davis, E.M., Le Beau, M., Yates, J.R., 3rd, . . . Petrini, J.H., 1998. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93, 477-486.
- Casado, P., Rodriguez-Prados, J.C., Cosulich, S.C., Guichard, S., Vanhaesebroeck, B., Joel, S., Cutillas, P.R., 2013. Kinase-substrate enrichment analysis provides insights into the heterogeneity of signaling pathway activation in leukemia cells. *Science signaling* 6, rs6.

- Casado, P., Wilkes, E.H., Miraki-Moud, F., Hadi, M.M., Rio-Machin, A., Rajeeve, V., . . . Cutillas, P.R., 2018. Proteomic and genomic integration identifies kinase and differentiation determinants of kinase inhibitor sensitivity in leukemia cells. *Leukemia*.
- Ceccaldi, R., Liu, J.C., Amunugama, R., Hajdu, I., Primack, B., Petalcorin, M.I., . . . D'Andrea, A.D., 2015. Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Poltheta-mediated repair. *Nature* 518, 258-262.
- Ciccia, A., Elledge, S.J., 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell* 40, 179-204.
- Cichoż-Lach, H., Michalak, A., 2014. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World journal of gastroenterology* 20, 8082-8091.
- Cipriani, G., Rapizzi, E., Vannacci, A., Rizzuto, R., Moroni, F., Chiarugi, A., 2005. Nuclear poly(ADP-ribose) polymerase-1 rapidly triggers mitochondrial dysfunction. *The Journal of biological chemistry* 280, 17227-17234.
- Clark, J.B., Ferris, G.M., Pinder, S., 1971. Inhibition of nuclear NAD nucleosidase and poly ADP-ribose polymerase activity from rat liver by nicotinamide and 5'-methyl nicotinamide. *Biochimica et biophysica acta* 238, 82-85.
- Coleman, K.A., Greenberg, R.A., 2011. The BRCA1-RAP80 complex regulates DNA repair mechanism utilization by restricting end resection. *The Journal of biological chemistry* 286, 13669-13680.
- Culmsee, C., Zhu, C., Landshamer, S., Becattini, B., Wagner, E., Pellicchia, M., . . . Plesnila, N., 2005. Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 10262-10272.
- Cutillas, P.R., Vanhaesebroeck, B., 2007. Quantitative profile of five murine core proteomes using label-free functional proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 6, 1560-1573.
- Chace, D.H., Kalas, T.A., 2005. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clinical biochemistry* 38, 296-309.
- Chambon, P., Weill, J.D., Mandel, P., 1963. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochemical and biophysical research communications* 11, 39-43.
- Chan, F.K.-M., Moriwaki, K., De Rosa, M.J., 2013. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods in molecular biology (Clifton, N J)* 979, 65-70.
- Chang, H.H.Y., Pannunzio, N.R., Adachi, N., Lieber, M.R., 2017. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature reviews. Molecular cell biology* 18, 495-506.
- Chang, P., Coughlin, M., Mitchison, T.J., 2005a. Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function. *Nature cell biology* 7, 1133-1139.

Referencias

- Chang, W., Dynek, J.N., Smith, S., 2005b. NuMA is a major acceptor of poly(ADP-ribose)ylation by tankyrase 1 in mitosis. *Biochem J* 391, 177-184.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R., Boulton, S.J., 2012. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular cell* 47, 497-510.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., . . . Zhao, L., 2018. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9, 7204-7218.
- Chen, Z., Shen, X., Shen, F., Zhong, W., Wu, H., Liu, S., Lai, J., 2013. TAK1 activates AMPK-dependent cell death pathway in hydrogen peroxide-treated cardiomyocytes, inhibited by heat shock protein-70. *Molecular and cellular biochemistry* 377, 35-44.
- Cheng, Q., Barboule, N., Frit, P., Gomez, D., Bombarde, O., Couderc, B., . . . Calsou, P., 2011. Ku counteracts mobilization of PARP1 and MRN in chromatin damaged with DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research* 39, 9605-9619.
- Chou, D.M., Adamson, B., Dephoure, N.E., Tan, X., Nottke, A.C., Hurov, K.E., . . . Elledge, S.J., 2010. A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 18475-18480.
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., Poirier, G.G., 1999. Poly(ADP-ribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342 (Pt 2), 249-268.
- Dahm-Daphi, J., Sass, C., Alberti, W., 2000. Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in CHO cells. *International journal of radiation biology* 76, 67-75.
- Daniels, C.M., Thirawatananond, P., Ong, S.E., Gabelli, S.B., Leung, A.K., 2015. Nudix hydrolases degrade protein-conjugated ADP-ribose. *Sci Rep* 5, 18271.
- Dantzer, F., de La Rubia, G., Menissier-De Murcia, J., Hostomsky, Z., de Murcia, G., Schreiber, V., 2000. Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* 39, 7559-7569.
- Das, B.B., Huang, S.Y., Murai, J., Rehman, I., Ame, J.C., Sengupta, S., . . . Pommier, Y., 2014. PARP1-TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage. *Nucleic acids research* 42, 4435-4449.
- David, K.K., Sasaki, M., Yu, S.W., Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2006. EndoG is dispensable in embryogenesis and apoptosis. *Cell death and differentiation* 13, 1147-1155.
- Davis, A.J., Chen, D.J., 2013. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Translational cancer research* 2, 130-143.
- Dawicki-McKenna, J.M., Langelier, M.F., DeNizio, J.E., Riccio, A.A., Cao, C.D., Karch, K.R., . . . Pascal, J.M., 2015. PARP-1 Activation Requires Local Unfolding of an Autoinhibitory Domain. *Molecular cell* 60, 755-768.
- de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Ittel, M.E., Mandel, P., Delain, E., 1983. Poly(ADP-ribose) polymerase auto-modification and interaction with DNA: electron microscopic visualization. *The EMBO journal* 2, 543-548.

- de Murcia, J.M., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., . . . de Murcia, G., 1997. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7303-7307.
- De Vos, M., Schreiber, V., Dantzer, F., 2012. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem Pharmacol* 84, 137-146.
- Dhuriya, Y.K., Sharma, D., 2018. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of neuroinflammation* 15, 199.
- Diani-Moore, S., Shoots, J., Singh, R., Zuk, J.B., Rifkind, A.B., 2017. NAD(+) loss, a new player in AhR biology: prevention of thymus atrophy and hepatosteatosis by NAD(+) repletion. *Sci Rep* 7, 2268.
- Diefenbach, J., Burkle, A., 2005. Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62, 721-730.
- Driessens, N., Versteijhe, S., Ghaddhab, C., Burniat, A., De Deken, X., Van Sande, J., . . . Corvilain, B., 2009. Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. *Endocrine-related cancer* 16, 845-856.
- Durkacz, B.W., Omidiji, O., Gray, D.A., Shall, S., 1980. (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair. *Nature* 283, 593-596.
- Earle, E., Saxena, A., MacDonald, A., Hudson, D.F., Shaffer, L.G., Saffery, R., . . . Choo, K.H., 2000. Poly(ADP-ribose) polymerase at active centromeres and neocentromeres at metaphase. *Human molecular genetics* 9, 187-194.
- Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., . . . Shaw, R.J., 2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456-461.
- El-Khamisy, S.F., Masutani, M., Suzuki, H., Caldecott, K.W., 2003. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic acids research* 31, 5526-5533.
- Elchuri, S., Oberley, T.D., Qi, W., Eisenstein, R.S., Jackson Roberts, L., Van Remmen, H., . . . Huang, T.T., 2005. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 24, 367-380.
- Elkholi, R., Chipuk, J.E., 2014. How do I kill thee? Let me count the ways: p53 regulates PARP-1 dependent necrosis. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 36, 46-51.
- Ethier, C., Tardif, M., Arul, L., Poirier, G.G., 2012. PARP-1 modulation of mTOR signaling in response to a DNA alkylating agent. *PLoS one* 7, e47978.
- Falck, J., Coates, J., Jackson, S.P., 2005. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434, 605-611.
- Falk, M., Lukasova, E., Kozubek, S., 2010. Higher-order chromatin structure in DSB induction, repair and misrepair. *Mutation research* 704, 88-100.

Referencias

- Falk, M., Lukasova, E., Stefancikova, L., Baranova, E., Falkova, I., Jezkova, L., . . . Kozubek, S., 2014. Heterochromatinization associated with cell differentiation as a model to study DNA double strand break induction and repair in the context of higher-order chromatin structure. *Applied radiation and isotopes : including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine* 83 Pt B, 177-185.
- Fan, J., Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2017. Cell Death Mechanisms of Neurodegeneration. *Advances in neurobiology* 15, 403-425.
- Fan, X., Hussien, R., Brooks, G.A., 2010. H₂O₂-induced mitochondrial fragmentation in C2C12 myocytes. *Free radical biology & medicine* 49, 1646-1654.
- Fatokun, A.A., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2014. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *British journal of pharmacology* 171, 2000-2016.
- Ferrer-Martin, R.M., Martin-Oliva, D., Sierra, A., Carrasco, M.C., Martin-Estebane, M., Calvente, R., . . . Cuadros, M.A., 2014. Microglial cells in organotypic cultures of developing and adult mouse retina and their relationship with cell death. *Experimental eye research* 121, 42-57.
- Floyd, R.A., West, M.S., Eneff, K.L., Hogsett, W.E., Tingey, D.T., 1988. Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA. *Arch Biochem Biophys* 262, 266-272.
- Folch, J., Junyent, F., Verdaguer, E., Auladell, C., Pizarro, J.G., Beas-Zarate, C., . . . Camins, A., 2012. Role of cell cycle re-entry in neurons: a common apoptotic mechanism of neuronal cell death. *Neurotoxicity research* 22, 195-207.
- Fonseca, B.D., Lahr, R.M., Damgaard, C.K., Alain, T., Berman, A.J., 2018. LARP1 on TOP of ribosome production. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, e1480.
- Fontana, P., Bonfiglio, J.J., Palazzo, L., Bartlett, E., Matic, I., Ahel, I., 2017. Serine ADP-ribosylation reversal by the hydrolase ARH3. *eLife* 6.
- Fortini, P., Ferretti, C., Dogliotti, E., 2013. The response to DNA damage during differentiation: pathways and consequences. *Mutation research* 743-744, 160-168.
- Fouquerel, E., Goellner, E.M., Yu, Z., Gagne, J.P., Barbi de Moura, M., Feinstein, T., . . . Sobol, R.W., 2014. ARTD1/PARP1 negatively regulates glycolysis by inhibiting hexokinase 1 independent of NAD⁺ depletion. *Cell reports* 8, 1819-1831.
- Frade, J.M., Ovejero-Benito, M.C., 2015. Neuronal cell cycle: the neuron itself and its circumstances. *Cell cycle* 14, 712-720.
- Gagne, J.P., Isabelle, M., Lo, K.S., Bourassa, S., Hendzel, M.J., Dawson, V.L., . . . Poirier, G.G., 2008. Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. *Nucleic acids research* 36, 6959-6976.
- Galloway, C.A., Yoon, Y., 2012. Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: what comes first, misshape or dysfunction? The view from metabolic excess. *The Journal of general physiology* 139, 455-463.

- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., . . . Kroemer, G., 2015. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell death and differentiation* 22, 58-73.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Krautwald, S., Kroemer, G., Linkermann, A., 2014. Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Seminars in cell & developmental biology* 35, 24-32.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., . . . Kroemer, G., 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation* 25, 486-541.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., . . . Kroemer, G., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation* 19, 107-120.
- Ganley, I.G., Lam du, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., Jiang, X., 2009. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *The Journal of biological chemistry* 284, 12297-12305.
- Garcia, D., Shaw, R.J., 2017. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Molecular cell* 66, 789-800.
- Gariani, K., Ryu, D., Menzies, K.J., Yi, H.S., Stein, S., Zhang, H., . . . Auwerx, J., 2017. Inhibiting poly ADP-ribosylation increases fatty acid oxidation and protects against fatty liver disease. *J Hepatol* 66, 132-141.
- Gatei, M., Zhou, B.B., Hobson, K., Scott, S., Young, D., Khanna, K.K., 2001. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM and Rad3 related kinase mediate phosphorylation of Brca1 at distinct and overlapping sites. In vivo assessment using phospho-specific antibodies. *The Journal of biological chemistry* 276, 17276-17280.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A., 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology* 119, 493-501.
- Gell, D., Jackson, S.P., 1999. Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucleic acids research* 27, 3494-3502.
- Gibbs-Seymour, I., Fontana, P., Rack, J.G.M., Ahel, I., 2016. HPF1/C4orf27 Is a PARP-1-Interacting Protein that Regulates PARP-1 ADP-Ribosylation Activity. *Molecular cell* 62, 432-442.
- Gibson, B.A., Kraus, W.L., 2012. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13, 411-424.
- Gillet, L.C., Scharer, O.D., 2006. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chemical reviews* 106, 253-276.
- Gillies, L.A., Kuwana, T., 2014. Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane. *Journal of cellular biochemistry* 115, 632-640.
- Giralt, A., Villarroya, F., 2012. SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging. *Biochem J* 444, 1-10.

Referencias

- Goodarzi, A.A., Lees-Miller, S.P., 2004. Biochemical characterization of the ataxia-telangiectasia mutated (ATM) protein from human cells. *DNA repair* 3, 753-767.
- Goodwin, P.M., Lewis, P.J., Davies, M.I., Skidmore, C.J., Shall, S., 1978. The effect of gamma radiation and neocarzinostatin on NAD and ATP levels in mouse leukaemia cells. *Biochimica et biophysica acta* 543, 576-582.
- Gowans, G.J., Hawley, S.A., Ross, F.A., Hardie, D.G., 2013. AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell metabolism* 18, 556-566.
- Griffin, R.J., Pemberton, L.C., Rhodes, D., Bleasdale, C., Bowman, K., Calvert, A.H., . . . Golding, B.T., 1995. Novel potent inhibitors of the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose)polymerase (PARP). *Anti-cancer drug design* 10, 507-514.
- Griffiths, W.J., Jonsson, A.P., Liu, S., Rai, D.K., Wang, Y., 2001. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem J* 355, 545-561.
- Grune, T., Schröder, P., Biesalski, H.K., 2004. Low molecular weight antioxidants, En: T., G. (Ed.), *Reaction, Processes. The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 77-90.
- Guerrero-Santoro, J., Kapetanaki, M.G., Hsieh, C.L., Gorbachinsky, I., Levine, A.S., Raptic-Otrin, V., 2008. The cullin 4B-based UV-damaged DNA-binding protein ligase binds to UV-damaged chromatin and ubiquitinates histone H2A. *Cancer research* 68, 5014-5022.
- Guo, C., Sun, L., Chen, X., Zhang, D., 2013. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural regeneration research* 8, 2003-2014.
- Guo, H.L., Zhang, C., Liu, Q., Li, Q., Lian, G., Wu, D., . . . Lin, S.C., 2012. The Axin/TNKS complex interacts with KIF3A and is required for insulin-stimulated GLUT4 translocation. *Cell research* 22, 1246-1257.
- Guo, Z., Kozlov, S., Lavin, M.F., Person, M.D., Paull, T.T., 2010. ATM activation by oxidative stress. *Science* 330, 517-521.
- Gutierrez-Ruiz, M.C., Bucio, L., Souza, V., Gomez, J.J., Campos, C., Carabez, A., 1994. Expression of some hepatocyte-like functional properties of WRL-68 cells in culture. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 30A, 366-371.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., . . . Shaw, R.J., 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell* 30, 214-226.
- Ha, H.C., Hester, L.D., Snyder, S.H., 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3270-3275.
- Ha, H.C., Snyder, S.H., 1999. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13978-13982.
- Haince, J.F., Kozlov, S., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Hendzel, M.J., Lavin, M.F., Poirier, G.G., 2007. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by

- a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. *The Journal of biological chemistry* 282, 16441-16453.
- Hakme, A., Huber, A., Dolle, P., Schreiber, V., 2008a. The macroPARP genes Parp-9 and Parp-14 are developmentally and differentially regulated in mouse tissues. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237, 209-215.
- Hakme, A., Wong, H.K., Dantzer, F., Schreiber, V., 2008b. The expanding field of poly(ADP-ribosylation) reactions. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO reports* 9, 1094-1100.
- Hamilton, M.L., Van Remmen, H., Drake, J.A., Yang, H., Guo, Z.M., Kewitt, K., . . . Richardson, A., 2001. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10469-10474.
- Hanawalt, P.C., Spivak, G., 2008. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 958-970.
- Hangen, E., Feraud, O., Lachkar, S., Mou, H., Doti, N., Fimia, G.M., . . . Modjtahedi, N., 2015. Interaction between AIF and CHCHD4 Regulates Respiratory Chain Biogenesis. *Molecular cell* 58, 1001-1014.
- Hardie, D.G., Scott, J.W., Pan, D.A., Hudson, E.R., 2003. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS letters* 546, 113-120.
- Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* 11, 298-300.
- Harper, J.W., Elledge, S.J., 2007. The DNA damage response: ten years after. *Molecular cell* 28, 739-745.
- Hassa, P.O., Covic, M., Hasan, S., Imhof, R., Hottiger, M.O., 2001. The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *The Journal of biological chemistry* 276, 45588-45597.
- Hassa, P.O., Hottiger, M.O., 2002. The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59, 1534-1553.
- Hassa, P.O., Hottiger, M.O., 2008. The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, 3046-3082.
- Hay, N., Sonenberg, N., 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development* 18, 1926-1945.
- Hayashi, K., Tanaka, M., Shimada, T., Miwa, M., Sugimura, T., 1983. Size and shape of poly(ADP-ribose): examination by gel filtration, gel electrophoresis and electron microscopy. *Biochemical and biophysical research communications* 112, 102-107.
- Hegedus, C., Virag, L., 2014. Inputs and outputs of poly(ADP-ribosylation): Relevance to oxidative stress. *Redox biology* 2, 978-982.

Referencias

- Herrup, K., Neve, R., Ackerman, S.L., Copani, A., 2004. Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 9232-9239.
- Hinoi, E., Takarada, T., Tsuchihashi, Y., Fujimori, S., Moriguchi, N., Wang, L., . . . Yoneda, Y., 2006. A molecular mechanism of pyruvate protection against cytotoxicity of reactive oxygen species in osteoblasts. *Molecular pharmacology* 70, 925-935.
- Hoch, N.C., Hanzlikova, H., Rulten, S.L., Tetreault, M., Komulainen, E., Ju, L., . . . Caldecott, K.W., 2017. XRCC1 mutation is associated with PARP1 hyperactivation and cerebellar ataxia. *Nature* 541, 87-91.
- Hoeijmakers, J.H., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374.
- Hoffpauir, B.K., Marrs, G.S., Mathers, P.H., Spirou, G.A., 2009. Does the brain connect before the periphery can direct? A comparison of three sensory systems in mice. *Brain research* 1277, 115-129.
- Hornbeck, P.V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J.M., Latham, V., Skrzypek, E., 2015. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic acids research* 43, D512-520.
- Hottiger, M.O., Hassa, P.O., Luscher, B., Schuler, H., Koch-Nolte, F., 2010. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci* 35, 208-219.
- Hsiao, S.J., Smith, S., 2008. Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. *Biochimie* 90, 83-92.
- Hu, Y., Petit, S.A., Ficarro, S.B., Toomire, K.J., Xie, A., Lim, E., . . . Livingston, D.M., 2014. PARP1-driven poly-ADP-ribosylation regulates BRCA1 function in homologous recombination-mediated DNA repair. *Cancer discovery* 4, 1430-1447.
- Hu, Y., Scully, R., Sobhian, B., Xie, A., Shestakova, E., Livingston, D.M., 2011. RAP80-directed tuning of BRCA1 homologous recombination function at ionizing radiation-induced nuclear foci. *Genes & development* 25, 685-700.
- Huang da, W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* 4, 44-57.
- Huang, K., Du, M., Tan, X., Yang, L., Li, X., Jiang, Y., . . . Huang, K., 2017. PARP1-mediated PPARalpha poly(ADP-ribosyl)ation suppresses fatty acid oxidation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 66, 962-977.
- Huang, S.H., Xiong, M., Chen, X.P., Xiao, Z.Y., Zhao, Y.F., Huang, Z.Y., 2008. PJ34, an inhibitor of PARP-1, suppresses cell growth and enhances the suppressive effects of cisplatin in liver cancer cells. *Oncology reports* 20, 567-572.
- Iloki-Assanga, S.B., Lewis-Lujan, L.M., Fernandez-Angulo, D., Gil-Salido, A.A., Lara-Espinoza, C.L., Rubio-Pino, J.L., 2015. Retino-protective effect of Bucida buceras against oxidative stress induced by H₂O₂ in human retinal pigment epithelial cells line. *BMC complementary and alternative medicine* 15, 254.
- Inoki, K., Zhu, T., Guan, K.L., 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115, 577-590.

- Irvine, R.A., Adachi, N., Shibata, D.K., Cassell, G.D., Yu, K., Karanjawala, Z.E., . . . Lieber, M.R., 2005. Generation and characterization of endonuclease G null mice. *Molecular and cellular biology* 25, 294-302.
- Ishii, N., 2000. Oxidative stress and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free radical research* 33, 857-864.
- Itakura, E., Mizushima, N., 2010. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* 6, 764-776.
- Ivana Scovassi, A., Diederich, M., 2004. Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells. *Biochem Pharmacol* 68, 1041-1047.
- Jackson, S.P., 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23, 687-696.
- Jagtap, P., Soriano, F.G., Virag, L., Liaudet, L., Mabley, J., Szabo, E., . . . Szabo, C., 2002. Novel phenanthridinone inhibitors of poly (adenosine 5'-diphosphate-ribose) synthetase: potent cytoprotective and antishock agents. *Critical care medicine* 30, 1071-1082.
- Jagtap, P., Szabo, C., 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nature reviews. Drug discovery* 4, 421-440.
- Jankevicius, G., Hassler, M., Golia, B., Rybin, V., Zacharias, M., Timinszky, G., Ladurner, A.G., 2013. A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-ribosylation. *Nature structural & molecular biology* 20, 508-514.
- Jendrach, M., Mai, S., Pohl, S., Voth, M., Bereiter-Hahn, J., 2008. Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion* 8, 293-304.
- Jette, N., Lees-Miller, S.P., 2015. The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. *Progress in biophysics and molecular biology* 117, 194-205.
- Jiao, K., Sahaboglu, A., Zrenner, E., Ueffing, M., Ekstrom, P.A., Paquet-Durand, F., 2016. Efficacy of PARP inhibition in Pde6a mutant mouse models for retinitis pigmentosa depends on the quality and composition of individual human mutations. *Cell death discovery* 2, 16040.
- Jubin, T., Kadam, A., Jariwala, M., Bhatt, S., Sutariya, S., Gani, A.R., . . . Begum, R., 2016. The PARP family: insights into functional aspects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cell growth and survival. *Cell proliferation* 49, 421-437.
- Julien, O., Wells, J.A., 2017. Caspases and their substrates. *Cell death and differentiation* 24, 1380-1389.
- Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.H., Kim, Y.M., Otto, N.M., Cao, J., . . . Kim, D.H., 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 20, 1992-2003.
- Juszczynski, P., Kutok, J.L., Li, C., Mitra, J., Aguiar, R.C., Shipp, M.A., 2006. BAL1 and BBAP are regulated by a gamma interferon-responsive bidirectional promoter and are overexpressed in diffuse large B-cell lymphomas with a prominent inflammatory infiltrate. *Molecular and cellular biology* 26, 5348-5359.

Referencias

- Jwa, M., Chang, P., 2012. PARP16 is a tail-anchored endoplasmic reticulum protein required for the PERK- and IRE1 α -mediated unfolded protein response. *Nature cell biology* 14, 1223-1230.
- Kaiser, W.J., Sridharan, H., Huang, C., Mandal, P., Upton, J.W., Gough, P.J., . . . Mocarski, E.S., 2013. Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *The Journal of biological chemistry* 288, 31268-31279.
- Kalyanaraman, B., 2013. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox biology* 1, 244-257.
- Kanai, M., Hanashiro, K., Kim, S.H., Hanai, S., Boulares, A.H., Miwa, M., Fukasawa, K., 2007. Inhibition of Crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribose)ylation. *Nature cell biology* 9, 1175-1183.
- Kanai, M., Tong, W.M., Sugihara, E., Wang, Z.Q., Fukasawa, K., Miwa, M., 2003. Involvement of poly(ADP-Ribose) polymerase 1 and poly(ADP-Ribosyl)ation in regulation of centrosome function. *Molecular and cellular biology* 23, 2451-2462.
- Kanwar, M., Chan, P.S., Kern, T.S., Kowluru, R.A., 2007. Oxidative damage in the retinal mitochondria of diabetic mice: possible protection by superoxide dismutase. *Investigative ophthalmology & visual science* 48, 3805-3811.
- Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E., Poirier, G.G., 1993. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer research* 53, 3976-3985.
- Kauppinen, T.M., Swanson, R.A., 2007. The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease. *Neuroscience* 145, 1267-1272.
- Kemp, B.E., Stapleton, D., Campbell, D.J., Chen, Z.P., Murthy, S., Walter, M., . . . Witters, L.A., 2003. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochemical Society transactions* 31, 162-168.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Khandhadia, S., Lotery, A., 2010. Oxidation and age-related macular degeneration: insights from molecular biology. *Expert reviews in molecular medicine* 12, e34.
- Kim, H., Chen, J., Yu, X., 2007. Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response. *Science* 316, 1202-1205.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., Guan, K.L., 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* 13, 132-141.
- Kim, M.K., Dudognon, C., Smith, S., 2012. Tankyrase 1 regulates centrosome function by controlling CPAP stability. *EMBO reports* 13, 724-732.
- Kim, M.K., Smith, S., 2014. Persistent telomere cohesion triggers a prolonged anaphase. *Mol Biol Cell* 25, 30-40.
- Kim, M.Y., Zhang, T., Kraus, W.L., 2005. Poly(ADP-ribose)ylation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes & development* 19, 1951-1967.

- Kim, S.T., Lim, D.S., Canman, C.E., Kastan, M.B., 1999. Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *The Journal of biological chemistry* 274, 37538-37543.
- Kladna, A., Marchlewicz, M., Piechowska, T., Kruk, I., Aboul-Enein, H.Y., 2015. Reactivity of pyruvic acid and its derivatives towards reactive oxygen species. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence* 30, 1153-1158.
- Klionsky, D.J., 2005. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *Journal of cell science* 118, 7-18.
- Komeima, K., Rogers, B.S., Lu, L., Campochiaro, P.A., 2006. Antioxidants reduce cone cell death in a model of retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 11300-11305.
- Kowluru, R.A., Atasi, L., Ho, Y.S., 2006a. Role of mitochondrial superoxide dismutase in the development of diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 47, 1594-1599.
- Kowluru, R.A., Koppolu, P., Chakrabarti, S., Chen, S., 2003. Diabetes-induced activation of nuclear transcriptional factor in the retina, and its inhibition by antioxidants. *Free radical research* 37, 1169-1180.
- Kowluru, R.A., Kowluru, V., Xiong, Y., Ho, Y.S., 2006b. Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 41, 1191-1196.
- Kraus, W.L., Lis, J.T., 2003. PARP goes transcription. *Cell* 113, 677-683.
- Krishnakumar, R., Kraus, W.L., 2010. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Molecular cell* 39, 8-24.
- Kroemer, G., Reed, J.C., 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nature medicine* 6, 513-519.
- Kunchithapautham, K., Rohrer, B., 2007. Apoptosis and autophagy in photoreceptors exposed to oxidative stress. *Autophagy* 3, 433-441.
- Kurosaki, T., Ushiro, H., Mitsuuchi, Y., Suzuki, S., Matsuda, M., Matsuda, Y., . . . Shizuta, Y., 1987. Primary structure of human poly(ADP-ribose) synthetase as deduced from cDNA sequence. *The Journal of biological chemistry* 262, 15990-15997.
- Kwon, J., Lee, S.R., Yang, K.S., Ahn, Y., Kim, Y.J., Stadtman, E.R., Rhee, S.G., 2004. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 16419-16424.
- Langelier, M.F., Pascal, J.M., 2013. PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis. *Current opinion in structural biology* 23, 134-143.
- Langelier, M.F., Planck, J.L., Roy, S., Pascal, J.M., 2011. Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity. *The Journal of biological chemistry* 286, 10690-10701.

Referencias

- Langelier, M.F., Planck, J.L., Roy, S., Pascal, J.M., 2012. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribose)ylation by human PARP-1. *Science* 336, 728-732.
- Langelier, M.F., Ruhl, D.D., Planck, J.L., Kraus, W.L., Pascal, J.M., 2010. The Zn³ domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction. *The Journal of biological chemistry* 285, 18877-18887.
- Langelier, M.F., Servent, K.M., Rogers, E.E., Pascal, J.M., 2008. A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *The Journal of biological chemistry* 283, 4105-4114.
- Laster, S.M., Wood, J.G., Gooding, L.R., 1988. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol* 141, 2629-2634.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C., 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347.
- Levine, B., Klionsky, D.J., 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell* 6, 463-477.
- Li, C.J., Sun, L.Y., Pang, C.Y., 2015a. Synergistic protection of N-acetylcysteine and ascorbic acid 2-phosphate on human mesenchymal stem cells against mitoptosis, necroptosis and apoptosis. *Sci Rep* 5, 9819.
- Li, G.Y., Osborne, N.N., 2008. Oxidative-induced apoptosis to an immortalized ganglion cell line is caspase independent but involves the activation of poly(ADP-ribose)polymerase and apoptosis-inducing factor. *Brain research* 1188, 35-43.
- Li, J., Yuan, J., 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27, 6194-6206.
- Li, N., Chen, J., 2014. ADP-ribosylation: activation, recognition, and removal. *Molecules and cells* 37, 9-16.
- Li, N., Zhang, Y., Han, X., Liang, K., Wang, J., Feng, L., . . . Chen, J., 2015b. Poly-ADP ribosylation of PTEN by tankyrases promotes PTEN degradation and tumor growth. *Genes & development* 29, 157-170.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X., 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Li, S., Tan, H.Y., Wang, N., Zhang, Z.J., Lao, L., Wong, C.W., Feng, Y., 2015c. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International journal of molecular sciences* 16, 26087-26124.
- Li, X., Klaus, J.A., Zhang, J., Xu, Z., Kibler, K.K., Andrabi, S.A., . . . Koehler, R.C., 2010. Contributions of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and -2 to nuclear translocation of apoptosis-inducing factor and injury from focal cerebral ischemia. *Journal of neurochemistry* 113, 1012-1022.
- Li, Z., Li, Y., Tang, M., Peng, B., Lu, X., Yang, Q., . . . Zhu, W.G., 2018. Destabilization of linker histone H1.2 is essential for ATM activation and DNA damage repair. *Cell research* 28, 756-770.

- Liles, M.R., Newsome, D.A., Oliver, P.D., 1991. Antioxidant enzymes in the aging human retinal pigment epithelium. *Archives of ophthalmology* 109, 1285-1288.
- Lin, W., Ame, J.C., Aboul-Ela, N., Jacobson, E.L., Jacobson, M.K., 1997. Isolation and characterization of the cDNA encoding bovine poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *The Journal of biological chemistry* 272, 11895-11901.
- Lin, Y., Tang, X., Zhu, Y., Shu, T., Han, X., 2011. Identification of PARP-1 as one of the transcription factors binding to the repressor element in the promoter region of COX-2. *Arch Biochem Biophys* 505, 123-129.
- Lindahl, T., Satoh, M.S., Poirier, G.G., Klungland, A., 1995. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci* 20, 405-411.
- Lohr, H.R., Kuntchithapautham, K., Sharma, A.K., Rohrer, B., 2006. Multiple, parallel cellular suicide mechanisms participate in photoreceptor cell death. *Experimental eye research* 83, 380-389.
- Lubrano, V., Balzan, S., 2015. Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. *World journal of experimental medicine* 5, 218-224.
- Luijsterburg, M.S., de Krijger, I., Wiegant, W.W., Shah, R.G., Smeenk, G., de Groot, A.J.L., . . . van Attikum, H., 2016. PARP1 Links CHD2-Mediated Chromatin Expansion and H3.3 Deposition to DNA Repair by Non-homologous End-Joining. *Molecular cell* 61, 547-562.
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions* 224, 164-175.
- Ma, Z., Zhang, Y., Li, Q., Xu, M., Bai, J., Wu, S., 2017. Resveratrol improves alcoholic fatty liver disease by downregulating HIF-1alpha expression and mitochondrial ROS production. *PloS one* 12, e0183426.
- MacPherson, L., Tamblin, L., Rajendra, S., Bralha, F., McPherson, J.P., Matthews, J., 2013. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin poly(ADP-ribose) polymerase (TiPARP, ARTD14) is a mono-ADP-ribosyltransferase and repressor of aryl hydrocarbon receptor transactivation. *Nucleic acids research* 41, 1604-1621.
- Madan, K., Bhardwaj, P., Thareja, S., Gupta, S.D., Saraya, A., 2006. Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Journal of clinical gastroenterology* 40, 930-935.
- Mah, L.J., El-Osta, A., Karagiannis, T.C., 2010. gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24, 679-686.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., Lukas, J., 2007. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* 131, 887-900.
- Mailloux, R.J., Harper, M.E., 2012. Mitochondrial proticity and ROS signaling: lessons from the uncoupling proteins. *Trends Endocrinol Metab* 23, 451-458.
- Mandir, A.S., Poitras, M.F., Berliner, A.R., Herring, W.J., Guastella, D.B., Feldman, A., . . . Dawson, V.L., 2000. NMDA but not non-NMDA excitotoxicity is mediated by

Referencias

- Poly(ADP-ribose) polymerase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 8005-8011.
- Marechal, A., Zou, L., 2013. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.
- Marin-Teva, J.L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., van Rooijen, N., Mallat, M., 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41, 535-547.
- Marintchev, A., Robertson, A., Dimitriadis, E.K., Prasad, R., Wilson, S.H., Mullen, G.P., 2000. Domain specific interaction in the XRCC1-DNA polymerase beta complex. *Nucleic acids research* 28, 2049-2059.
- Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., 2014. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 465-481.
- Martin-Guerrero, S.M., Leon, J., Quiles-Perez, R., Belmonte, L., Martin-Oliva, D., Ruiz-Extremera, A., . . . Munoz-Gamez, J.A., 2017a. Expression and Single Nucleotide Polymorphism of Poly (ADPRibose) Polymerase-1 in Gastrointestinal Tumours: Clinical Involvement. *Current medicinal chemistry* 24, 2156-2173.
- Martin-Guerrero, S.M., Munoz-Gamez, J.A., Carrasco, M.C., Salmeron, J., Martin-Estebane, M., Cuadros, M.A., . . . Martin-Oliva, D., 2017b. Poly(ADP-ribose)polymerases inhibitors prevent early mitochondrial fragmentation and hepatocyte cell death induced by H2O2. *PLoS one* 12, e0187130.
- Martin-Hernandez, K., Rodriguez-Vargas, J.M., Schreiber, V., Dantzer, F., 2017. Expanding functions of ADP-ribosylation in the maintenance of genome integrity. *Seminars in cell & developmental biology* 63, 92-101.
- Martin-Oliva, D., Ferrer-Martin, R.M., Santos, A.M., Carrasco, M.C., Sierra, A., Marin-Teva, J.L., . . . Cuadros, M.A., 2011. Simultaneous cell death and upregulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 expression in early postnatal mouse retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 52, 7445-7454.
- Martinez-Zamudio, R.I., Ha, H.C., 2014. PARP1 enhances inflammatory cytokine expression by alteration of promoter chromatin structure in microglia. *Brain and behavior* 4, 552-565.
- Massaad, C.A., Klann, E., 2011. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxidants & redox signaling* 14, 2013-2054.
- Masuda, T., Shimazawa, M., Hara, H., 2017. Retinal Diseases Associated with Oxidative Stress and the Effects of a Free Radical Scavenger (Edaravone). *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017, 9208489.
- Mateos-Gomez, P.A., Gong, F., Nair, N., Miller, K.M., Lazzerini-Denchi, E., Sfeir, A., 2015. Mammalian polymerase theta promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature* 518, 254-257.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., . . . Elledge, S.J., 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160-1166.

- McKinnon, P.J., 2013. Maintaining genome stability in the nervous system. *Nature neuroscience* 16, 1523-1529.
- Medzhitov, R., 2010. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140, 771-776.
- Mehrotra, P., Riley, J.P., Patel, R., Li, F., Voss, L., Goenka, S., 2011. PARP-14 functions as a transcriptional switch for Stat6-dependent gene activation. *The Journal of biological chemistry* 286, 1767-1776.
- Mehta, A., Haber, J.E., 2014. Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6, a016428.
- Meisse, D., Van de Castele, M., Beauloye, C., Hainault, I., Kefas, B.A., Rider, M.H., . . . Hue, L., 2002. Sustained activation of AMP-activated protein kinase induces c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis in liver cells. *FEBS letters* 526, 38-42.
- Meisterernst, M., Stelzer, G., Roeder, R.G., 1997. Poly(ADP-ribose) polymerase enhances activator-dependent transcription in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2261-2265.
- Meng, Y.Y., Wu, C.W., Yu, B., Li, H., Chen, M., Qi, G.X., 2018. PARP-1 Involvement in Autophagy and Their Roles in Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells under Oxidative Stress. *Folia biologica* 64, 103-111.
- Menisser-de Murcia, J., Mark, M., Wendling, O., Wynshaw-Boris, A., de Murcia, G., 2001. Early embryonic lethality in PARP-1 Atm double-mutant mice suggests a functional synergy in cell proliferation during development. *Molecular and cellular biology* 21, 1828-1832.
- Michels, J., Vitale, I., Senovilla, L., Enot, D.P., Garcia, P., Lissa, D., . . . Kroemer, G., 2013. Synergistic interaction between cisplatin and PARP inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cell cycle* 12, 877-883.
- Milam, K.M., Cleaver, J.E., 1984. Inhibitors of poly(adenosine diphosphate-ribose) synthesis: effect on other metabolic processes. *Science* 223, 589-591.
- Mitchell, J., Smith, G.C., Curtin, N.J., 2009. Poly(ADP-Ribose) polymerase-1 and DNA-dependent protein kinase have equivalent roles in double strand break repair following ionizing radiation. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 75, 1520-1527.
- Monaco, L., Kolthur-Seetharam, U., Loury, R., Murcia, J.M., de Murcia, G., Sassone-Corsi, P., 2005. Inhibition of Aurora-B kinase activity by poly(ADP-ribosylation) in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14244-14248.
- Morgan, M.A., Parsels, L.A., Maybaum, J., Lawrence, T.S., 2014. Improving the efficacy of chemoradiation with targeted agents. *Cancer discovery* 4, 280-291.
- Mu, J.J., Wang, Y., Luo, H., Leng, M., Zhang, J., Yang, T., . . . Qin, J., 2007. A proteomic analysis of ataxia telangiectasia-mutated (ATM)/ATM-Rad3-related (ATR) substrates identifies the ubiquitin-proteasome system as a regulator for DNA damage checkpoints. *The Journal of biological chemistry* 282, 17330-17334.

Referencias

- Mukhopadhyay, P., Horvath, B., Rajesh, M., Varga, Z.V., Gariani, K., Ryu, D., . . . Pacher, P., 2017. PARP inhibition protects against alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 66, 589-600.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Cao, Z., Horvath, B., Park, O., Wang, H., . . . Pacher, P., 2014. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 is a key mediator of liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 59, 1998-2009.
- Munoz-Gamez, J.A., Rodriguez-Vargas, J.M., Quiles-Perez, R., Aguilar-Quesada, R., Martin-Oliva, D., de Murcia, G., . . . Oliver, F.J., 2009. PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. *Autophagy* 5, 61-74.
- Muriel, P., 2009. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatology international* 3, 526-536.
- Nakajima, H., Nagaso, H., Kakui, N., Ishikawa, M., Hiranuma, T., Hoshiko, S., 2004. Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in nuclear factor-kappaB-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 42774-42786.
- Narayan, D.S., Wood, J.P., Chidlow, G., Casson, R.J., 2016. A review of the mechanisms of cone degeneration in retinitis pigmentosa. *Acta ophthalmologica* 94, 748-754.
- Nazio, F., Strappazon, F., Antonioli, M., Bielli, P., Cianfanelli, V., Bordi, M., . . . Cecconi, F., 2013. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nature cell biology* 15, 406-416.
- Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Chedotal, A., 2014. Development of retinal layers. *Comptes rendus biologies* 337, 153-159.
- Nishida, N., Arizumi, T., Takita, M., Kitai, S., Yada, N., Hagiwara, S., . . . Kudo, M., 2013. Reactive oxygen species induce epigenetic instability through the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in human hepatocarcinogenesis. *Digestive diseases* 31, 459-466.
- Nishimura, Y., Hara, H., Kondo, M., Hong, S., Matsugi, T., 2017. Oxidative Stress in Retinal Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017, 4076518.
- O'Driscoll, C., Doonan, F., Sanvicens, N., Messeguer, A., Cotter, T.G., 2011. A novel free radical scavenger rescues retinal cells in vivo. *Experimental eye research* 93, 65-74.
- O'Neal, T.B., Luther, E.E., 2019. Retinitis Pigmentosa, En: StatPearls (Ed.). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Obrosova, I.G., Julius, U.A., 2005. Role for poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic nephropathy, neuropathy and retinopathy. *Current vascular pharmacology* 3, 267-283.
- Olcina, M.M., Foskolou, I.P., Anbalagan, S., Senra, J.M., Pires, I.M., Jiang, Y., . . . Hammond, E.M., 2013. Replication stress and chromatin context link ATM activation to a role in DNA replication. *Molecular cell* 52, 758-766.
- Oliver, F.J., Menissier-de Murcia, J., Nacci, C., Decker, P., Andriantsitohaina, R., Muller, S., . . . de Murcia, G., 1999. Resistance to endotoxic shock as a consequence of

- defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *The EMBO journal* 18, 4446-4454.
- Orr, W.C., Sohal, R.S., 1994. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263, 1128-1130.
- Osna, N.A., Donohue, T.M., Jr., Kharbanda, K.K., 2017. Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and Current Management. *Alcohol research : current reviews* 38, 147-161.
- Pachkowski, B.F., Tano, K., Afonin, V., Elder, R.H., Takeda, S., Watanabe, M., . . . Nakamura, J., 2009. Cells deficient in PARP-1 show an accelerated accumulation of DNA single strand breaks, but not AP sites, over the PARP-1-proficient cells exposed to MMS. *Mutation research* 671, 93-99.
- Palazzo, L., Daniels, C.M., Nettleship, J.E., Rahman, N., McPherson, R.L., Ong, S.E., . . . Ahel, I., 2016. ENPP1 processes protein ADP-ribosylation in vitro. *The FEBS journal* 283, 3371-3388.
- Palazzo, L., Thomas, B., Jemth, A.S., Colby, T., Leidecker, O., Feijs, K.L., . . . Ahel, I., 2015. Processing of protein ADP-ribosylation by Nudix hydrolases. *Biochem J* 468, 293-301.
- Paquet-Durand, F., Silva, J., Talukdar, T., Johnson, L.E., Azadi, S., van Veen, T., . . . Ekstrom, P.A., 2007. Excessive activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to inherited photoreceptor degeneration in the retinal degeneration 1 mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 10311-10319.
- Pascal, J.M., Ellenberger, T., 2015. The rise and fall of poly(ADP-ribose): An enzymatic perspective. *DNA repair* 32, 10-16.
- Paulsen, R.D., Soni, D.V., Wollman, R., Hahn, A.T., Yee, M.C., Guan, A., . . . Cimprich, K.A., 2009. A genome-wide siRNA screen reveals diverse cellular processes and pathways that mediate genome stability. *Molecular cell* 35, 228-239.
- Paull, T.T., 2015. Mechanisms of ATM Activation. *Annual review of biochemistry* 84, 711-738.
- Payne, A.J., Kaja, S., Naumchuk, Y., Kunjukunju, N., Koulen, P., 2014. Antioxidant drug therapy approaches for neuroprotection in chronic diseases of the retina. *International journal of molecular sciences* 15, 1865-1886.
- Pearl, L.H., Schierz, A.C., Ward, S.E., Al-Lazikani, B., Pearl, F.M., 2015. Therapeutic opportunities within the DNA damage response. *Nature reviews. Cancer* 15, 166-180.
- Pellegrini, M., Celeste, A., Difilippantonio, S., Guo, R., Wang, W., Feigenbaum, L., Nussenzweig, A., 2006. Autophosphorylation at serine 1987 is dispensable for murine Atm activation in vivo. *Nature* 443, 222-225.
- Peng, J.Y., Lin, C.C., Chen, Y.J., Kao, L.S., Liu, Y.C., Chou, C.C., . . . Hsu, C.N., 2011. Automatic morphological subtyping reveals new roles of caspases in mitochondrial dynamics. *PLoS computational biology* 7, e1002212.

Referencias

- Perez-Carreras, M., Del Hoyo, P., Martin, M.A., Rubio, J.C., Martin, A., Castellano, G., . . . Solis-Herruzo, J.A., 2003. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 38, 999-1007.
- Perez, V.I., Bokov, A., Van Remmen, H., Mele, J., Ran, Q., Ikeno, Y., Richardson, A., 2009. Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochimica et biophysica acta* 1790, 1005-1014.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell, J.S., 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567.
- Piao, L., Fujioka, K., Nakakido, M., Hamamoto, R., 2018. Regulation of poly(ADP-Ribose) polymerase 1 functions by post-translational modifications. *Frontiers in bioscience* 23, 13-26.
- Picard, M., Shirihai, O.S., Gentil, B.J., Burrelle, Y., 2013. Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling? *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 304, R393-406.
- Pilie, P.G., Gay, C.M., Byers, L.A., O'Connor, M.J., Yap, T.A., 2019. PARP Inhibitors: Extending Benefit Beyond BRCA-Mutant Cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 25, 3759-3771.
- Pillai, J.B., Isbatan, A., Imai, S., Gupta, M.P., 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cardiac myocyte cell death during heart failure is mediated by NAD⁺ depletion and reduced Sir2alpha deacetylase activity. *The Journal of biological chemistry* 280, 43121-43130.
- Pines, A., Vrouwe, M.G., Martejijn, J.A., Typas, D., Luijsterburg, M.S., Cansoy, M., . . . Mullenders, L., 2012. PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *The Journal of cell biology* 199, 235-249.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., . . . Bitto, A., 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017, 8416763.
- Podhorecka, M., Skladanowski, A., Bozko, P., 2010. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *Journal of nucleic acids* 2010.
- Poirier, G.G., de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Niedergang, C., Mandel, P., 1982. Poly(ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 3423-3427.
- Polo, L.M., Xu, Y., Hornyak, P., Garces, F., Zeng, Z., Hailstone, R., . . . Pearl, L.H., 2019. Efficient Single-Strand Break Repair Requires Binding to Both Poly(ADP-Ribose) and DNA by the Central BRCT Domain of XRCC1. *Cell reports* 26, 573-581 e575.
- Pommier, Y., 2006. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature reviews. Cancer* 6, 789-802.
- Pouliot, J.J., Yao, K.C., Robertson, C.A., Nash, H.A., 1999. Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes. *Science* 286, 552-555.

- Priebe, A., Tan, L., Wahl, H., Kueck, A., He, G., Kwok, R., . . . Liu, J.R., 2011. Glucose deprivation activates AMPK and induces cell death through modulation of Akt in ovarian cancer cells. *Gynecologic oncology* 122, 389-395.
- Purnell, M.R., Whish, W.J., 1980. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *Biochem J* 185, 775-777.
- Qin, X., Jiang, B., Zhang, Y., 2016. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell cycle* 15, 781-786.
- Rack, J.G., Perina, D., Ahel, I., 2016. Macrod domains: Structure, Function, Evolution, and Catalytic Activities. *Annual review of biochemistry* 85, 431-454.
- Racz, B., Hanto, K., Tapodi, A., Solti, I., Kalman, N., Jakus, P., . . . Sumegi, B., 2010. Regulation of MKP-1 expression and MAPK activation by PARP-1 in oxidative stress: a new mechanism for the cytoplasmic effect of PARP-1 activation. *Free radical biology & medicine* 49, 1978-1988.
- Raval-Fernandes, S., Kickhoefer, V.A., Kitchen, C., Rome, L.H., 2005. Increased susceptibility of vault poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice to carcinogen-induced tumorigenesis. *Cancer research* 65, 8846-8852.
- Reynolds, P., Cooper, S., Lomax, M., O'Neill, P., 2015. Disruption of PARP1 function inhibits base excision repair of a sub-set of DNA lesions. *Nucleic acids research* 43, 4028-4038.
- Riffell, J.L., Lord, C.J., Ashworth, A., 2012. Tankyrase-targeted therapeutics: expanding opportunities in the PARP family. *Nature reviews. Drug discovery* 11, 923-936.
- Rodgers, H.M., Belcastro, M., Sokolov, M., Mathers, P.H., 2016. Embryonic markers of cone differentiation. *Molecular vision* 22, 1455-1467.
- Rodriguez-Vargas, J.M., Ruiz-Magana, M.J., Ruiz-Ruiz, C., Majuelos-Melguizo, J., Peralta-Leal, A., Rodriguez, M.I., . . . Oliver, F.J., 2012. ROS-induced DNA damage and PARP-1 are required for optimal induction of starvation-induced autophagy. *Cell research* 22, 1181-1198.
- Rosenthal, F., Feijs, K.L., Frugier, E., Bonalli, M., Forst, A.H., Imhof, R., . . . Hottiger, M.O., 2013. Macrod domain-containing proteins are new mono-ADP-ribosylhydrolases. *Nature structural & molecular biology* 20, 502-507.
- Ruf, A., de Murcia, G., Schulz, G.E., 1998. Inhibitor and NAD⁺ binding to poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and homology modeling. *Biochemistry* 37, 3893-3900.
- Rulten, S.L., Fisher, A.E., Robert, I., Zuma, M.C., Rouleau, M., Ju, L., . . . Caldecott, K.W., 2011. PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining. *Molecular cell* 41, 33-45.
- Ruscetti, T., Lehnert, B.E., Halbrook, J., Le Trong, H., Hoekstra, M.F., Chen, D.J., Peterson, S.R., 1998. Stimulation of the DNA-dependent protein kinase by poly(ADP-ribose) polymerase. *The Journal of biological chemistry* 273, 14461-14467.

Referencias

- Russell, R.C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H.W., Chang, Y.Y., Kim, J., . . . Guan, K.L., 2013. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nature cell biology* 15, 741-750.
- Sahaboglu, A., Barth, M., Secer, E., Amo, E.M., Urtti, A., Arsenijevic, Y., . . . Paquet-Durand, F., 2016. Olaparib significantly delays photoreceptor loss in a model for hereditary retinal degeneration. *Sci Rep* 6, 39537.
- Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S., 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.
- Santos, A.M., Calvente, R., Tassi, M., Carrasco, M.C., Martin-Oliva, D., Marin-Teva, J.L., . . . Cuadros, M.A., 2008. Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *The Journal of comparative neurology* 506, 224-239.
- Sanvicens, N., Gomez-Vicente, V., Masip, I., Messeguer, A., Cotter, T.G., 2004. Oxidative stress-induced apoptosis in retinal photoreceptor cells is mediated by calpains and caspases and blocked by the oxygen radical scavenger CR-6. *The Journal of biological chemistry* 279, 39268-39278.
- Savic, V., Yin, B., Maas, N.L., Bredemeyer, A.L., Carpenter, A.C., Helmink, B.A., . . . Bassing, C.H., 2009. Formation of dynamic gamma-H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin. *Molecular cell* 34, 298-310.
- Sawada, M., Carlson, J.C., 1987. Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of the rat. *Mech Ageing Dev* 41, 125-137.
- Saxena, A., Saffery, R., Wong, L.H., Kalitsis, P., Choo, K.H., 2002a. Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosyl)ated. *The Journal of biological chemistry* 277, 26921-26926.
- Saxena, A., Wong, L.H., Kalitsis, P., Earle, E., Shaffer, L.G., Choo, K.H., 2002b. Poly(ADP-ribose) polymerase 2 localizes to mammalian active centromeres and interacts with PARP-1, Cenpa, Cenpb and Bub3, but not Cenpc. *Human molecular genetics* 11, 2319-2329.
- Sbodio, J.I., Lodish, H.F., Chi, N.W., 2002. Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1 (telomere-repeat-binding factor 1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase). *Biochem J* 361, 451-459.
- Schreiber, V., Ame, J.C., Dolle, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., . . . de Murcia, G., 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *The Journal of biological chemistry* 277, 23028-23036.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.C., de Murcia, G., 2006. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7, 517-528.
- Schriner, S.E., Linford, N.J., Martin, G.M., Treuting, P., Ogburn, C.E., Emond, M., . . . Rabinovitch, P.S., 2005. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308, 1909-1911.
- Schweichel, J.U., Merker, H.J., 1973. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253-266.

- Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T.R., Matsuda, F., Nagata, S., 2014. Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science* 344, 1164-1168.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., . . . Ideker, T., 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* 13, 2498-2504.
- Sharifi, R., Morra, R., Appel, C.D., Tallis, M., Chioza, B., Jankevicius, G., . . . Ahel, I., 2013. Deficiency of terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease. *The EMBO journal* 32, 1225-1237.
- Sharma, R.K., O'Leary, T.E., Fields, C.M., Johnson, D.A., 2003. Development of the outer retina in the mouse. *Brain research. Developmental brain research* 145, 93-105.
- She, C., Zhu, L.Q., Zhen, Y.F., Wang, X.D., Dong, Q.R., 2014. Activation of AMPK protects against hydrogen peroxide-induced osteoblast apoptosis through autophagy induction and NADPH maintenance: new implications for osteonecrosis treatment? *Cellular signalling* 26, 1-8.
- Shen, J., Yang, X., Dong, A., Petters, R.M., Peng, Y.W., Wong, F., Campochiaro, P.A., 2005. Oxidative damage is a potential cause of cone cell death in retinitis pigmentosa. *Journal of cellular physiology* 203, 457-464.
- Shen, Y., Aoyagi-Scharber, M., Wang, B., 2015. Trapping Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 353, 446-457.
- Shieh, W.M., Ame, J.C., Wilson, M.V., Wang, Z.Q., Koh, D.W., Jacobson, M.K., Jacobson, E.L., 1998. Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *The Journal of biological chemistry* 273, 30069-30072.
- Shiloh, Y., Ziv, Y., 2013. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14, 197-210.
- Shirai, H., Poetsch, A.R., Gunji, A., Maeda, D., Fujimori, H., Fujihara, H., . . . Masutani, M., 2013. PARG dysfunction enhances DNA double strand break formation in S-phase after alkylation DNA damage and augments different cell death pathways. *Cell death & disease* 4, e656.
- Sies, H., 1985. Oxidative stress: introductory remarks., En: Sies, H. (Ed.), *Oxidative Stress*. Academic Press; London, pp. 1-8.
- Singh, M.P., Chauhan, A.K., Kang, S.C., 2018. Morin hydrate ameliorates cisplatin-induced ER stress, inflammation and autophagy in HEK-293 cells and mice kidney via PARP-1 regulation. *International immunopharmacology* 56, 156-167.
- Singleton, B.K., Torres-Arzayus, M.I., Rottinghaus, S.T., Taccioli, G.E., Jeggo, P.A., 1999. The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Molecular and cellular biology* 19, 3267-3277.
- Skalitzky, D.J., Marakovits, J.T., Maegley, K.A., Ekker, A., Yu, X.H., Hostomsky, Z., . . . Golding, B.T., 2003. Tricyclic benzimidazoles as potent poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* 46, 210-213.
- Skidmore, C.J., Davies, M.I., Goodwin, P.M., Halldorsson, H., Lewis, P.J., Shall, S., Zia'ee, A.A., 1979. The involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in the degradation of

Referencias

- NAD caused by gamma-radiation and N-methyl-N-nitrosourea. *Eur J Biochem* 101, 135-142.
- Slade, D., Dunstan, M.S., Barkauskaite, E., Weston, R., Lafite, P., Dixon, N., . . . Ahel, I., 2011. The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Nature* 477, 616-620.
- Slattery, E., Dignam, J.D., Matsui, T., Roeder, R.G., 1983. Purification and analysis of a factor which suppresses nick-induced transcription by RNA polymerase II and its identity with poly(ADP-ribose) polymerase. *The Journal of biological chemistry* 258, 5955-5959.
- Smith, A.J., Ball, S.S., Bowater, R.P., Wormstone, I.M., 2016. PARP-1 inhibition influences the oxidative stress response of the human lens. *Redox biology* 8, 354-362.
- Smith, S., Giriati, I., Schmitt, A., de Lange, T., 1998. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282, 1484-1487.
- Sobhian, B., Shao, G., Lilli, D.R., Culhane, A.C., Moreau, L.A., Xia, B., . . . Greenberg, R.A., 2007. RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science* 316, 1198-1202.
- Sodhi, R.K., Singh, N., Jaggi, A.S., 2010. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications. *Vascular pharmacology* 53, 77-87.
- Soldani, C., Scovassi, A.I., 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 7, 321-328.
- Steffen, J.D., McCauley, M.M., Pascal, J.M., 2016. Fluorescent sensors of PARP-1 structural dynamics and allosteric regulation in response to DNA damage. *Nucleic acids research* 44, 9771-9783.
- Stein, L.R., Imai, S., 2012. The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends Endocrinol Metab* 23, 420-428.
- Stoppini, L., Buchs, P.A., Muller, D., 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of neuroscience methods* 37, 173-182.
- Strom, C.E., Johansson, F., Uhlen, M., Szgyarto, C.A., Erixon, K., Helleday, T., 2011. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate. *Nucleic acids research* 39, 3166-3175.
- Sukhanova, M.V., Abrakhi, S., Joshi, V., Pastre, D., Kutuzov, M.M., Anarbaev, R.O., . . . Lavrik, O.I., 2016. Single molecule detection of PARP1 and PARP2 interaction with DNA strand breaks and their poly(ADP-ribosyl)ation using high-resolution AFM imaging. *Nucleic acids research* 44, e60.
- Sunico, C.R., Portillo, F., Gonzalez-Forero, D., Moreno-Lopez, B., 2005. Nitric-oxide-directed synaptic remodeling in the adult mammal CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 1448-1458.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., . . . Kroemer, G., 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.

- Suto, M.J., Turner, W.R., Arundel-Suto, C.M., Werbel, L.M., Sebolt-Leopold, J.S., 1991. Dihydroisoquinolinones: the design and synthesis of a new series of potent inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Anti-cancer drug design* 6, 107-117.
- Swindall, A.F., Stanley, J.A., Yang, E.S., 2013. PARP-1: Friend or Foe of DNA Damage and Repair in Tumorigenesis? *Cancers* 5, 943-958.
- Tait, S.W., Green, D.R., 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11, 621-632.
- Tan, E., Ding, X.Q., Saadi, A., Agarwal, N., Naash, M.I., Al-Ubaidi, M.R., 2004. Expression of cone-photoreceptor-specific antigens in a cell line derived from retinal tumors in transgenic mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 45, 764-768.
- Tangutoori, S., Baldwin, P., Sridhar, S., 2015. PARP inhibitors: A new era of targeted therapy. *Maturitas* 81, 5-9.
- Tapodi, A., Debreceni, B., Hanto, K., Bogнар, Z., Wittmann, I., Gallyas, F., Jr., . . . Sumegi, B., 2005. Pivotal role of Akt activation in mitochondrial protection and cell survival by poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibition in oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 280, 35767-35775.
- Tartier, L., Spenlehauer, C., Newman, H.C., Folkard, M., Prise, K.M., Michael, B.D., . . . de Murcia, G., 2003. Local DNA damage by proton microbeam irradiation induces poly(ADP-ribose) synthesis in mammalian cells. *Mutagenesis* 18, 411-416.
- Teloni, F., Altmeyer, M., 2016. Readers of poly(ADP-ribose): designed to be fit for purpose. *Nucleic acids research* 44, 993-1006.
- Thingholm, T.E., Larsen, M.R., 2016. The Use of Titanium Dioxide for Selective Enrichment of Phosphorylated Peptides. *Methods in molecular biology* 1355, 135-146.
- Thomas, H.D., Calabrese, C.R., Batey, M.A., Canan, S., Hostomsky, Z., Kyle, S., . . . Curtin, N.J., 2007. Preclinical selection of a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor for clinical trial. *Molecular cancer therapeutics* 6, 945-956.
- Tian, N., 2011. Developmental mechanisms that regulate retinal ganglion cell dendritic morphology. *Developmental neurobiology* 71, 1297-1309.
- Tong, W.M., Yang, Y.G., Cao, W.H., Galendo, D., Frappart, L., Shen, Y., Wang, Z.Q., 2007. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 plays a role in suppressing mammary tumourigenesis in mice. *Oncogene* 26, 3857-3867.
- Toyama, E.Q., Herzig, S., Courchet, J., Lewis, T.L., Jr., Loson, O.C., Hellberg, K., . . . Shaw, R.J., 2016. Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science* 351, 275-281.
- Traven, A., Heierhorst, J., 2005. SQ/TQ cluster domains: concentrated ATM/ATR kinase phosphorylation site regions in DNA-damage-response proteins. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 27, 397-407.
- Treebak, J.T., Pehmoller, C., Kristensen, J.M., Kjobsted, R., Birk, J.B., Schjerling, P., . . . Wojtaszewski, J.F., 2014. Acute exercise and physiological insulin induce distinct phosphorylation signatures on TBC1D1 and TBC1D4 proteins in human skeletal muscle. *The Journal of physiology* 592, 351-375.

Referencias

- Trefts, E., Gannon, M., Wasserman, D.H., 2017. The liver. *Current biology* 27, R1147-R1151.
- Trucco, C., Oliver, F.J., de Murcia, G., Menissier-de Murcia, J., 1998. DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic acids research* 26, 2644-2649.
- Truong, L.N., Li, Y., Shi, L.Z., Hwang, P.Y., He, J., Wang, H., . . . Wu, X., 2013. Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 7720-7725.
- Tsatmali, M., Walcott, E.C., Crossin, K.L., 2005. Newborn neurons acquire high levels of reactive oxygen species and increased mitochondrial proteins upon differentiation from progenitors. *Brain research* 1040, 137-150.
- Tsatmali, M., Walcott, E.C., Makarenkova, H., Crossin, K.L., 2006. Reactive oxygen species modulate the differentiation of neurons in clonal cortical cultures. *Molecular and cellular neurosciences* 33, 345-357.
- Tulin, A., Spradling, A., 2003. Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* puff loci. *Science* 299, 560-562.
- Tuncel, H., Tanaka, S., Oka, S., Nakai, S., Fukutomi, R., Okamoto, M., . . . Shimamoto, F., 2012. PARP6, a mono(ADP-ribosyl) transferase and a negative regulator of cell proliferation, is involved in colorectal cancer development. *International journal of oncology* 41, 2079-2086.
- Turinetto, V., Giachino, C., 2015. Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic acids research* 43, 2489-2498.
- Upton, J.W., Kaiser, W.J., Mocarski, E.S., 2012. DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. *Cell host & microbe* 11, 290-297.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K., Loridas, S., 2013. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *International journal of environmental research and public health* 10, 3886-3907.
- Van Remmen, H., Ikeno, Y., Hamilton, M., Pahlavani, M., Wolf, N., Thorpe, S.R., . . . Richardson, A., 2003. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiological genomics* 16, 29-37.
- Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Van de Craen, M., Declercq, W., Fiers, W., Vandenabeele, P., 1998. Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *The Journal of experimental medicine* 188, 919-930.
- Vercammen, D., Vandenabeele, P., Beyaert, R., Declercq, W., Fiers, W., 1997. Tumour necrosis factor-induced necrosis versus anti-Fas-induced apoptosis in L929 cells. *Cytokine* 9, 801-808.

- Vichai, V., Kirtikara, K., 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols* 1, 1112-1116.
- Vilenchik, M.M., Knudson, A.G., 2003. Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 12871-12876.
- Virag, L., 2005. The expanding universe of poly(ADP-ribose)ation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62, 719-720.
- Virag, L., Salzman, A.L., Szabo, C., 1998a. Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *J Immunol* 161, 3753-3759.
- Virag, L., Scott, G.S., Cuzzocrea, S., Marmer, D., Salzman, A.L., Szabo, C., 1998b. Peroxynitrite-induced thymocyte apoptosis: the role of caspases and poly (ADP-ribose) synthetase (PARS) activation. *Immunology* 94, 345-355.
- Virag, L., Szabo, C., 2002. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacological reviews* 54, 375-429.
- Vodenicharov, M.D., Sallmann, F.R., Satoh, M.S., Poirier, G.G., 2000. Base excision repair is efficient in cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Nucleic acids research* 28, 3887-3896.
- Wang, H., Shimoji, M., Yu, S.W., Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2003. Apoptosis inducing factor and PARP-mediated injury in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 991, 132-139.
- Wang, W., Li, N., Li, X., Tran, M.K., Han, X., Chen, J., 2015. Tankyrase Inhibitors Target YAP by Stabilizing Angiomin Family Proteins. *Cell reports* 13, 524-532.
- Wang, X., Perez, E., Liu, R., Yan, L.J., Mallet, R.T., Yang, S.H., 2007. Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Brain research* 1132, 1-9.
- Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y., Xue, D., 2002. Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 298, 1587-1592.
- Wang, Y., An, R., Umanah, G.K., Park, H., Nambiar, K., Eacker, S.M., . . . Dawson, T.M., 2016. A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Science* 354.
- Wang, Y., Kim, N.S., Haince, J.F., Kang, H.C., David, K.K., Andrabi, S.A., . . . Dawson, T.M., 2011. Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). *Science signaling* 4, ra20.
- Watanabe, F., Fukazawa, H., Masutani, M., Suzuki, H., Teraoka, H., Mizutani, S., Uehara, Y., 2004. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibits ATM kinase activity in DNA damage response. *Biochemical and biophysical research communications* 319, 596-602.
- Wei, J., Zhang, Y., Yu, T.Y., Sadre-Bazzaz, K., Rudolph, M.J., Amodeo, G.A., . . . Tong, L., 2016. A unified molecular mechanism for the regulation of acetyl-CoA carboxylase by phosphorylation. *Cell discovery* 2, 16044.

Referencias

- Weise, J., Isenmann, S., Bahr, M., 2001. Increased expression and activation of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) contribute to retinal ganglion cell death following rat optic nerve transection. *Cell death and differentiation* 8, 801-807.
- Westermann, B., 2012. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochimica et biophysica acta* 1817, 1833-1838.
- Weston, V.J., Oldreive, C.E., Skowronska, A., Oscier, D.G., Pratt, G., Dyer, M.J., . . . Stankovic, T., 2010. The PARP inhibitor olaparib induces significant killing of ATM-deficient lymphoid tumor cells in vitro and in vivo. *Blood* 116, 4578-4587.
- Whitehouse, C.J., Taylor, R.M., Thistlethwaite, A., Zhang, H., Karimi-Busheri, F., Lasko, D.D., . . . Caldecott, K.W., 2001. XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell* 104, 107-117.
- Willermain, F., Libert, S., Motulsky, E., Salik, D., Caspers, L., Perret, J., Delporte, C., 2014. Origins and consequences of hyperosmolar stress in retinal pigmented epithelial cells. *Frontiers in physiology* 5, 199.
- Woodbine, L., Brunton, H., Goodarzi, A.A., Shibata, A., Jeggo, P.A., 2011. Endogenously induced DNA double strand breaks arise in heterochromatic DNA regions and require ataxia telangiectasia mutated and Artemis for their repair. *Nucleic acids research* 39, 6986-6997.
- Wright, W.D., Shah, S.S., Heyer, W.D., 2018. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *The Journal of biological chemistry* 293, 10524-10535.
- Xu, B., O'Donnell, A.H., Kim, S.T., Kastan, M.B., 2002. Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer research* 62, 4588-4591.
- Xu, H., Tian, N., 2004. Pathway-specific maturation, visual deprivation, and development of retinal pathway. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 10, 337-346.
- Xu, Y., Huang, S., Liu, Z.G., Han, J., 2006. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation. *The Journal of biological chemistry* 281, 8788-8795.
- Xu, Y., Liu, C., Chen, S., Ye, Y., Guo, M., Ren, Q., . . . Chen, L., 2014. Activation of AMPK and inactivation of Akt result in suppression of mTOR-mediated S6K1 and 4E-BP1 pathways leading to neuronal cell death in in vitro models of Parkinson's disease. *Cellular signalling* 26, 1680-1689.
- Yamato, S., Hirabayashi, Y., Sugihara, H., 1984. An improved procedure for the histochemical demonstration of cathepsin D by the mercury-labeled pepstatin method. *Stain technology* 59, 113-120.
- Yang, N.C., Ho, W.M., Chen, Y.H., Hu, M.L., 2002. A convenient one-step extraction of cellular ATP using boiling water for the luciferin-luciferase assay of ATP. *Analytical biochemistry* 306, 323-327.
- Yang, S.W., Burgin, A.B., Jr., Huizenga, B.N., Robertson, C.A., Yao, K.C., Nash, H.A., 1996. A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between

- DNA and type I topoisomerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11534-11539.
- Ye, Z.W., Zhang, J., Townsend, D.M., Tew, K.D., 2015. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et biophysica acta* 1850, 1607-1621.
- Yeh, T.Y., Sbodio, J.I., Chi, N.W., 2006. Mitotic phosphorylation of tankyrase, a PARP that promotes spindle assembly, by GSK3. *Biochemical and biophysical research communications* 350, 574-579.
- Ying, W., Chen, Y., Alano, C.C., Swanson, R.A., 2002. Tricarboxylic acid cycle substrates prevent PARP-mediated death of neurons and astrocytes. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22, 774-779.
- Yonekawa, T., Thorburn, A., 2013. Autophagy and cell death. *Essays in biochemistry* 55, 105-117.
- Yoon, S.P., Kim, J., 2016. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 contributes to oxidative stress through downregulation of sirtuin 3 during cisplatin nephrotoxicity. *Anatomy & cell biology* 49, 165-176.
- Yoshimura, M., Kohzaki, M., Nakamura, J., Asagoshi, K., Sonoda, E., Hou, E., . . . Takeda, S., 2006. Vertebrate POLQ and POLbeta cooperate in base excision repair of oxidative DNA damage. *Molecular cell* 24, 115-125.
- Yousefzadeh, M.J., Wyatt, D.W., Takata, K., Mu, Y., Hensley, S.C., Tomida, J., . . . Wood, R.D., 2014. Mechanism of suppression of chromosomal instability by DNA polymerase POLQ. *PLoS genetics* 10, e1004654.
- Yu, D.Y., Cringle, S.J., 2005. Retinal degeneration and local oxygen metabolism. *Experimental eye research* 80, 745-751.
- Yu, M., Schreek, S., Cerni, C., Schamberger, C., Lesniewicz, K., Poreba, E., . . . Luscher, B., 2005. PARP-10, a novel Myc-interacting protein with poly(ADP-ribose) polymerase activity, inhibits transformation. *Oncogene* 24, 1982-1993.
- Yu, S.W., Andrabi, S.A., Wang, H., Kim, N.S., Poirier, G.G., Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2006. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18314-18319.
- Yu, S.W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., . . . Dawson, V.L., 2002. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297, 259-263.
- Yu, T., Jhun, B.S., Yoon, Y., 2011. High-glucose stimulation increases reactive oxygen species production through the calcium and mitogen-activated protein kinase-mediated activation of mitochondrial fission. *Antioxidants & redox signaling* 14, 425-437.
- Zencak, D., Schouwey, K., Chen, D., Ekstrom, P., Tanger, E., Bremner, R., . . . Arsenijevic, Y., 2013. Retinal degeneration depends on Bmi1 function and reactivation of cell cycle proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E593-601.

Referencias

- Zhang, L., Seitz, L.C., Abramczyk, A.M., Chan, C., 2010. Synergistic effect of cAMP and palmitate in promoting altered mitochondrial function and cell death in HepG2 cells. *Experimental cell research* 316, 716-727.
- Zhang, S., Lin, Y., Kim, Y.S., Hande, M.P., Liu, Z.G., Shen, H.M., 2007. c-Jun N-terminal kinase mediates hydrogen peroxide-induced cell death via sustained poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation. *Cell death and differentiation* 14, 1001-1010.
- Zhou, J., Ng, S., Huang, Q., Wu, Y.T., Li, Z., Yao, S.Q., Shen, H.M., 2013. AMPK mediates a pro-survival autophagy downstream of PARP-1 activation in response to DNA alkylating agents. *FEBS letters* 587, 170-177.
- Zhu, Y., Zhao, K.K., Tong, Y., Zhou, Y.L., Wang, Y.X., Zhao, P.Q., Wang, Z.Y., 2016. Exogenous NAD(+) decreases oxidative stress and protects H₂O₂-treated RPE cells against necrotic death through the up-regulation of autophagy. *Sci Rep* 6, 26322.

8.1. ANEXO I: Listado de abreviaturas

A

3-AB: 3-aminobenzamida
 Abs: absorbancia
 ACACA: acetil-CoA carboxilasa
 ACC1: acetil-CoA carboxilasa
 ACN: acetonitrilo
 AD: dominio de automodificación
 ADN: ácido desoxirribonucleico
 AFLD: enfermedad del hígado graso alcohólica
 AHR: *Aryl hydrocarbon receptor*
 AIF: factor inductor de apoptosis
 Akt: proteína quinasa B
 ALC1: *Amplified in liver cancer protein 1*
 AMBRA1: *Autophagy/Beclin-1 regulator 1*
 AMP: adenosín-5'-monofosfato
 AMPK: quinasa activada por AMP, *AMP-activated protein kinase*
 a-NHEJ: reparación alternativa por unión de extremos no homólogos
 ANK: dominio ankirina
 ANOVA: análisis de la varianza
 AP: *Apurinic/aprimidinic endonuclease*
 AP-1: *Activating Protein 1*
 APAF1: *Apoptotic protease activating factor 1*
 APC: Aloficocianina
 APL: *Aprataxin-and-PNK-like factor*
 ARH1: ADP-ribosilhidrolasa-1
 ARH3: ADP-ribosilhidrolasa-3
 ARNm: ARN mensajero
 ART: ADP-ribosil transferasa
 ATCC: *American Type Culture Collection*
 ATG1: *autophagy-related-1*
 ATM: *Ataxia-telangiectasia mutated*

ATP: adenosín-5'-trifosfato
 ATR: *ATM-and Rad3-Related*
 ATRIP: *ATR interacting protein*

B

BAK1: *BCL2 antagonist/killer 1*
 Bax: *BCL2 associated X*
 BCA: ácido bicinconínico
 Bcl2: *B-cell lymphoma-2*
 BCRT: *Breast Cancer Associated Protein C-Terminal Motif*
 BER: reparación por escisión de bases
 BME: medio basal *Eagle* con sales *Earle*
 BRCA1: *Breast cancer type 1 susceptibility protein*

C

CAT: dominio catalítico de PARP-1
 CCG: capa de células ganglionares
 CCHC: dedos de zinc con estructura Cys-Cys-His-Cys
 CENP-A: proteína centromérica A
 CENP-B: proteína centromérica B
 CFN: capa de fibras nerviosas
 CFR: capa de fotorreceptores
 CHD2: *chromodomain helicase DNA-binding protein 2*
 CHD4: *chromodomain helicase DNA-binding protein 4*
 CHK1: *Checkpoint kinase 1*
 CIC: Centro de Instrumentación Científica
 CNE: capa nuclear externa
 CNI: capa nuclear interna
 COX2: ciclooxigenasa 2

Anexo I: Listado de abreviaturas

CPE: capa plexiforme externa
CPI: capa plexiforme interna
CTE: cadena de transporte electrónico

D

D.O: densidad óptica
DAPI: 4',6' diamina-2-fenilindol
DBD: dominio de unión al ADN
DDB1: *DNA Damage Binding Protein 1*
DDB2: *DNA Damage Binding Protein 2*
DDR: respuesta al daño en el ADN
DIABLO: *diablo IAP-binding mitochondrial protein*
DISC: complejo inductor de muerte, *death-inducing signaling complex*
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA-PKc: proteína quinasa dependiente de ADN, *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*
DPBS: tampón fosfato salino
DPQ: 3,4-dihidro-5-[4-(1-piperidinil)butoxil]-1(2H)-isoquinolinona
DR4: receptor de muerte 4
DR5: receptor de muerte 5
DSBs: roturas de cadena doble
DTT: ditioneitol
dUTP: desoxiuridín trifosfato

E

EC-SOD: isoforma extracelular de la enzima superóxido dismutasa (SOD)
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EIF4BPB1: proteína de unión al factor eucariótico de inicio de la traducción 4E

ENPP: *Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase*
EP: epitelio pigmentario
Exo1: exonucleasa 1

F

FBS: suero bovino fetal
FC: *fold change*
FDA: Fundación Americana del Medicamento
FITC: fluoresceína 5-isotiocianato

G

GG-NER: mecanismo global de reparación por escisión de nucleótido
GO: ontología de genes
GPX: glutation peroxidasa
GSK3A: glucógeno sintasa quinasa 3 α

H

H2AX: histona de la familia H2A
H₂DCFDA: diacetato de diclorodihidrofluoresceína
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
HCC: hepatocarcinoma celular
HCD: método de disociación de alta energía
HCl: cloruro de hidrógeno
HClO: ácido hipocloroso
HD: motivo hélice-giro-hélice
HEPES: ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-etanosulfónico
HOO \cdot : radical hidropéroxilo
HPF1: *Histone PARylation Factor 1*
HR: recombinación homóloga
HTH: motivo hélice-giro-hélice

γ -H2AX: H2AX fosforilada en la serina 139

I

IAM: iodoacetamida

IFN- γ : interferón γ

IgG: inmunoglobulina G

IL-1 β : interleuquina 1 β

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

INT: Cloruro de 5-fenil-2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-2H-tetrazolio

IP: yoduro de propidio

IRE1 α : *inositol-requiring enzyme 1 α*

J

JNK: quinasa N-terminal de c-jun

K

KSEA: Análisis de enriquecimiento de sustratos de quinasas

L

LARP-1: *La-related protein*

LB: tubos *Eppendorf* de baja unión a proteínas

LC-MS/MS: sistema de espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida

LDH: lactato deshidrogenasa

LPS: lipopolisacárido

LZ: cremallera de leucina

M

MAR: mono-ADP-ribosa

MDC1: *Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*

MET: microscopía electrónica de transmisión

MgCl₂: cloruro de magnesio

MIF: factor inhibidor de la migración de macrófagos

MLE: membrana limitante externa

MLI: membrana limitante interna

MnSOD: manganeso superóxido dismutasa

Mre11: *Meiotic recombination 11*

MRN: complejo formado por Mre11, NSB1 y Rad50

MS: espectrometría de masas

mTOR: *mammalian target of rapamycin*

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

N

Na₃VO₄: ortovanadato sódico

Na₄P₂O₇: pirofosfato tetrasódico

NaCl: cloruro de sodio

NAD⁺: dinucleótido de nicotinamida y adenina

NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina, forma reducida

NaF: fluoruro de sodio

NAFLD: enfermedad del hígado graso no alcohólica

NaOH: hidróxido sódico

NSB1: nibrina

NCCD: Comité de Nomenclatura Sobre Muerte Celular

NER: reparación por escisión de nucleótidos

Anexo I: Listado de abreviaturas

NF- κ B: factor nuclear κ B
NGS: suero de cabra
NH₄OH: hidróxido de amonio
NHEJ: reparación por unión de extremos no homólogos
NLS: secuencia de localización nuclear
NO: óxido nítrico
NO₂: dióxido de nitrógeno
NOX: enzima NADPH oxidasa
NSI: señal de intensidad normalizada
NUDIX: *Nucleoside Diphosphates linked to other moieties X*

O

¹O₂: oxígeno singlete
8-OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
O₂⁻: radical superóxido
OH[·]: radical hidroxilo
ONL: *outer nuclear layer*, versión inglesa de CNE
ONOO⁻: peroxinitrito

P

PAR: poli-ADP-ribosa
PARG: Poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa
PARPs: Poli(ADP-ribosa) Polimerasas
PBMs: dominio de unión a secuencias consenso PAR
PBS: tampón fosfato salino
PBS-T: PBS Tween 20 al 0.1%
PBS-T-NGS: NGS al 5% en PBS-T
PBS-Tr: PBS con Tritón X-100
PBZs: dominio de unión PAR a través de dedos de zinc
PERK: *Protein kinase R(PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*
Pescal: *Peak Statistic Calculator*

PIKK: fosfatidil-inositol 3 quinasa
PJ34: N-(6-oxo-5,6-dihidrofenantridin-2-il)-2(N,N-dimetilamino)acetamida
PKGI α : isoforma α de la proteína-quinasa dependiente de cGMP
PLP: paraformaldehído-lisina-peryodato
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNKP: *Polynucleotide kinase 3'-phosphatase*
PS: piruvato sódico
PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa
PTM: modificación postraduccional
PVDF: difluoruro de polivinilo

R

RAD23B: *RAD23 homologue B*
Rad50: proteína de reparación del ADN
RAP80: *receptor-associated protein 80*
Raptor: *regulatory-associated protein of mTOR*
RNS: especies reactivas de nitrógeno
ROO[·]: radical peroxilo
ROS: especies reactivas de oxígeno
RP: retinitis pigmentosa

S

SAM: *sterile alpha motif*
SDS: dodecilsulfato sódico
SEM: error estándar de la media
siNT: control negativo de *siRNA*
siPARP-1: *siRNA* para PARP-1
siRNA: ARN pequeño de interferencia
SNC: sistema nervioso central
SOD: superóxido dismutasa
SPE: sistema de extracción en fase sólida

SQ: motivo formado por el aminoácido serina (S) y glutamina (Q)

SRB: sulforrodamina B

SSBs: roturas de cadena simple

T

TBARs: productos reactivos al ácido tiobarbitúrico

TBC1D1: proteína activadora de GTPasas

TBS: tampón Tris salino

TBS-T: TBS con Tween 20 al 0.1%

TBS-T-L: TBS-T con un 5% de leche

TCA: ácido tricloroacético

TDP1: fosfodiesterasa

TdT: enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal

TFA: ácido trifluoroacético

TiO₂: dióxido de titanio

TLR: *Toll like receptor*

TLR3: *Toll like receptor 3*

TNF: factor de necrosis tumoral

TNFR1: receptor de TNF tipo 1, *tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 1*

TNFR2: receptor de TNF tipo 2, *tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 2*

TQ: motivo formado por el aminoácido treonina (T) y glutamina (Q)

TSC2: *tuberous sclerosis complex 2*

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*

U

ULK1: *unc-51-like autophagy-activating kinase 1*

UPLC: sistema de cromatografía líquida de Ultra Alta resolución

V

VEEV: virus de la encefalitis equina

VSP34: del inglés *vacuolar protein sorting-34*

W

WGR: región rica en triptófano (W), glicina (G) y arginina (R)

WWE: dominio rico en triptófano (W) y glutámico (E)

X

XLF: *XRCC4-like factor*

XPC: *Xeroderma pigmentosum group C-complementing protein*

XRCC1: *X-ray repair cross-complementing protein 1*

XRCC4: *X-ray cross complementing protein 4*

Z

ZBP1: *Z-DNA binding protein 1*

8.2. ANEXO II: Índice de figuras

Figura 1. Generación y consecuencias de las ROS	14
Figura 2. Estructura de la retina de vertebrados.....	19
Figura 3. Familia PARP	22
Figura 4. Estructura de la proteína PARP-1	26
Figura 5. Estructura de la poli-ADP-ribosa	29
Figura 6. Papel de PARP-1 en la reparación de roturas de cadena simple.....	33
Figura 7. Papel de PARP-1 en la reparación de roturas de cadena doble	37
Figura 8. PARP-1 y muerte celular	45
Figura 9. Muerte celular mediada por PARP-1, <i>Parthanatos</i>	49
Figura 10. Papel de PARP-1 en el control de la transcripción génica.....	52
Figura 11. Diferentes generaciones de inhibidores de PARP-1	56
Figura 12. Aislamiento y cultivo de retina de ratón.....	66
Figura 13. Procedimiento para el análisis de la morfología mitocondrial mediante MicroP.....	82
Figura 14. Daño oxidativo en la retina postnatal de ratón	113
Figura 15. Actividad de PARP-1 durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón	114
Figura 16. Expresión de γ -H2AX durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón	115
Figura 17. Distribución y cuantificación de γ -H2AX en los estadios P7, P14 y P21	116
Figura 18. Inmunodetección de γ -H2AX en retinas del estadio P7	117
Figura 19. Inmunodetección de γ -H2AX en retinas del estadio P14.....	118
Figura 20. Distribución de γ -H2AX y núcleos TUNEL positivos en retinas P7 y P14	119
Figura 21. Inmunodetección de γ -H2AX y núcleos TUNEL positivos en retinas P7 y P14	120
Figura 22. Esquema de tratamiento con H ₂ O ₂ y/o el inhibidor de PARP-1 PJ34 en explantes de retina de ratón y en la línea celular retiniana 661W.....	133
Figura 23. Efecto del tratamiento con H ₂ O ₂ y la inhibición de PARP-1 en explantes de retina de ratón	134
Figura 24. Efecto de la inhibición de PARP-1 en explantes no tratados con H ₂ O ₂	136
Figura 25. Efecto del tratamiento con H ₂ O ₂ y la inhibición de PARP-1 en los niveles de γ -H2AX y proteínas poli-ADP-ribosiladas	138
Figura 26. Actividad de PARP-1 en la línea celular 661W tratada con H ₂ O ₂	140
Figura 27. Efecto del tratamiento oxidativo y de la inhibición de PARP-1 en el fosfoproteoma de la línea celular 661W.....	142
Figura 28 Fosfopéptidos con cambios significativos en células 661W tratadas con H ₂ O ₂ en presencia y ausencia del inhibidor de PARP-1.....	144

Anexo II: índice de figuras

Figura 29. Señal de intensidad normalizada de los péptidos con fosforilación en motivos SQ.....	146
Figura 30. Efecto de la inhibición de PARP-1 en el ciclo celular y en la densidad celular de la línea celular 661W	148
Figura 31. Actividad de las quinasas ATM/ATR tras el tratamiento con H ₂ O ₂ e inhibición de PARP-1.....	150
Figura 32. Resumen de tratamientos y metodología empleada en la línea celular hepática WRL68	165
Figura 33. Análisis de la viabilidad celular y la producción de ROS tras el tratamiento con H ₂ O ₂ en la línea celular WRL68	166
Figura 34. Activación de PARP-1 tras el tratamiento con H ₂ O ₂ en la línea celular WRL68.....	168
Figura 35. Inhibición de PARP-1 en la línea celular WRL68	170
Figura 36. Efecto de los inhibidores de PARP-1 o la administración de NAD ⁺ en la viabilidad celular de hepatocitos tratados con H ₂ O ₂	172
Figura 37. Efecto de la inhibición de PARP-1 en la muerte celular inducida por H ₂ O ₂ en la línea celular WRL68	174
Figura 38. Análisis de la morfología mitocondrial tras el tratamiento con H ₂ O ₂ y 2 horas de post-incubación.	176
Figura 39. Análisis de la morfología mitocondrial tras el tratamiento con H ₂ O ₂ y 4 horas de post-incubación.	178
Figura 40. Neutralización de las ROS con piruvato sódico.	179
Figura 41. Efecto de la inhibición de PARP-1 o la administración de NAD ⁺ en la morfología mitocondrial tras el tratamiento con H ₂ O ₂ y 2 horas de post-incubación	180
Figura 42. Efecto de la inhibición de PARP-1 en la morfología mitocondrial tras el tratamiento con H ₂ O ₂ y 4 horas de post-incubación	182
Figura 43. Análisis de la ultraestructura mitocondrial.	183
Figura 44. Niveles intracelulares de ATP.....	184
Figura 45. Esquema de tratamiento con H ₂ O ₂ en la línea celular WRL68.....	195
Figura 46. Fosfoproteoma celular de la línea celular WRL68 tras el tratamiento oxidativo y/o la inhibición de PARP-1 o la administración de NAD ⁺	196
Figura 47. Análisis de ontología de genes tras el tratamiento oxidativo y/o la inhibición de PARP-1 o la administración de NAD ⁺	198
Figura 48. Fosfoproteoma de la línea celular WRL68 tras el silenciamiento de PARP-1 y el tratamiento oxidativo.....	200
Figura 49. Evaluación de la actividad de quinasas tras el silenciamiento de PARP-1 y el tratamiento oxidativo	202

Figura 50. Efecto del silenciamiento de PARP-1 sobre la viabilidad celular de la línea WRL68 tras el tratamiento oxidativo.	204
Figura 51. Papel de PARP-1 en la retina neural sometida a estrés oxidativo.....	216
Figura 52. Papel de PARP-1 en la muerte celular inducida por estrés oxidativo en un modelo <i>in vitro</i> de hepatocitos.....	226

8.3. ANEXO III: Tablas

Tabla I. Anticuerpos usados en la inmunodetección de proteínas (Western Blot). Se indica la casa comercial, así como la dilución empleada.

Tabla II. Análisis de GO. Términos de GO para procesos biológicos e indicador de *Uniprot (Uniprot ID)* de péptidos cuya fosforilación se ve incrementada (“*fold change*” ≥ 1 y $p < 0.05$ con respecto al control) en células 661W tratadas con H_2O_2 y con H_2O_2 en presencia del inhibidor PJ34.

Tabla III. Péptidos cuya fosforilación se ve incrementada de forma significativa en células 661W tratadas con H_2O_2 en presencia de PJ34 ($H_2O_2 + PJ34$, $p < 0.05$, “*fold change*” ≥ 1).

Tabla IV. Péptidos comunes cuya fosforilación se ve incrementada en ambos tratamientos (H_2O_2 y $H_2O_2 + PJ34$, “*fold change*” ≥ 1 respecto al control).

Tabla V. Fosfopéptidos en los que el inhibidor PJ34 es capaz de contrarrestar los efectos del H_2O_2 en el grado de fosforilación ($-1 \geq$ “*fold change*” ≥ 1 en H_2O_2 *versus* control, y, $-1 \geq$ “*fold change*” ≥ 1 en $H_2O_2 + PJ34$ *versus* H_2O_2 ; $p < 0.05$ en H_2O_2 *versus* control, y $p < 0.05$ en $H_2O_2 + PJ34$ *versus* H_2O_2).

Tabla VI. Fosfopéptidos en los que el NAD^+ es capaz de contrarrestar los efectos del H_2O_2 en el grado de fosforilación ($-1 \geq$ “*fold change*” ≥ 1 en H_2O_2 *versus* control, y, $-1 \geq$ “*fold change*” ≥ 1 en $H_2O_2 + NAD^+$ *versus* H_2O_2 ; $p < 0.05$ en H_2O_2 *versus* control, y $p < 0.05$ en $H_2O_2 + NAD^+$ *versus* H_2O_2).

Tabla VII. Fosfopéptidos en los que silenciamiento de PARP-1 es capaz de contrarrestar los efectos del H_2O_2 en el grado de fosforilación ($-1 \geq$ “*fold change*” ≥ 1 para siNT + H_2O_2 *versus* siNT + control, y, $-1 \geq$ “*fold change*” ≥ 1 en siPARP-1 + H_2O_2 *versus* siNT + H_2O_2 ; $p < 0.05$ en siNT + H_2O_2 *versus* siNT + control, y $p < 0.05$ en siPARP-1 + H_2O_2 *versus* siNT + H_2O_2).

Tabla I

Anticuerpo	Referencia y procedencia comercial	Dilución
Anti-MnSOD (ratón, monoclonal)	ref. sc-133134 Santa Cruz Biotechnology	1:5000
Anti-PAR (ratón, monoclonal)	ref. ALX-804-220 Alexis Biochemicals	1:400
Anti-γ-H2AX (conejo, monoclonal)	ref. NB100-79967 Novus Biologicals	1:5000
Anti-3-NT (conejo, policlonal)	ref. 06-284 Millipore	1:500
Anti-β-tubulina III (conejo, policlonal)	ref. T2200 Sigma	1:10000
Anti-PAR (ratón, monoclonal)	ref. 4335-MC-100 Trevigen	1:1000
Anti-phospho-ATM/ATR substrate motif [pSQ]	ref. #9607S Cell Signaling Technology	1:1000
Anti-β-actina (ratón, monoclonal) / (conejo, monoclonal)	ref. A5441 / #8457 Sigma/ Cell Signaling Technology	1:1000
Anti-PARP-1 (ratón, monoclonal)	ref. 556362 BD Pharmingen™	1:1000
Anti-PARP-1 (ratón, monoclonal)	ref. 556362 BD Pharmingen™	1:1000
Anti-mouse-IgG-POD	ref. A3682 Sigma	1:5000
Anti-rabbit-IgG-POD	ref. A0545 Sigma	1:5000
Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody	ref. #7076S Cell Signaling Technology	1:5000
ECL rabbit IgG, HRP-linked whole ab (from donkey)	ref. NA934 GE Healthcare	1:5000

Tabla III

Uniprot ID	Nombre de la proteína	Gene ID y sitio de PTM	FC
4EBP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>	Eif4ebp1 pT69 pS99 pS100	1.8
AAK1	<i>AP2-associated protein kinase 1</i>	Aak1 pT651	1.4
ABL2	<i>Abelson tyrosine-protein kinase 2</i>	Abl2 pS936	1.0
ABLM1	<i>Actin-binding LIM protein 1</i>	Ablm1 pS466	1.1
ACACA	<i>Acetyl-CoA carboxylase 1</i>	Acaca pS79	1.0
ACTN1	<i>Alpha-actinin-1</i>	Actn1 pS362	1.2
AFAD	<i>Afadin</i>	Mllt4 pS1795	1.3
AFAP1	<i>Actin filament-associated protein 1</i>	Afap1 pS549	1.0
AKA12	<i>A-kinase anchor protein 12</i>	Akap12 pT1191	1.0
ALMS1	<i>Alstrom syndrome protein 1 homolog</i>	Alms1 pS2254	3.3
AMFR	<i>E3 ubiquitin-protein ligase AMFR</i>	Amfr pS542	1.0
AN13A	<i>Ankyrin repeat domain-containing protein 13A</i>	Ankrd13a pS205	1.3
ANO8	<i>Anoctamin-8</i>	Ano8 pS637	1.1
ASPC1	<i>Tether containing UBX domain for GLUT4</i>	Aspscr1 pS279	1.1
ASPP2	<i>Apoptosis-stimulating of p53 protein 2</i>	Tp53bp2 pS328	1.5
ATM	<i>Serine-protein kinase ATM</i>	Atm pS1987	1.2
ATX2L	<i>Ataxin-2-like protein</i>	Atxn2l pS687	1.3
BCAS3	<i>Breast carcinoma-amplified sequence 3 homolog</i>	Bcas3 pS503	1.1
BD1L1	<i>Biorientation of chromosomes in cell division protein 1-like</i>	Bod1l pS2751	1.6
BIRC6	<i>Baculoviral IAP repeat-containing protein 6</i>	Birc6 pS4850	2.9
BIRC6	<i>Baculoviral IAP repeat-containing protein 6</i>	Birc6 pS593	1.1
BOP1	<i>Ribosome biogenesis protein BOP1</i>	Bop1 pT83 pS84	9.1
BOP1	<i>Ribosome biogenesis protein BOP1</i>	Bop1 pS84	1.0
CASC5	<i>Protein CASC5</i>	Casc5 pS794	1.0
CCDC6	<i>Coiled-coil domain-containing protein 6</i>	Ccdc6 pS233 pS237	1.0
CCDC6	<i>Coiled-coil domain-containing protein 6</i>	Ccdc6 pS424 pT427	1.1
CCNE1	<i>G1/S-specific cyclin-E1</i>	Ccne1 pS385	1.0
CD2AP	<i>CD2-associated protein</i>	Cd2ap pT87	1.4

CDC23	<i>Cell division cycle protein 23 homolog</i>	Cdc23 pT562	1.0
CDC27	<i>Cell division cycle protein 27 homolog</i>	Cdc27 pS365	1.3
CDC5L	<i>Cell division cycle 5-like protein</i>	Cdc5l pT385 pT396	1.2
CK084	<i>Uncharacterized protein C11orf84 homolog</i>	pS249 pS252	1.2
CLCA	<i>Calcium-activated chloride channel regulator 1</i>	Clca1 pS223	1.4
CO043	<i>CO043</i>	CO043 pT149	1.1
CP110	<i>Centriolar coiled-coil protein of 110 kDa</i>	Ccp110 pT428	1.2
CPSF6	<i>Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6</i>	Cpsf6 pT407	1.0
CPSF6	<i>Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6</i>	Cpsf6 pS410	1.1
CPSF7	<i>Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7</i>	Cpsf7 pT203	1.1
CREB1	<i>Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1</i>	Creb1 pS108 pS111	1.0
DBNL	<i>Drebrin-like protein</i>	Dbnl pS277	1.2
DCAF6	<i>DDB1- and CUL4-associated factor</i>	Dcaf6 pS336	1.4
DPOA2	<i>DNA polymerase alpha subunit B</i>	Pola2 pS126	1.0
DREB	<i>Drebrin</i>	Dbn1 pS272	1.0
DREB	<i>Drebrin</i>	Dbn1 pS387	1.0
EFCB7	<i>EF-hand calcium-binding domain-containing protein 7</i>	Efcab7 pS212	1.0
EH1L1	<i>EH domain-binding protein 1-like protein 1</i>	Ehbp1l1 pS1331	1.2
EHBP1	<i>EH domain-binding protein 1</i>	Ehbp1 pS676	1.3
EIF3B	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B</i>	Eif3b pS37 pS40	1.1
EPHA2	<i>Ephrin type-A receptor 2</i>	Epha2 pS898	1.3
EPN1	<i>Epsin-1</i>	Epn1 pS434	1.2
ERC6L	<i>DNA excision repair protein ERCC-6-like</i>	Ercc6l pS1001	1.3
ETV3	<i>ETS translocation variant 3</i>	Etv3 pS139	1.5
FIL1L	<i>Filamin A-interacting protein 1-like</i>	Filip1l pS1047	1.3
FLNC	<i>Filamin-C</i>	Finc pS2234	1.2
FOXO3	<i>Forkhead box protein O3</i>	Foxo3 pS252	1.8
FRS2	<i>Fibroblast growth factor receptor substrate 2</i>	Frs2 pT328	8.7
FXR1	<i>Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1</i>	Fxr1 pT398	1.0
G3BP1	<i>Ras GTPase-activating protein-binding protein 1</i>	G3bp1 pT230 pS231	2.2
GAPD1	<i>GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1</i>	Gapvd1 pS746	1.6
GGNB2	<i>Gametogenetin-binding protein 2</i>	Ggnbp2 pS360	1.5

GOGA5	<i>Golgin subfamily A member 5</i>	Golga5 pS155	1.0
GSK3A	<i>Glycogen synthase kinase-3 alpha</i>	Gsk3a pS21	1.1
GTSE1	<i>G2 and S phase-expressed protein 1</i>	Gtse1 pS73	1.1
GTSE1	<i>G2 and S phase-expressed protein 1</i>	Gtse1 pS605	1.4
GTSE1	<i>G2 and S phase-expressed protein 1</i>	Gtse1 pS68	1.2
H13	<i>Histone H1.3</i>	Hist1h1d pS37	1.5
H2AX	<i>Histone H2AX</i>	H2afx pS140	1.0
HDGF	<i>Hepatoma-derived growth factor</i>	Hdgf pT200 pS202	1.6
HECD1	<i>E3 ubiquitin-protein ligase HECTD1</i>	Hectd1 pS1392	1.3
HELZ	<i>Probable helicase with zinc finger domain</i>	Helz pS1788	1.1
HMOX1	<i>Heme oxygenase 1</i>	Hmox1 pS229	1.3
HPBP1	<i>Hsp70-binding protein 1</i>	Hspbp1 pS349	1.0
HTSF1	<i>HIV Tat-specific factor 1 homolog</i>	Htatsf1 pS705	1.1
IF4B	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4B</i>	Eif4b pT500 pS504	1.0
IF4G1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1</i>	Eif4g1 pS1211	1.1
JUNB	<i>Transcription factor jun-B</i>	Junb pT252 pS256	1.0
JUNB	<i>Transcription factor jun-B</i>	Junb pT252	1.1
KC1E	<i>Casein kinase I isoform epsilon</i>	Csnk1e pS389	1.0
KIF11	<i>Kinesin-like protein KIF11</i>	Kif11 pS988	1.1
KIF15	<i>Kinesin-like protein KIF15</i>	Kif15 pS1141	1.1
KS6A3	<i>Ribosomal protein S6 kinase alpha-3</i>	Rps6ka3 pS369 pS375	1.6
LAP2	<i>Protein LAP2</i>	Erbp2ip pS1077	1.1
LARP4	<i>La-related protein 4</i>	Larp4 pS69	1.0
LC7L3	<i>Luc7-like protein 3</i>	Luc7l3 pS110	8.3
LIN54	<i>Protein lin-54 homolog</i>	Lin54 pS310	1.2
LIPB1	<i>Liprin-beta-1</i>	Ppfibp1 pS595	2.0
LRC47	<i>Leucine-rich repeat-containing protein 47</i>	Lrrc47 pT521	1.0
MACF1	<i>Microtubule-actin cross-linking factor 1</i>	Macf1 pS5551	1.0
MAP1B	<i>Microtubule-associated protein 1B</i>	Map1b pS1151	1.3
MAP1B	<i>Microtubule-associated protein 1B</i>	Map1b pS1778 pS1781 pT1784	1.0
MAP4	<i>Microtubule-associated protein 4</i>	Map4 pS617	1.1
MAP4	<i>Microtubule-associated protein 4</i>	Map4 pS475	1.0

MAP4	<i>Microtubule-associated protein 4</i>	Map4 pS517	1.0
MAP6	<i>Microtubule-associated protein 6</i>	Map6 pS632	1.9
MARCS	<i>Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate</i>	Marcks pS113	9.0
MAST4	<i>Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 4</i>	Mast4 pS2549	1.2
MDC1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>	Mdc1 pT325	1.4
MOES	<i>Moesin</i>	Msn pS576	1.0
MPRIIP	<i>Myosin phosphatase Rho-interacting protein</i>	Mprip pS617	1.1
MXRA7	<i>Matrix-remodeling-associated protein 7</i>	Mxra7 pS79 pS96	8.3
MYC	<i>Myc proto-oncogene protein</i>	Myc pS71	1.4
MYPT1	<i>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A</i>	Ppp1r12a pS299	1.0
NCK5L	<i>Nck-associated protein 5-like</i>	Nckap5l pS473	1.1
NEST	<i>Nestin</i>	Nes pS841	1.1
NFIL3	<i>Nuclear factor interleukin-3-regulated protein</i>	Nfil3 pS353	1.8
NOP2	<i>Probable 28S rRNA (cytosine-C(5))-methyltransferase</i>	Nop2 pS59	1.1
NUP93	<i>Nuclear pore complex protein Nup93</i>	Nup93 pS52	1.3
ODPA	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial</i>	Pdha1 pS232	1.3
OTUB1	<i>Ubiquitin thioesterase OTUB1</i>	Otub1 pS16	1.0
P66B	<i>Transcriptional repressor p66-beta</i>	Gatad2b pS136	1.1
PA24A	<i>Cytosolic phospholipase A2</i>	Pla2g4a pS726	1.3
PAIRB	<i>Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein</i>	Serbp1 pS252	2.3
PAK1	<i>Serine/threonine-protein kinase PAK 1</i>	Pak1 pS204	1.4
PAK2	<i>Serine/threonine-protein kinase PAK 2</i>	Pak2 pS197	1.1
PAXI	<i>Paxillin</i>	Pxn pS83	1.0
PDXD1	<i>Pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1</i>	Pdxd1 pT687 pT691	1.3
PHAR4	<i>Phosphatase and actin regulator 4</i>	Phactr4 pT146	1.0
PHF2	<i>Lysine-specific demethylase PHF2</i>	Phf2 pS848	1.1
PNISR	<i>Arginine/serine-rich protein PNISR</i>	Pnizr pS726	1.2
PP1RA	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 1 regulatory subunit 10</i>	Ppp1r10 pS313	1.0
PP2BA	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform</i>	Ppp3ca pS462	3.8
PPR18	<i>Phostensin</i>	Ppp1r18 pS194	1.0

PRC2C	<i>Protein PRRC2C</i>	Prrc2c pS102	1.7
PRUN2	<i>Protein prune homolog 2</i>	Prune2 pS704	2.0
PSA5	<i>Proteasome subunit alpha type-5</i>	Psm5 pS56	1.1
PTRF	<i>Polymerase I and transcript release factor</i>	Ptrf pS169	1.1
RAI14	<i>Ankycorbin</i>	Rai14 pS318	1.2
RBM34	<i>RNA-binding protein 34</i>	Rbm34 pS20	1.0
RHG17	<i>Rho GTPase-activating protein 17</i>	Arhgap17 pT730 pT734 pT736	1.6
RIPK3	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i>	Ripk3 pS179	1.2
RLA2	<i>60S acidic ribosomal protein P2</i>	Rplp2 pS74	1.0
RTN4	<i>Reticulon-4</i>	Rtn4 pT430	1.1
SAFB1	<i>Scaffold attachment factor B1</i>	Safb pS354	9.7
SAFB2	<i>Scaffold attachment factor B2</i>	Safb2 pS375	2.8
SF3A1	<i>Splicing factor 3A subunit 1</i>	Sf3a1 pT348 pS357	8.6
SH3G1	<i>Endophilin-A2</i>	Sh3gl1 pS288	1.1
SPG20	<i>Spartin</i>	Spg20 pS126	1.0
SQSTM	<i>Sequestosome-1</i>	Sqstm1 pS368	1.6
SQSTM	<i>Sequestosome-1</i>	Sqstm1 pT272	1.1
SRRM2	<i>Serine/arginine repetitive matrix protein 2</i>	Srrm2 pS1209 pS1216	1.7
SRRM2	<i>Serine/arginine repetitive matrix protein 2</i>	Srrm2 pS2646	1.1
SSA27	<i>Sjogren syndrome/scleroderma autoantigen 1 homolog</i>	Sssca1 pS78	2.8
SYDE1	<i>Rho GTPase-activating protein SYDE1</i>	Syde1 pS576	2.7
SYNE2	<i>Nesprin-2</i>	Syne2 pS4184	1.1
SYNRG	<i>Synergin gamma</i>	Synrg pS1067	1.0
SYNRG	<i>Synergin gamma</i>	Synrg pS576	1.2
T22D4	<i>TSC22 domain family protein 4</i>	Tsc22d4 pS165	1.2
T22D4	<i>TSC22 domain family protein 4</i>	Tsc22d4 pS271	1.1
TAB2	<i>TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 2</i>	Tab2 pS584	1.0
TB182	<i>182 kDa tankyrase-1-binding protein</i>	Tnks1bp1 pS1657	1.4
TBC15	<i>TBC1 domain family member 15</i>	Tbc1d15 pS32	1.1
TBC8B	<i>TBC1 domain family member 8B</i>	Tbc1d8b pS358	1.4
TBCD4	<i>TBC1 domain family member 4</i>	Tbc1d4 pS595	1.1
TBCD5	<i>TBC1 domain family member 5</i>	Tbc1d5 pS565 pS568	1.0

TISD	<i>Zinc finger protein 36, C3H1 type-like 2</i>	Zfp36l2 pS464	1.6
TNR6A	<i>Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein</i>	Tnrc6a pS1804	1.1
TP53B	<i>Tumor suppressor p53-binding protein 1</i>	Tp53bp1 pS816	1.1
TPC10	<i>Trafficking protein particle complex subunit 10</i>	Trappc10 pS708	1.0
TPC10	<i>Trafficking protein particle complex subunit 10</i>	Trappc10 pS685	1.1
TYY1	<i>Transcriptional repressor protein YY1</i>	Yy1 pS247	1.2
UBE2O	<i>(E3-independent) E2 ubiquitin-conjugating enzyme UBE2O</i>	Ube2o pS394	1.2
UBR4	<i>E3 ubiquitin-protein ligase UBR4</i>	Ubr4 pS362	1.1
WDTC1	<i>WD and tetratricopeptide repeats protein 1</i>	Wdtdc1 pS227	1.1
ZBED6	<i>Zinc finger BED domain-containing protein 6</i>	Zbed6 pS809	8.9
ZC3HD	<i>Zinc finger CCCH domain-containing protein 13</i>	Zc3h13 pS1484	1.1
ZCHC8	<i>Zinc finger CCHC domain-containing protein 8</i>	Zcchc8 pS599 pS610	9.4
ZFR	<i>Zinc finger RNA-binding protein</i>	Zfr pS1054	1.0

PTM: modificación postraduccional, FC: “fold change” de fosfopéptidos en H₂O₂ + PJ34 respecto al control.

Tabla IV

Uniprot ID	Nombre de la proteína	Gene ID y sitio de PTM	motivo PTM	Efecto de PJ34
ATRX	<i>Transcriptional regulator ATRX</i>	Atrx pS111	AATENSENDIT	Incremento
BRCA1*	<i>Breast cancer type 1 susceptibility protein homolog</i>	Brca1 pS1422	NENPV <u>S</u> QNLKS	Incremento
CLIC4	<i>Chloride intracellular channel protein 4</i>	Clic4 pS167	EIDENS <u>M</u> EDIK	Incremento
CNDH2*	<i>Condensin-2 complex subunit H2</i>	Ncaph2 pS494	QETEL <u>S</u> QRIRD	Incremento
COPRS*	<i>Coordinator of PRMT5 and differentiation stimulator</i>	Coprs pS16	PGERS <u>S</u> QEAPS	Incremento
CSN7A*	<i>COP9 signalosome complex subunit 7a</i>	Cops7a pS232	AAAAT <u>S</u> QDPEQ	Incremento
DCK*	<i>Deoxycytidine kinase</i>	Dck pS74	EELTT <u>S</u> QKSGG	Incremento
EIF3B	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B</i>	Eif3b pS111	ARGHPS <u>S</u> AGAAE	Descenso
EIF3B	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B</i>	Eif3b pS111 pS120 pS123	ARGHPS <u>S</u> AGAAE EEEGG <u>S</u> DGSAA GGSDG <u>S</u> AAEAE	Descenso
FLNB	<i>Filamin-B</i>	Flnb pS2487	ANETSSILVES	Incremento
FUBP2*	<i>Far upstream element-binding protein 2</i>	Khsrp pS275	LIQDGS <u>S</u> QNTNV	Incremento
GSH1	<i>Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit</i>	Gclc pS8	LLSQGSPLSWE	Incremento
GSK3A	<i>Glycogen synthase kinase-3 alpha</i>	Gsk3a pS21	RARTSSFAEPG	Incremento
HMGN1	<i>Non-histone chromosomal protein HMG-14</i>	Hmgn1 pS7	PKRKVSADGAA	Descenso
HMOX1	<i>Heme oxygenase 1</i>	Hmox1 pS242	RQRPASLVQDT	Incremento
I2BP2	<i>Interferon regulatory factor 2-binding protein 2</i>	Irf2bp2 pS438 pS443	TTRRN <u>S</u> SSPPS SSSPP <u>S</u> PSSMN	Descenso
KIF23	<i>Kinesin-like protein KIF23</i>	Kif23 pS720	SNSC <u>S</u> SISVAS	Incremento
MDC1*	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>	Mdc1 pS975	QSLLT <u>S</u> QSQKQ	Incremento
NASP*	<i>Nuclear autoantigenic sperm protein</i>	Nasp pS755	ENQA <u>E</u> SQTAEG	Incremento
NEDD4	<i>E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4</i>	Nedd4 pS309	TRRQ <u>I</u> SEDVDG	Descenso
NEST	<i>Nestin</i>	Nes pS840	QESLRLDENQ	Incremento
NFIA	<i>Nuclear factor 1 A-type</i>	Nfia pS303 pS310	TKRLK <u>S</u> VEDEM EDEM <u>S</u> PGEEP	Descenso
P66B	<i>Transcriptional repressor p66-beta</i>	Gatad2b pT121 pS123 pS130	DRGRLTPSPDI GRLTP <u>S</u> PDIIV	Incremento

			DIIVLSDNEAS	
PABP2*	<i>Polyadenylate-binding protein 2</i>	Pabpn1 pS91	SGAPG <u>S</u> QEEEE	Incremento
PLEC	<i>Plectin</i>	Plec pS2586	IQRQQSDHDAE	Descenso
PP4R2	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 2</i>	Ppp4r2 pS354	EGSGVSPAQTD	Incremento
PP4R2*	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 2</i>	Ppp4r2 pS261	VRETAS <u>S</u> QTVSG	Incremento
RANB3*	<i>Ran-binding protein 3</i>	Ranbp3 pS283	GSESS <u>S</u> QEAAP	Incremento
SAC2	<i>Phosphatidylinositide phosphatase SAC2</i>	Inpp5f pS829	LWKSD <u>S</u> SLETM	Incremento
SMC3*	<i>Structural maintenance of chromosomes protein 3</i>	Smc3 pS1083	ERGSG <u>S</u> QSSVP	Incremento
SP1*	<i>Transcription factor Sp1</i>	Sp1 pS384	GS <u>L</u> QGS <u>S</u> QQKEG	Incremento
SRRM2*	<i>Serine/arginine repetitive matrix protein 2</i>	Srrm2 pS1194	LLPN <u>S</u> SQDELM	Incremento
SUGP1	<i>SURP and G-patch domain-containing protein 1</i>	Sugp1 pS336	SLRRK <u>S</u> APEAL	Incremento
SZRD1	<i>SUZ domain-containing protein</i>	Szrd1 pS105 pS107	RRILG <u>S</u> SASPEE ILG <u>S</u> ASPEEEQ	Descenso
TIF1B*	<i>Transcription intermediary factor 1-beta</i>	Trim28 pS501	DLTSD <u>S</u> QPPVF	Incremento
TR150*	<i>Thyroid hormone receptor-associated protein 3</i>	Thrap3 pS210	FSGGT <u>S</u> QDIKG	Incremento
UBQL4*	<i>Ubiquilin-4</i>	Ubqln4 pS313	SDNSS <u>S</u> QPLRT	Incremento
UBXN7*	<i>UBX domain-containing protein 7</i>	Ubxn7 pS266	DASED <u>S</u> QLEAA	Incremento
WDR13	<i>WD repeat-containing protein 13</i>	Wdr13 pS116 pY117	SVSRG <u>S</u> YQLQA VSRG <u>S</u> YQLQAQ	Descenso
ZC11A*	<i>Zinc finger CCCH domain-containing protein 11A</i>	Zc3h11a pS730	SGPSS <u>S</u> QTATK	Incremento

PTM: modificación postraduccional; *Proteínas con fosforilación en motivos SQ.

Tabla V

Uniprot ID	Nombre de la proteína	Gene ID y sitio de PTM	FC1	FC2
3BP5	<i>SH3 domain-binding protein 5</i>	SH3BP5 pS8	7.4	6.0
AMOL2	<i>Angiomotin-like protein 2</i>	AMOTL2 pR526 AMOTL2 pS540	3.6	1.2
AMPD2	<i>AMP deaminase 2</i>	AMPD2 pS192	9.7	6.0
ARAF	<i>Serine/threonine-protein kinase A-Raf</i>	ARAF pS547	6.0	3.3
ARBK1	<i>Beta-adrenergic receptor kinase 1</i>	GRK2 pS670	2.5	0.5
ARI1A	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 1A</i>	ARID1A pS1182	6.7	4.9
BAZ1A	<i>Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A</i>	BAZ1A pS1283	2.4	1.3
CSK22	<i>Casein kinase II subunit alpha'</i>	CSNK2A2 pS333	2.2	1.1
CTND1	<i>Catenin delta-1</i>	CTNND1 pT61	1.6	-1.9
DIDO1	<i>Death-inducer obliterator 1</i>	DIDO1 pS1456 DIDO1 pS1471	7.2	0.0
FBSL	<i>Fibrosin-1-like protein</i>	FBRSL1 pS338	5.9	3.7
FNIP1	<i>Folliculin-interacting protein 1</i>	FNIP1 pS220	2.1	0.9
GOGA4	<i>Golgin subfamily A member 4</i>	GOLGA4 pS266	2.3	1.1
GORS2	<i>Golgi reassembly-stacking protein 2</i>	GORASP2 pT225	3.1	1.9
GPC5C	<i>G-protein coupled receptor family C group 5 member C</i>	GPRC5C pS383	6.9	1.7
HMOX1	<i>Heme oxygenase 1</i>	HMOX1 pS229	-1.4	-0.3
HNRPU	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</i>	HNRNPU pS66	1.3	-0.4
HP1B3	<i>Heterochromatin protein 1-binding protein 3</i>	HP1BP3 pS70	-1.7	0.3
HXC10	<i>Homeobox protein Hox-C10</i>	HOXC10 pS189	2.6	0.6
ITPI2	<i>Protein ITPRID2</i>	SSFA2 pT1163 SSFA2 pS1165	1.9	-0.9
K2C8	<i>Keratin, type II cytoskeletal 8</i>	KRT8 pT413	2.4	0.8
K2C8	<i>Keratin, type II cytoskeletal 8</i>	KRT8 pM406 KRT8 pS410	3.0	1.5
LAR4B	<i>La-related protein 4B</i>	LARP4B pS585	6.2	1.7
LARP1	<i>La-related protein 1</i>	LARP1 pS580	4.4	2.5
LIMD1	<i>LIM domain-containing protein 1</i>	LIMD1 pR230 LIMD1 pS233	5.5	3.9
LIPB1	<i>Liprin-beta-1</i>	PPFIBP1 pS1003	-1.4	-0.3
LMNA	<i>Prelamin-A/C</i>	LMNA pS651	4.9	2.7

MYO15	<i>Unconventional myosin-XV</i>	MYO15A pS876	3.4	0.0
NASP	<i>Nuclear autoantigenic sperm protein</i>	NASP pS397	6.6	5.3
NUMB	<i>Protein numb homolog</i>	NUMB pS247 NUMB pT250	6.1	4.2
NUP50	<i>Nuclear pore complex protein Nup50</i>	NUP50 pT228	1.4	0.3
NXP20	<i>Protein NOXP20</i>	FAM114A1 pS261	5.3	3.1
P121A	<i>Nuclear envelope pore membrane protein POM 121</i>	POM121 pS378 POM121C pS355	7.5	5.2
P121A	<i>Nuclear envelope pore membrane protein POM 121</i>	POM121 pT693 POM121C pT670	1.5	0.3
PP1RB	<i>E3 ubiquitin-protein ligase PPP1R11</i>	PPP1R11 pM124 PPP1R11 pT102	1.3	0.1
PPR18	<i>Phostensin</i>	PPP1R18 pS479	3.6	1.7
PTN3	<i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 3</i>	PTPN3 pS357	1.3	-0.5
PUR2	<i>Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3</i>	GART pS796	5.4	4.1
RBGPR	<i>Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit</i>	RAB3GAP2 pS450	10.0	8.3
SCAM2	<i>Secretory carrier-associated membrane protein 2</i>	SCAMP2 pS319	8.7	7.7
SIK3	<i>Serine/threonine-protein kinase SIK3</i>	SIK3 pK863 SIK3 pS866	2.4	0.5
SIN3A	<i>Paired amphipathic helix protein Sin3a</i>	SIN3A pS10	5.6	0.0
SIN3A	<i>Paired amphipathic helix protein Sin3a</i>	SIN3A pY13	5.3	0.0
SNX17	<i>Sorting nexin-17</i>	SNX17 pS440	3.9	0.5
SNX2	<i>Sorting nexin-2</i>	SNX2 pS117	6.3	3.1
SON	<i>Protein SON</i>	SON pS1670	7.9	6.5
SPE39	<i>Spermatogenesis-defective protein 39 homolog</i>	VIPAS39 pS126	1.3	-0.1
SPN90	<i>NCK-interacting protein with SH3 domain</i>	NCKIPSD pS122	7.2	5.0
SRRM2	<i>Serine/arginine repetitive matrix protein 2</i>	SRRM2 pS24	4.8	2.6
SRRM2	<i>Serine/arginine repetitive matrix protein 2</i>	SRRM2 pM2268 SRRM2 pS2272	1.4	0.4
STAU2	<i>Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2</i>	STAU2 pM444 STAU2 pS455	4.7	0.0
STIM2	<i>Stromal interaction molecule 2</i>	STIM2 pS678	2.0	-0.1
T2FA	<i>General transcription factor IIF subunit 1</i>	GTF2F1 pS442 GTF2F1 pT445	1.9	0.6
TF3C4	<i>General transcription factor 3C polypeptide 4</i>	GTF3C4 pS611	3.5	0.0
TIF1B	<i>Transcription intermediary factor 1-beta</i>	TRIM28 pM550 TRIM28 pT531	3.9	1.6
TIF1B	<i>Transcription intermediary factor 1-beta</i>	TRIM28 pT536	4.8	2.5
TIF1B	<i>Transcription intermediary factor 1-beta</i>	TRIM28 pT531	4.7	2.4
TNS2	<i>Tensin-2</i>	TNS2 pS832	2.1	0.8

UGDH	<i>UDP-glucose 6-dehydrogenase</i>	UGDH pS476	5.1	2.8
VP26B	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 26B</i>	VPS26B pS302	6.0	4.1
VP26B	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 26B</i>	VPS26B pS304	3.9	2.3
WNK1	<i>Serine/threonine-protein kinase WNK1</i>	WNK1 pS170	1.7	-0.4
WNK1	<i>Serine/threonine-protein kinase WNK1</i>	WNK1 pS170	1.4	-0.4
WNK1	<i>Serine/threonine-protein kinase WNK1</i>	WNK1 pS2370	1.9	0.6
YAP1	<i>Transcriptional coactivator YAP1</i>	YAP1 pM404 YAP1 pS400	4.4	0.0
YAP1	<i>Transcriptional coactivator YAP1</i>	YAP1 pT376	3.9	0.3
YAP1	<i>Transcriptional coactivator YAP1</i>	YAP1 pS397	5.0	2.2
YAP1	<i>Transcriptional coactivator YAP1</i>	YAP1 pS400	2.8	0.8
YAP1	<i>Transcriptional coactivator YAP1</i>	YAP1 pS127 YAP1 pS128	1.6	0.4
ZCHC8	<i>Zinc finger CCHC domain-containing protein 8</i>	ZCCHC8 pS636	3.8	0.0

PTM: modificación postraduccional; FC1: “*fold change*” de fosfopéptidos en H₂O₂ respecto al control.; FC2: “*fold change*” de fosfopéptidos en H₂O₂ + PJ34 respecto al control.

Tabla VI

Uniprot ID	Nombre de la proteína	Gene ID y sitio de PTM	FC1	FC2
ABCF3	<i>ATP-binding cassette sub-family F member 3</i>	ABCF3 pS79	3.5	2.3
ADCY9	<i>Adenylate cyclase type 9</i>	ADCY9 pT686 ADCY9 pS688	2.3	-1.0
AKP13	<i>A-kinase anchor protein 13</i>	AKAP13 pS1365	3.0	1.1
ANXA2	<i>Annexin A2</i>	ANXA2 pY24 ANXA2P2 pY24	1.0	-0.2
BAZ1A	<i>Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A</i>	BAZ1A pT731	-1.1	0.1
CA229	<i>Putative uncharacterized protein C1orf229</i>	C1orf229 pS107 C1orf229 pT111	-7.3	-1.0
CBPD	<i>Carboxypeptidase D</i>	CPD pT1368	-2.4	-0.6
CBY1	<i>Protein chibby homolog 1</i>	CBY1 pS18	1.3	-0.5
CTND1	<i>Catenin delta-1</i>	CTNND1 pT61	1.6	-0.7
DIDO1	<i>Death-inducer obliterator 1</i>	DIDO1 pS1456 DIDO1 pS1471	7.2	0.0
DOCK7	<i>Dedicator of cytokinesis protein 7</i>	DOCK7 pS927	1.5	0.0
EF1D	<i>Elongation factor 1-delta</i>	EEF1D pT147	-1.6	-0.4
EF1D	<i>Elongation factor 1-delta</i>	EEF1D pS162	-1.6	-0.5
ELF2	<i>ETS-related transcription factor Elf-2</i>	ELF2 pT421	4.0	1.9
F208B	<i>Protein FAM208B</i>	FAM208B pR1217 FAM208B pS1226	9.1	7.4
FA76B	<i>Protein FAM76B</i>	FAM76B pS237	7.2	0.0
FGD1	<i>FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 1</i>	FGD1 pS48	1.8	0.7
HAUS6	<i>HAUS augmin-like complex subunit 6</i>	HAUS6 pS556	2.1	-0.9
HUWE1	<i>E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1</i>	HUWE1 pS1395	-4.7	-0.2
HXC10	<i>Homeobox protein Hox-C10</i>	HOXC10 pS189	2.6	0.7
ITPI2	<i>Protein ITPRID2</i>	SSFA2 pT1163 SSFA2 pS1165	1.9	-0.5
KDM2A	<i>Lysine-specific demethylase 2A</i>	KDM2A pS28	1.6	0.2
KDM2A	<i>Lysine-specific demethylase 2A</i>	KDM2A pS28	1.5	0.0
LIPB1	<i>Liprin-beta-1</i>	PPFIBP1 pS1003	-1.4	-0.4
LMNA	<i>Prelamin-A/C</i>	LMNA pS651	4.9	2.0
LYRIC	<i>Protein LYRIC</i>	MTDH pS308	-1.3	-0.3
MYO15	<i>Unconventional myosin-XV</i>	MYO15A pS876	3.4	0.0

NOLC1	<i>Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1</i>	NOLC1 pS83 NOLC1 pS91	-2.0	-0.2
NPM	<i>Nucleophosmin</i>	NPM1 pT78	1.5	-0.8
NU155	<i>Nuclear pore complex protein Nup155</i>	NUP155 pS994	1.5	-1.0
NUCL	<i>Nucleolin</i>	NCL pM175 NCL pS145	-1.2	0.4
NUCL	<i>Nucleolin</i>	NCL pS145	-1.5	-0.2
NUMB	<i>Protein numb homolog</i>	NUMB pS247 NUMB pT250	6.1	4.9
PDE8A	<i>High affinity cAMP-specific and IBMX-insensitive 3',5'-cyclic phosphodiesterase 8A</i>	PDE8A pT388 PDE8B pT448	7.4	4.5
PGRC2	<i>Membrane-associated progesterone receptor component 2</i>	PGRMC2 pT211	-1.6	0.2
PGRC2	<i>Membrane-associated progesterone receptor component 2</i>	PGRMC2 pY210	-2.6	0.2
PHAG1	<i>Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains 1</i>	PAG1 pS353	2.9	-1.7
PIGB	<i>GPI mannosyltransferase 3</i>	PIGB pS39	-3.9	0.2
PLCL2	<i>Inactive phospholipase C-like protein 2</i>	PLCL2 pM127 PLCL2 pS123	-1.2	0.0
QRIC1	<i>Glutamine-rich protein 1</i>	QRICH1 pS343	1.2	-0.4
QRIC1	<i>Glutamine-rich protein 1</i>	QRICH1 pY337	1.2	-0.4
QRIC1	<i>Glutamine-rich protein 1</i>	QRICH1 pT347	1.2	-0.2
RNZ2	<i>Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2</i>	ELAC2 pS199	-2.1	-0.3
SBNO1	<i>Protein strawberry notch homolog 1</i>	SBNO1 pS837	5.5	3.4
SET1A	<i>Histone-lysine N-methyltransferase SETD1A</i>	SETD1A pT241	6.3	3.6
SET1A	<i>Histone-lysine N-methyltransferase SETD1A</i>	SETD1A pY227	6.3	3.6
SF3B1	<i>Splicing factor 3B subunit 1</i>	SF3B1 pT341	-2.8	-0.2
SIK3	<i>Serine/threonine-protein kinase SIK3</i>	SIK3 pK863 SIK3 pS866	2.4	-0.8
SON	<i>Protein SON</i>	SON pS1670	7.9	5.2
SPE39	<i>Spermatogenesis-defective protein 39 homolog</i>	VIPAS39 pS126	1.3	0.3
SRPK2	<i>SRSF protein kinase 2</i>	SRPK2 pS494	1.4	0.0
STA5A	<i>Signal transducer and activator of transcription 5A</i>	STAT5A pS127	1.7	0.4
STIM2	<i>Stromal interaction molecule 2</i>	STIM2 pS678	2.0	0.4
SYMPK	<i>Symplekin</i>	SYMPK pM509 SYMPK pS494	4.5	2.9
TEX2	<i>Testis-expressed protein 2</i>	TEX2 pS194	3.6	1.3
TGIF1	<i>Homeobox protein TGIF1</i>	TGIF1 pS140	-3.3	-1.3

TIF1B	<i>Transcription intermediary factor 1-beta</i>	TRIM28 pT611 TRIM28 pS612	1.1	-0.1
TM10A	<i>tRNA methyltransferase 10 homolog A</i>	TRMT10A pS318	-3.6	0.5
TP53B	<i>TP53-binding protein 1</i>	TP53BP1 pT1341	2.0	-0.3
TPX2	<i>Targeting protein for Xklp2</i>	TPX2 pT72	-2.6	-1.6
TR150	<i>Thyroid hormone receptor-associated protein 3</i>	THRAP3 pS315 THRAP3 pS320	-1.1	0.3
TR150	<i>Thyroid hormone receptor-associated protein 3</i>	THRAP3 pT324 THRAP3 pY328	-1.1	0.3
UBQL4	<i>Ubiquilin-4</i>	UBQLN4 pS315	6.3	4.6
UGDH	<i>UDP-glucose 6-dehydrogenase</i>	UGDH pS476	5.1	0.3
WNK1	<i>Serine/threonine-protein kinase WNK1</i>	WNK1 pS170	1.4	0.2
WWC3	<i>Protein WWC3</i>	WWC3 pS451	1.5	0.4
YAP1	<i>Transcriptional coactivator YAP1</i>	YAP1 pS397	5.0	3.3
YAP1	<i>Transcriptional coactivator YAP1</i>	YAP1 pM404 YAP1 pS400	4.4	1.7
YAP1	<i>Transcriptional coactivator YAP1</i>	YAP1 pS400	2.8	1.7
YAP1	<i>Transcriptional coactivator YAP1</i>	YAP1 pT141 YAP1 pT143 YAP1 pT145	2.2	1.1
ZCHC8	<i>Zinc finger CCHC domain-containing protein 8</i>	ZCCHC8 pS636	3.8	0.0
ZMYM4	<i>Zinc finger MYM-type protein 4</i>	ZMYM4 pS935	-4.3	0.7
ZN638	<i>Zinc finger protein 638</i>	ZNF638 pS1400	-1.8	0.4

PTM: modificación postraduccional; FC1: “fold change” de fosfopéptidos en H₂O₂ respecto al control; FC2: “fold change” de fosfopéptidos en H₂O₂ + NAD⁺ respecto al control.

Tabla VII

Uniprot ID	Nombre de la proteína	Gene ID y sitio de PTM	FC1	FC2
AAK1	<i>AP2-associated protein kinase 1</i>	AAK1 pS652	2.8	0.7
ACACA	<i>Acetyl-CoA carboxylase 1</i>	ACACA pM79 ACACA pS80	3.7	2.2
ACACA	<i>Acetyl-CoA carboxylase 1</i>	ACACA pS77	3.1	1.8
ADNP	<i>Activity-dependent neuroprotector homeobox protein</i>	ADNP pS711	-2.9	-1.6
AHNK2	<i>Protein AHNAK2</i>	AHNAK2 pS1913	3.3	2.7
AKA11	<i>A-kinase anchor protein 11</i>	AKAP11 pT1485	2.9	2.5
ANKS3	<i>Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 3</i>	ANKS3 pS416	-3.5	-1.7
BCLF1	<i>Bcl-2-associated transcription factor 1</i>	BCLAF1 pY284	6.2	3.0
BCLF1	<i>Bcl-2-associated transcription factor 1</i>	BCLAF1 pS290	3.4	0.0
CAMP2	<i>Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 2</i>	CAMSAP2 pS1321	-1.1	0.9
CDR2L	<i>Cerebellar degeneration-related protein 2-like</i>	CDR2L pT320	2.3	1.3
CHSP1	<i>Calcium-regulated heat stable protein 1</i>	CARHSP1 pS41	4.1	-5.5
CNTP4	<i>Contactin-associated protein-like 4</i>	CNTNAP4 pS(517-524)	-2.6	-0.6
CR025	<i>Uncharacterized protein C18orf25</i>	C18orf25 pS39	5.5	3.6
DCLK2	<i>Serine/threonine-protein kinase DCLK2</i>	DCLK2 pK352 DCLK2 pS355	-7.8	0.1
DHX57	<i>Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57</i>	DHX57 pS127	-1.7	-0.4
DTL	<i>Denticleless protein homolog</i>	DTL pS490	-2.7	-1.8
EHBP1	<i>EH domain-binding protein 1</i>	EHBP1 pT427 EHBP1 pS428	1.9	1.5
FA76B	<i>Protein FAM76B</i>	FAM76B pS237	5.0	3.7
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>	FASN pS1174	4.6	3.2
HECD1	<i>E3 ubiquitin-protein ligase HECTD1</i>	HECTD1 pS1387	2.9	3.3
K2C7	<i>Keratin, type II cytoskeletal 7</i>	KRT7 pS71	1.2	1.5
LASP1	<i>LIM and SH3 domain protein 1</i>	LASP1 pS61	-1.1	0.0
M3K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>	MAP3K1 pS1018	4.7	1.0
MAGB2	<i>Melanoma-associated antigen B2</i>	MAGEB2 pS77	-1.7	-0.3
MAP1B	<i>Microtubule-associated protein 1B</i>	MAP1B pS614	-1.3	0.5
MPRIP	<i>Myosin phosphatase Rho-interacting protein</i>	MPRIP pS977	2.5	2.2
MYH9	<i>Myosin-9</i>	MYH9 pS1943	-1.5	0.4

NOLC1	<i>Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1</i>	NOLC1 pS504	-2.4	-0.7
NPM	<i>Nucleophosmin</i>	MAP4K3 pS616 NPM1 pS137	-2.6	-0.6
NU153	<i>Nuclear pore complex protein Nup153</i>	NUP153 pS1463	-2.2	-0.6
NUMA1	<i>Nuclear mitotic apparatus protein 1</i>	NUMA1 pT1854	6.1	1.4
PAK4	<i>Serine/threonine-protein kinase PAK 4</i>	PAK4 pS148	-6.6	-3.1
PARP1	<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 1</i>	PARP1 pS257	4.6	3.7
PDE3A	<i>cGMP-inhibited 3',5'-cyclic phosphodiesterase A</i>	PDE3A pS428	-2.0	-0.8
PEAK1	<i>Inactive tyrosine-protein kinase PEAK1</i>	PEAK1 pT860	5.7	4.3
PHIP	<i>PH-interacting protein</i>	PHIP pT1482	-1.4	1.7
PYRG2	<i>CTP synthase 2</i>	CTPS2 pS571	1.3	-0.6
RL1D1	<i>Ribosomal L1 domain-containing protein 1</i>	RSL1D1 pS421 RSL1D1 pS427	-1.6	-0.6
RRP15	<i>RRP15-like protein</i>	RRP15 pS227	-2.0	-0.4
RU2A	<i>U2 small nuclear ribonucleoprotein A'</i>	SNRPA1 pS178	-2.0	-0.3
SPF30	<i>Survival of motor neuron-related-splicing factor 30</i>	SMNDC1 pS201	-1.7	-0.7
SRGP1	<i>SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 1</i>	SRGAP1 pS1032	2.7	-1.9
STIM2	<i>Stromal interaction molecule 2</i>	STIM2 pS661	4.5	2.3
TAGL2	<i>Transgelin-2</i>	TAGLN2 pS163	4.0	3.0
TAGL2	<i>Transgelin-2</i>	TAGLN2 pS185 TAGLN3 pS185	2.9	0.0
UBP2L	<i>Ubiquitin-associated protein 2-like</i>	UBAP2L pS859	1.7	0.7
UGDH	<i>UDP-glucose 6-dehydrogenase</i>	UGDH pS476	8.6	6.4
YAP1	<i>Transcriptional coactivator YAP1</i>	YAP1 pT376	3.9	1.1
ZFAN5	<i>AN1-type zinc finger protein 5</i>	ZFAND5 pS48 ZFAND5 pT52	3.4	0.0
ZN106	<i>Zinc finger protein 106</i>	ZNF106 pS864	-2.1	-0.4
ZN106	<i>Zinc finger protein 106</i>	ZNF106 pS452	3.4	9.9

PTM: modificación postraduccional; FC1: “fold change” de fosfopéptidos en siNT + H₂O₂ respecto al control; FC2: “fold change” de fosfopéptidos en siPARP-1 + H₂O₂ respecto al control.