CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS CELULARES DERIVADOS DE PACIENTES CON SÍNDROME PROGEROIDE NEONATAL, UN NUEVO MODELO PARA EL ESTUDIO DE PROCESOS RELACIONADOS CON EL ENVEJECIMIENTO HUMANO.

NELSON RAMIREZ
Biólogo, Universidad Nacional de Colombia, 2002.

Proyecto de Tesis presentado como requisito para el grado de Master in Science

MAESTRIA EN NEUROCIENCIAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

DIRECTOR:
HUMBERTO ARBOLEDA G. MD, M.Sc.
CO-DIRECTOR
GONZALO ARBOLEDA MD. Ph.D.

BOGOTÁ, NOVIEMBRE DE 2009

CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS CELULARES DERIVADOS DE PACIENTES CON SÍNDROME PROGEROIDE NEONATAL, UN NUEVO MODELO PARA EL ESTUDIO DE PROCESOS RELACIONADOS CON EL ENVEJECIMIENTO HUMANO.

Nelson J. Ramírez

Universidad Nacional de Colombia. 2009

El síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch (SWR) es considerado un desorden genético extremadamente raro caracterizado por un envejecimiento evidente al nacimiento con retardo en el crecimiento antes y después del parto, deficiencia o ausencia de la capa de grasa subcutánea; piel delgada, frágil y arrugada y en la mayoría de los casos sucede el deceso durante los primeros meses de vida. Adicionalmente estos individuos poseen alteraciones bioquímicas donde la hipertrigliciridemia, hipercolesterolemia e hiperinsulinismo son los desordenes más comunes.

La etiología del SWR es desconocida, aunque diferentes autores están de acuerdo en un patrón de herencia autosómico recesivo de la anomalía genética responsable. Algunos estudios han evaluado características celulares relacionadas indirectamente con el proceso de envejecimiento en cultivos primarios de pacientes con SWR. Entre estos estudios se encuentra uno de longitud telomérica en un posible caso de SWR el cual no mostró diferencias tomando como referencia controles normales. Estudios de ligamiento recientes en otro síndrome progeroide, el síndrome de Hutchinson-Gilford (SHG), han conducido a la identificación de mutaciones en el gen LAMINA A/C (LMN A/C). Sin embargo, no se han encontrado alteraciones en estudios parciales de este gen en cultivos primarios provenientes de pacientes con SWR. Estos resultados sugieren que el gen responsable del SWR podría ser diferente al causante del SHG, quizás ubicándose a otro nivel dentro de esta misma vía o haciendo parte de una vía totalmente distinta.

Las alteraciones metabólicas reportadas para el SWR tienen una relevancia crucial. La hiperinsulinemia es especialmente importante ya que en varios organismos modelo que

van desde nematodos hasta ratones se ha encontrado una relación entre los niveles disminuidos de insulina y la longevidad, descubriendo un importante papel de las hormonas en la regulación del envejecimiento.

Este estudio pretendió determinar las características principales de cultivos primarios de fibroblastos derivados de dos pacientes clínicamente diagnosticados con SWR, representadas en la determinación de la curva de crecimiento del cultivo y del proceso de senescencia celular *in vitro*.

Adicionalmente se pretendió recopilar evidencia morfométrica del fenotipo celular, específicamente del núcleo, en donde se sugiere que la causa que explica la aparición de este síndrome es distinta a la que determina el SHG. El SHG produce un fenotipo progeroide postnatal en edades tempranas y a nivel celular se ha caracterizado por una morfología anormal (lobulada) de los núcleos debido a la producción de una forma alterada de la proteína lamina A denominada progerina. Los estudios morfométricos fueron complementados por análisis de la presencia de la proteína anómala (progerina) en los distintos tipos celulares.

Palabras Clave

Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch, Envejecimiento, Senescencia, lamina A, Modelos Progeroides.

Abreviaturas

ADLD	→Leucodistrofia Autosómica Dominante Autosomal Dominant Leukodystrophy
ATM	→Síndrome de ataxia telangiectasia mutado
APL	→Lipodistrofia Parcial Adquirida Acquired Partial Lipodystrophy
CPN	→Complejos de Poro Nuclear
CTRL1	→Control sano participante en este estudio de género femenino
CTRL2	→Control sano participante en este estudio de género masculino
DAPI	→4,6-diamidino-2-phenylindole
DSBs	→Rupturas de doble hebra en la cadena de ADN Double-Strand Breaks
H3K9Me	→Histona H3 metilada en la lisina 9
kuk	→Gen kugelkern de *Drosophilla melanogaster*
LINC	→LInker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton
LMN A/C	→Gen que codifica las proteínas lamina A y lamina C
lmn A/C	→Proteína Lamina A/C
NDP	→Nivel de Doblaje Poblacional
NDPA	→Nivel de Doblaje Poblacional Acumulado
OMIM	→Online Mendelian Inheritance in Man
PBS	→Solución tampón salina de fosfatos Phosphate Buffer Saline
RER	→Retículo Endoplasmático Rugoso
ROS	→Especies reactivas de oxigeno Reactive Oxigen Species
SAß-gal	→ß-galactosidasa asociada senescencia Sescence-Asociated ß-galactosidase
SAHF	→ Foci de heterocromatina asociados a senescencia. Senesence Asociated Heterocromatin Foci
SDGV	→Desviación estándar de valores grises Standar Deviation of Gray Values
SWR	→Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch
SHG	→Síndrome de Hutchinson-Gilford
STASIS	→Senescencia inducida por estrés o por señalización aberrante

Stress or Aberrant Signaling Induced Senescence

TDP →Tiempo de doblaje poblacional
WR1 →Paciente con SWR participante en este estudio de género femenino
WR2 →Paciente con SWR participante en este estudio de género masculino
X-Gal →5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-galactoside
ZMPSTE24 → Gen que codifica la metaloproteinasa de zinc ste24
Zmpste24 → Metaloproteinasa de zinc ste24

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION…… 8

1.1 Síndromes Progeroides como modelos de envejecimiento humano…… 8

1.2 Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch (SWR)…… 9

1.3 Aspectos genéticos y moleculares del SWR…… 11

1.4 Aspectos celulares del SWR…… 11

1.5 Senescencia replicativa y envejecimiento…… 12

2. JUSTIFICACION…… 15

3. OBJETIVOS…… 16

3.1 Objetivo General…… 16

3.2 Objetivos Específicos…… 16

4. CAPITULO 1 : FIBROBLASTOS DERIVADOS DE PACIENTES CON SINDROME DE WIEDEMANN-RAUTENSTRAUCH PRESENTAN ALTERACIONES EN LA DINAMICA DE CRECIMIENTO…… 17

4.1 Razonamiento…… 17

4.2 Fundamentos Teóricos…… 18

4.2.1 Proliferación celular…… 18

4.2.2 Senescencia celular…… 20

4.3 Resultados…… 22

4.3.1 Curvas de crecimiento…… 22

4.3.2 Doblajes poblacionales…… 24

4.3.3 Senescencia celular…… 25

4.4 Discusión…… 29

4.5 Materiales y Métodos…… 30

4.5.1 Células y condiciones de cultivo…… 30

4.5.2 Doblaje poblacional y crecimiento de cultivos primarios…… 31

4.5.3 Ensayos de Senescencia…… 32

4.5.4 Inmunofluorescencia SAHF…… 33

4.5.5 Análisis estadístico…… 33

5. CAPITULO 2: ALTERACIONES EN LA MORFOLOGIA Y TAMAÑO DEL NUCLEO EN PACIENTES CON SWR…… 35

5.1 Razonamiento…… 35

5.2 Fundamentos Teóricos…….. 36
5.3 Resultados…… 38
5.4 Discusión…… 42
5.5 Materiales y Métodos……. 45
5.5.1 Inmunofluorescencia…….. 45
5.5.2 Inmunoblotting…….…. 47
5.5.3 Análisis Estadístico…… 48
6. CAPITULO 3: RESUMEN, CONCLUSIONES E HIPOTESIS…..…….. 50
6.1 Resumen de Resultados……. 51
6.2 Conclusiones …… 53
6.3 Hipótesis…… 54
7. BIBLIOGRAFIA …… 55
8. ANEXO: Consentimiento Informado…….…… 61

INTRODUCCION

1.1 Síndromes Progeroides como modelos de envejecimiento humano.

El proceso de envejecimiento es considerado como la perdida progresiva de función acompañada por la disminución en la fertilidad e incremento en la mortalidad con el paso del tiempo (Kirkwood & Austad, 2000).

Diferentes teorías evolutivas se han generado para tratar de entender el significado de este mecanismo: teoría de acumulación de mutaciones, (Medawar, 1952), teoría del pleiotropismo antagónico (Williams, 1957), teoría del soma dispensable (Kirkwood, 1996); todas ellas apuntan a la existencia de un conjunto articulado de mutaciones y polimorfismos que pueden tener como blanco potencial uno o varios fenotipos senescentes.

Síndromes Progeroides como modelos de envejecimiento humanoDebido al interés y las necesidades de entender el proceso de envejecimiento humano se han generado diversas maneras para abordar el estudio de los mecanismos que subyacen el envejecimiento en nuestra especie. El punto de partida para este tipo de estudio comienza con la identificación de modelos adecuados que se acerquen a lo que esta sucediendo en el fenómeno natural. Diferentes investigadores han descubierto algunos elementos en el proceso de envejecimiento-longevidad usando organismos como invertebrados o modelos murinos (Johnson et al., 1999; Hekimi & Guarente 2003; Murga, et al 2009). Las conclusiones que de allí se derivan pueden tener una limitada aplicación a los seres humanos debido a las características biológicas diferenciales que poseemos y que llevan a pensar en un proceso más propio de cada especie; alejándonos inclusive, de aquellos organismos que filogenéticamente parecen estar mas cercanos a nosotros. En efecto, hoy en día es aceptado que los cambios relacionados con la edad son resultados no programados de la selección estricta sobre los mecanismos que aseguran el éxito reproductivo temprano (Kipling et. al., 2004), y por lo tanto el envejecimiento parece ser ejemplo de un fenómeno biológico en el cual hay un nivel bajo de conservación de mecanismos entre diversas especies de metazoos.

¿Existe otra vía para el estudio de los procesos relacionados con el envejecimiento humano? Ciertamente hay otras alternativas que parecen salvar el problema de la pertinencia del modelo. Existen en nuestra especie algunas entidades patológicas que han sido identificadas por sus características fisiológicas como enfermedades relacionadas con procesos de envejecimiento. Estas pueden ser clasificadas como síndromes progeroides unimodales si afectan un solo órgano, sistema o tejido o síndromes progeroides segmentales si afectan un conjunto de estos (Martin, 2005). De especial interés son las patologías pertenecientes al segundo grupo ya que en contraste a lo determinado por las teorías evolutivas, son originadas por mutaciones en genes únicos.

Es necesario aclarar que los síndromes progeroides no deben ser entendidos como copias fieles del proceso de envejecimiento normal, ya que este último es caracterizado por un alto grado de heterogeneidad intra-especie. Esto sugiere que estas entidades pueden aportar al entendimiento de los procesos relacionados con el envejecimiento en la identificación de genes pertenecientes a vías que han evolucionado para mantener un alto grado de integridad somática bajo condiciones ambientales adversas, especialmente en la etapa posreproductiva (Kudlow et al, 2007). Así, es por esta razón que cualquier observación derivada de estos síndromes debe ser contextualizada en el marco de teorías diseñadas para explicar el funcionamiento del proceso de envejecimiento normal.

1.2 Síndrome de Wiedemann Rautenstrauch (SWR)

Los síndromes de Werner, Hutchinson Gilford, Cockayne, Rothmund-Thompson, Bloom, xeroderma pigmentosa y tricotiodistrofia hacen parte de los síndromes progeroides segmentales mas estudiados (revisados por Puzianowska-Kuznick & Kuznickic, 2005 y Navarro et al, 2006). En cada uno de estos se han identificado cambios monogenéticos que influyen en la aparición de fenotipos senescentes que se hacen evidentes en diferentes etapas del desarrollo de individuos normales, recalcando su utilidad como modelos de investigación sobre envejecimiento.

El síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch (SWR) (OMIM: 264090) es otro desorden que pertenece al grupo de progerias segmentales y de cuya etiología se conoce muy poco. La descripción de estos pacientes fue propuesta por Wiedemann a finales de lo 70s (Wiedemann, 1979). Clínicamente el SWR se caracteriza por presentar rasgos al

nacimiento que semejan el envejecimiento humano, lo que supone un aspecto interesante que ha llevado a diferenciarlo de los demás síndromes progeroides. Particularmente los pacientes presentan al nacimineto corta estatura, bajo peso, rostro envejecido, seudohidrocefalia, suturas abiertas, alteración generalizada de la osificación, dentición neonatal, atrofia de tejido celular subcutáneo, depósitos paradójicos de grasa en los gluteos, alteraciones bioquímicas particularmente disfunción endocrina (Wiedemann, 1979; Rautenstrauch et al., 1994; Thorey et al., 2003; ver figura 1). La expectativa media de supervivencia es de 7 meses. De los alrededor de 20 casos reportados en la literatura solo 6 casos han mostrado una supervivencia mas allá de los 15 meses, llegando incluso a superar en pocos casos la primera década de vida. De estos casos con larga vida dos se encuentran en Colombia (Arboleda & Arboleda, 2005).

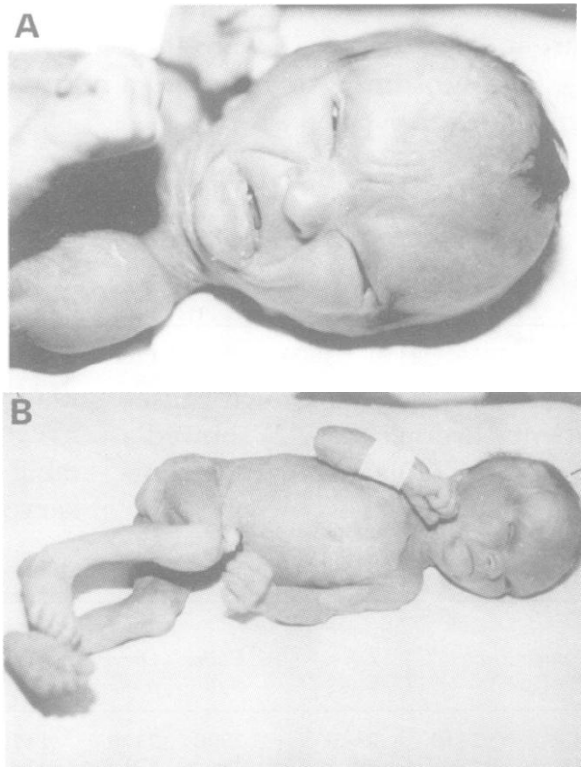


Figura 1. Apariencia general de un paciente recién nacido con síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch. Tomado de Arboleda et al, 1997.

1.3 Aspectos genéticos y moleculares del SWR

La etiología del SWR es desconocida. Diferentes autores están de acuerdo en un patrón de herencia autosómico recesivo de la anomalía genética responsable basados principalmente en reportes de consanguinidad entre los padres (Devos et al., 1981; Arboleda et al., 1997), reportes de hermanos afectados (Rautenstrauch & Snigula., 1977; Castineyra et al., 1992; Arboleda et al., 1997, Pivnick et al., 2000) y en la procedencia de los padres de la misma área geográfica (Hou & Wang, 1995; Bitoun et al., 1995).

Estudios de ligamiento en el síndrome de Hutchinson-Gilford (SHG), caracterizado por la aparición de rasgos de envejecimiento prematuro a los pocos años de vida, han conducido a la identificación de mutaciones en el gen Lámina A/C (LMN A/C) (Eriksson et al., 2003; De Sandre-Giovannoli et al., 2003), sugiriendo un papel de proteínas de la lámina nuclear en los procesos de envejecimiento. Sin embargo, estudios recientes realizados por nuestro grupo (Morales et al., 2009) analizando las secuencias codificantes del gen en 4 pacientes SWR no encuentran alteraciones en este gen. De la misma forma estudios parciales del gen LMN A/C, utilizando cultivos primarios provenientes de pacientes con SWR no encuentran cambios (Cao & Hegele, 2003). Estos estudios sugieren que el gen responsable del SWR podría ser diferente al causante del SHG, quizás ubicándose a otro nivel dentro de esta misma vía o haciendo parte de una vía totalmente distinta (Arboleda, et al., 2007).

1.4 Aspectos celulares del SWR

Entre los estudios a nivel celular de SWR, Rautenstrauch y Snigula (1977) reportan cultivos primarios de una paciente de 8 meses de edad. Los autores comentan sobre un crecimiento lento de los fibroblastos de la paciente comparados con cultivos paralelos de fibroblastos de la madre y de embriones humanos sin la anomalía. Al mismo tiempo reportan un crecimiento constante hasta el pasaje 6 alcanzado a la fecha de publicación del estudio.

Este mismo grupo realizó un estudio con fibroblastos de la misma paciente provenientes de biopsias tomadas a los 4 años de edad y a los 16 años de edad (Beavan et al., 1993), complementando los experimentos con células derivadas de otro paciente reportado por Devos y colegas (1981). El objetivo de este nuevo trabajo fue identificar si existía alguna

alteración en la producción de proteoglicanos en los fibroblastos SWR como se observa en otros síndromes que presentan alteraciones en tejidos derivados del mesodermo (Määttä et al., 1994; Zanotti et al., 2005; Malfait et al., 2005). Los autores demuestran una disminución en la biosíntesis de decorina (proteoglicano perteneciente a la familia de pequeños proteoglicanos condroitin/heparan sulfato ricos en leucina), en los pacientes con SWR , en un paciente con SHG y en un síndrome progeroide no clasificado.

Un tercer estudio evalúa la longitud telomérica en un posible caso de SWR, mostrando que no hay diferencias tomando como referencia controles normales (Korniszewski et al., 2001). Adicionalmente los autores hacen una correlación entre la longitud telomérica y el potencial de crecimiento *in vitro* de esta paciente, resaltando que la patogénesis molecular que subyace los signos progeroides en SWR no esta asociada con la activación de la senescencia replicativa conducida por la disminución de la longitud telomérica (Nowak et al., 2006).

1.5 Senescencia replicativa y envejecimiento

Leonard Hayflick describió en 1961 el conocido limite Hayflick, un fenómeno que observó trabajando en cultivos de fibroblastos humanos. El principio de este se resume en la idea que los fibroblastos (y por extrapolación las demás células del cuerpo) tienen un número limitado de doblajes en cultivo, hecho que se denominó senescencia replicativa y que posteriormente encontró explicación en el desgaste progresivo de los telómeros con el paso del tiempo del cultivo. La senescencia replicativa es un concepto aceptado en nuestros días a pesar de la existencia de reportes que muestran evidencia de cultivos primarios que sobrepasan el número de doblajes estimado (Tang et al., 2001; Mathon et al., 2001), sugiriendo la posibilidad de un proceso de crecimiento indefinido de las células que se ve limitado por las condiciones del cultivo (Sherr & DePinho, 2000).

En 1970 Martin y colaboradores, trabajando con fibroblastos provenientes de biopsias humanas, reportaron una asociación inversa entre el número de pases necesarios para alcanzar el limite Hayflick y la edad del donante. Este estudio se convirtió entonces en el primero en sugerir una relación directa entre el proceso de senescencia replicativa *in vitro* y el proceso de envejecimiento *in vivo*. A pesar de las importantes implicaciones de este hecho y de su aceptación por parte de la comunidad científica, un nuevo estudio en una

cohorte de personas pertenecientes al “Baltimore Longitudinal Study of Aging” en donde se llevo a cabo un control juicioso del estado de salud de los donantes y en donde se amplió el número de personas y por ende de los cultivos examinados, mostró una no asociación edad-número de doblajes en cultivo contrario a lo reportado en el estudio de Martin (Cristofalo et al., 1998). Recientemente se ha sumado evidencia a este respecto, Maier y su grupo (2007) analizan los cultivos de fibroblastos de nonagenarios y encuentran que no se observa tendencia hacia la disminución del número de pasajes en estas células.

¿Es importante entonces estudiar el proceso de senescencia *in vitro* en relación con los procesos de envejecimiento? De acuerdo a lo anteriormente expuesto no existiría una relación al menos directa entre los dos procesos, de tal manera que sería prematuro sacar conclusiones asumiendo esta relación como cierta (Rubin, 2002). Sin embargo, no se descarta a la senescencia replicativa como un modelo potencial para el proceso de senescencia celular *in vivo*, que se piensa está asociado a otros procesos relacionados con el envejecimiento y control del cáncer.

La relación senescencia celular *in vivo* – envejecimiento ha empezado a tener un mayor soporte en los últimos tiempos. La idea de co-evolución entre los tejidos con potencial replicativo en organismos adultos y el aumento en la longevidad sumado a la aparición de enfermedades relacionadas con estos tejidos (p.ej. el cancer) permitieron proponer la existencia de mecanismos que contrarrestaran los procesos patológicos cancerosos (Campisi, 2005). Así, la muerte celular y la senescencia celular se presentan como los mecanismos más importantes para el control de las divisiones indiscriminadas de las células precancerosas. Desde esta perspectiva nace la idea del costo que puede acarrear el uso de estos mecanismos de control, es decir, por una parte incrementan la longevidad controlando el cáncer (punto positivo) y por otra parte aportan a la inhibición de aquellas células que son consideradas evolutivamente importantes en la longevidad de los organismos con largos periodos de vida (punto negativo).

Los genes supresores de tumores como p16/Rb y p21/p53 empiezan a ser vistos como reguladores del proceso de senescencia celular, adicional a su función tradicional como guardianes del genoma. Los estudios mas recientes avanzan un poco mas en la relación senescencia - envejecimiento, describiendo la sobreexpresión de p16 y p21 en tejidos de

organismos adultos comparado con tejidos de organismos jóvenes (Krishnamurthy et al., 2004; Ressleer et al., 2006).

La senescencia de fibroblastos *in Vitro* parece estar acompañada de la expresión de moléculas relacionadas con la senescencia in vivo (e.g. p16) y la edad del donante, por lo que podría brindar una interpretación indirecta de lo que ocurre in vivo.

Se ha concluido que en el fenómeno de senescencia ocurren varios eventos que pueden dar cuenta del fenotipo de la célula. Entre estos, la alteración en el comportamiento de los lisosomas (Dimri et al., 1995; Katz et al., 2002;), la sobre-expresión de proteínas específicas (Krishnamurthy et al., 2004; Ressleer et al., 2006), la reacomodación del material genético en el núcleo (Zhang et al., 2007) son algunas de estas marcas. Cualquiera de ellas puede ser usada como marcador de senescencia y posiblemente existan relaciones aun no descritas entre estas.

2.0 JUSTIFICACION

A medida que la población envejece se ha vuelto imprescindible conocer las bases fundamentales del proceso de envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad.

La edad es el factor de riesgo más importante para una cantidad apreciable de enfermedades incluyendo enfermedades neurodegenerativas, cáncer, diabetes tipo II, osteoporosis y enfermedades cardiovasculares, entre otras.

Eliminar cualquiera de estas enfermedades incrementará seguramente el periodo de vida saludable de la población. Posponer o disminuir la tasa de envejecimiento retardará de la misma forma el curso de múltiples enfermedades relacionadas con la edad y dotará a la especie de incrementos considerables en el periodo de vida saludable.

Una aproximación racional para prevenir o intervenir las enfermedades relacionadas con la edad requiere de una estrategia integrada en investigación básica, que consiste en la comprensión de la etiología específica para cada una de estas enfermedades y comprensión de los mecanismos básicos del proceso de envejecimiento.

En este marco y rescatando la importancia de los síndromes progeroides como modelos en el estudio de la comprensión del envejecimiento humano, este trabajo representa una oportunidad única de ahondar en el análisis de una entidad genética como el SWR cuya etiología permanece desconocida y que por sus características tiene la potencialidad de aportar al conocimiento básico del envejecimiento en nuestra especie.

3.0 OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar las características de crecimiento, senescencia y morfología nuclear en cultivos celulares primarios de fibroblastos derivados de pacientes con Síndrome Wiedemann-Rautenstrauch.

3.2 Objetivos específicos

- Establecer las curvas de crecimiento y tiempos de doblaje de cultivos primarios de fibroblastos provenientes de explantes de piel de dos pacientes con SWR, un paciente con SHG y dos controles sanos.
- Determinar las diferencias (si existen) en el porcentaje de células senescentes entre fibroblastos derivados de pacientes con SWR y fibroblastos derivados de personas sanas en pasajes tempranos.
- Cuantificar las diferencias existentes en morfología nuclear de fibroblastos derivados de pacientes con SWR comparado con fibroblastos control y fibroblastos derivados de un paciente con SHG en pasajes tempranos.

4.0 CAPITULO 1 : LOS FIBROBLASTOS DERIVADOS DE PACIENTES CON SINDROME DE WIEDEMANN-RAUTENSTRAUCH PRESENTAN ALTERACIONES EN LA DINAMICA DE CRECIMIENTO.

4.1 Razonamiento

Los síndromes progeroides son desórdenes genéticos que semejan rasgos clínicos y moleculares del envejecimiento. El interés en estos síndromes radica en dos aspectos, en primer lugar se busca identificar los defectos hereditarios y cómo ellos llevan a producir los rasgos severos que en estos síndromes se aprecian. En segundo término se busca reconocer en las anomalías genéticas responsables aquellos genes que puedan esclarecer el funcionamiento del proceso de envejecimiento.

Entre los síndromes progeroides segmentales se destacan aquellos causados por mutaciones en procesos de reparación del ADN y aquellos que poseen defectos genéticos relacionados con el procesamiento anómalo de la proteína lámina A (Navarro et al., 2006). Entre los ejemplos clásicos de estos grupos están el síndrome de Werner y el SHG respectivamente, que corresponden a los más estudiados por ser ellos los que recapitulan mas de cerca los eventos tardíos que ocurren en el proceso de envejecimiento normal (Kudlow et al., 2007; Cox, 2009).

¿Por que hacer entonces una comparación del SWR con el SHG? El fenotipo "semejante" producido en estos dos síndromes es el principal argumento para suponer una etiología común o por lo menos procesos fisiológicos compartidos en los dos síndromes. Su apariencia física llevó incluso en los primeros reportes a clasificar a los pacientes de SWR entre el grupo de SHG (Rautenstrauch & Snigula, 1977); aunque posteriormente Wiedemann (1979) hizo un diagnóstico diferencial entre estos pacientes y aquellos con SHG, basado principalmente en su apariencia progeroide al nacimiento.

Entre los rasgos compartidos se encuentran lipodistrofia, alopecia, problemas de osificación, entre otros; todos ellos con aparición temprana (antes de los tres años de vida) en los pacientes.

Por otra parte, es bien conocido que los cultivos de fibroblastos humanos derivados de piel cesan su proliferación y exhiben senescencia después del pasaje serial de la células *in vitro*, fenómeno causado por el acortamiento telomérico y conocido con el nombre de senescencia replicativa. Las células de varios tipos de síndromes de envejecimiento como Werner, Bloom, Ataxia telangiectasia y SHG tienen una capacidad replicativa reducida *in vitro* (Blasco, 2007; Kudlow et al., 2008) .

Aunque los mecanismos que subyacen el fenómeno de senescencia replicativa aun necesitan ser disecados, estos parecen estar relacionados con diferentes desordenes humanos ligados al proceso de envejecimiento en sistemas como el inmunológico y muscular (Cox, 2009); además del papel que juega en la disminución de la capacidad replicativa de diversos síndromes de envejecimiento (Blasco, 2007; Kudlow et al., 2008).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente se buscó conocer el estado de la proliferación celular en SWR. Adicionalmente y en la eventualidad de encontrar disminución en el crecimiento celular se pretendía investigar la responsabilidad de la senescencia replicativa en esta posible disminución, todo esto mediante un paralelo con lo que ocurre con fibroblastos SHG.

4.2 Fundamentos Teóricos

4.2.1 Proliferación Celular

El ciclo de crecimiento de las células en cultivo puede ser dividido en tres fases: fase de adaptación, fase exponencial y fase estacionaria (Figura 2) (Freshney, 1994). Las fases de crecimiento exponencial y la fase estacionaria dan información esencial sobre las células en cultivo; por ejemplo, el tiempo necesario para que ocurra un doblaje en la poblacional se deduce de la fase de crecimiento exponencial ó por otra parte la densidad celular a la que las células dejan de dividirse se determina a partir de la fase estacionaria de las gráficas. De manera breve se describen a continuación cada una de las fases.

Fase de adaptación: Es el periodo que sigue al proceso de pasaje y resiembra de las células durante el cual hay poca evidencia de un incremento en el número de células. Es un periodo de adaptación durante el cual las células reemplazan elementos de la superficie celular y de la matriz extracelular perdidos durante el proceso de tripsinización.

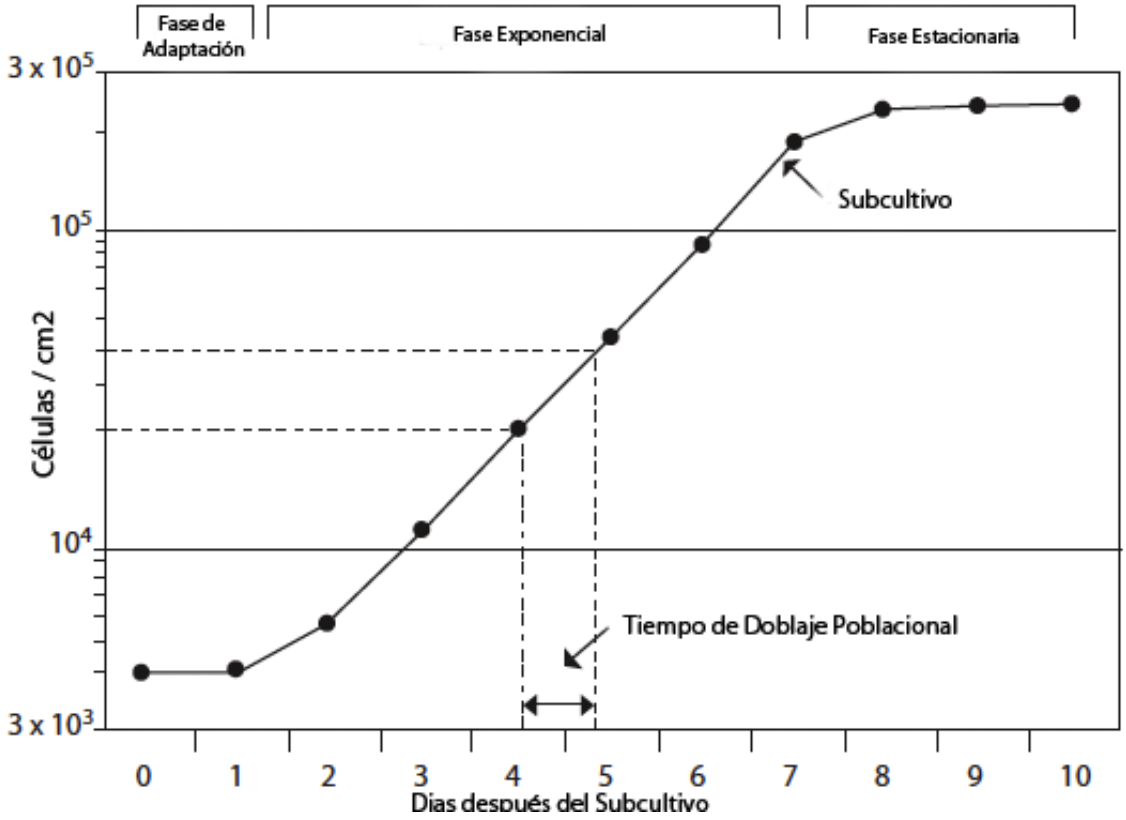


Figura 2. Curva de crecimiento celular con cada una de sus fases característica. Modificado de ATCC Cell Biology Catalog, 2007

Fase exponencial: Como su nombre lo indica es el periodo en el que ocurre un incremento exponencial en el número de células que sigue al periodo de adaptación y perdura hasta uno o dos doblajes poblacionales después de que la confluencia es alcanzada. La longitud temporal de este periodo depende de la densidad de siembra, de la tasa de crecimiento de las célula y de la densidad a la cual las células son inhibidas en su proliferación. La fracción de células en proliferación supera el 90% de las células y el cultivo se encuentra entonces en la situación mas reproducible.

Fase estacionaria: Ocurre después de la fase de crecimiento exponencial cuando el cultivo alcanza la confluencia, es decir, cuando toda la superficie del substrato ha sido ocupada y

las células están en contacto entre si. La tasa de crecimiento disminuye y en algunos casos se detiene por completo después de un par de doblajes. Otros fenómenos como la disminución de la superficie expuesta al medio o el agotamiento de los recursos en el cultivo también se asocian a la disminución de la proliferación en las células.

Adicionalmente es importante precisar algunos términos. Por ejemplo el pasaje es el número de veces que la célula ha sido subcultivada en un nuevo recipiente. En la mayoría de los casos es usual que la población en cada cultivo primario confluente se use para dar origen a dos nuevas poblaciones celulares. De esta forma con cada pasaje habrá un doblaje poblacional. El nivel de doblaje poblacional (NDP) es un número que se usa para describir estas "duplicaciones" que haya sufrido una población celular de un pasaje a otro.

Es importante aclarar que el NDP es un estimativo ya que no tiene en cuenta las células que han sufrido procesos conducentes a su muerte o aquellas que se encuentra quiescentes o senescentes. El nivel de doblaje poblacional acumulado (NDPA) totaliza la historia de doblajes poblacionales que ha sufrido el cultivo como un indicativo de su estado de proliferación/senescencia.
Por último esta el tiempo de doblaje poblacional (TDP, Figura 2) que se refiere al periodo en el que una población logra un doblaje poblacional mientras se encuentra en la fase de crecimiento exponencial.

4.2.2 Senescencia celular

Las células senescentes se caracterizan por morfologías específicas. Los fibroblastos por ejemplo adquieren formas alargadas extendidas que inclusive han sido clasificadas y caracterizadas en diferentes morfotipos (Rodemann et al., 1989). La expresión de ß-galactosidasa asociada a senescencia (Saß-gal), definida como la actividad de esta enzima a pH 6 en células senescentes, es otro de los marcadores clásicos para este fenotipo (Dimri et al., 1995). La razón de esta actividad enzimática particular parece ser el aumento en los lisosomas durante el envejecimiento replicativo (Kurz et al., 2000; Lee et al., 2006).

En el núcleo de las células, la cromatina sufre un remodelamiento drástico que se ve reflejado en la formación de dominios de heterocromatina facultativa denominados foci de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF) (Narita et al., 2003; Narita et al., 2006). A nivel morfológico los SAHF se presentan como un patrón punteado nuclear cuando las células senescentes son teñidas con DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) (Figura 3 B y C). Estos "agregados" de heterocromatina también se caracterizan por estar asociados a moléculas específicas como la histona H3 metilada en la lisina 9 (H3K9Me), proteína heterocromática 1 (HP1) y la histona H2A variante macroH2A (Zhang et al., 2007).

Desde el punto de vista funcional y como se ha comentado en la parte introductoria de este trabajo existen algunas moléculas como p16 y p21 que recientemente se han incorporado al conjunto de posibles marcadores de senescencia celular y envejecimiento.

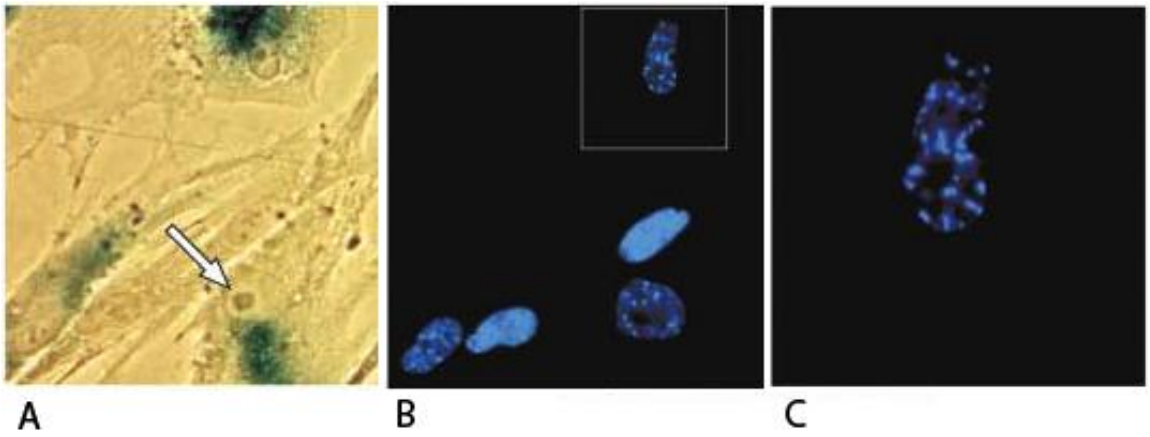


Figura 3. Foci de DNA presentes en células senescentes. En A se muestran fibroblastos IMR90 senescentes (Beta galactosidasa positivas). En B se realizó tinción DAPI a los núcleos de las células en A. En C se muestra el detalle de un núcleo (recuadro en B). Modificado de Narita et. al., 2003.

La importancia de estas es revisada por Herbig y Sedivy (2006) quienes postulan que existen al menos dos mecanismos que regulan la detención del crecimiento en cultivos de células senescentes humanas. Uno de ellos es referido como senescencia replicativa y es activado por secuencias teloméricas cortas y disfuncionales fenómeno que es interpretado como rupturas de doble hebra en la cadena de ADN (DSB). El reclutamiento de factores de respuesta y reparación a los telómeros disfuncionales termina por activar

el punto de control de daño al DNA en G1 y este a su vez conduce a la activación de p53, regulando a la alta el inhibidor de cinasa dependiente de ciclina p21 con el consecuente detención del ciclo celular. En cultivos de células somáticas humanas, los telómeros disfuncionales inducen una detención permanente del crecimiento (Herbig et al., 2004), probablemente debido a la incapacidad de la célula en reparar los segmentos finales dañados de los cromosomas.

El segundo mecanismo ha sido llamado senescencia inducida por estrés o por señalización aberrante (STASIS, Drayton & Peters, 2002), es inducido independientemente del daño telomérico en células cultivadas (Herbig et al., 2004). Otros factores que inducen STASIS incluyen los modificadores de la estructura de la cromatina y las señales mitogénicas hiper-estimuladoras como las producidas por oncogenes alterados (Herbig & Sedivy, 2006). La detención del crecimiento en STASIS esta mediada principalmente por p16INK4a, un inhibidor de los complejos ciclina D/cinasa dependiente de ciclina 4 y 6.

4.3 Resultados

4.3.1 Curvas de Crecimiento

Para investigar la habilidad de proliferación de los fibroblastos SWR se establecieron cultivos a partir de biopsias de piel tomadas de 4 personas (2 pacientes SWR y 2 controles sanos) y un cultivo de un individuo con SHG (AG01972). Los procedimientos están detallados en el apartado de materiales y métodos que se encuentra en la sección 4.5. A través de curvas de crecimiento para los diferentes tipos de células se buscó establecer diferencias en los niveles de proliferación, comparando el número de células presente en cada punto (día) entre pacientes y controles. Además se calcularon los TDPs para cada tipo celular con el fin de cuantificar las diferencias existentes.

El recuento del número de células se realizó diariamente durante un periodo de 8 días en pasaje 4 para CTRL1, CTRL2 y WR1; pasaje 5 para WR2 y pasaje 14 para SHG.

La Figura 4 muestra la dinámica de crecimiento de los diferentes tipos celulares junto con intervalos de confianza correspondiente al 95%. Las diferencias entre las células de los individuos sanos y de los diferentes pacientes se observan claramente a partir del

quinto día y se mantienen hasta el final. Imágenes representativas de estos cultivos se pueden apreciar en la Figura 5.

Los TDPs (Tabla 1) confirman la diferencia en la dinámica de crecimiento de los cultivos , incluso diferencias existentes entre los dos pacientes SWR, pero no entre los controles.

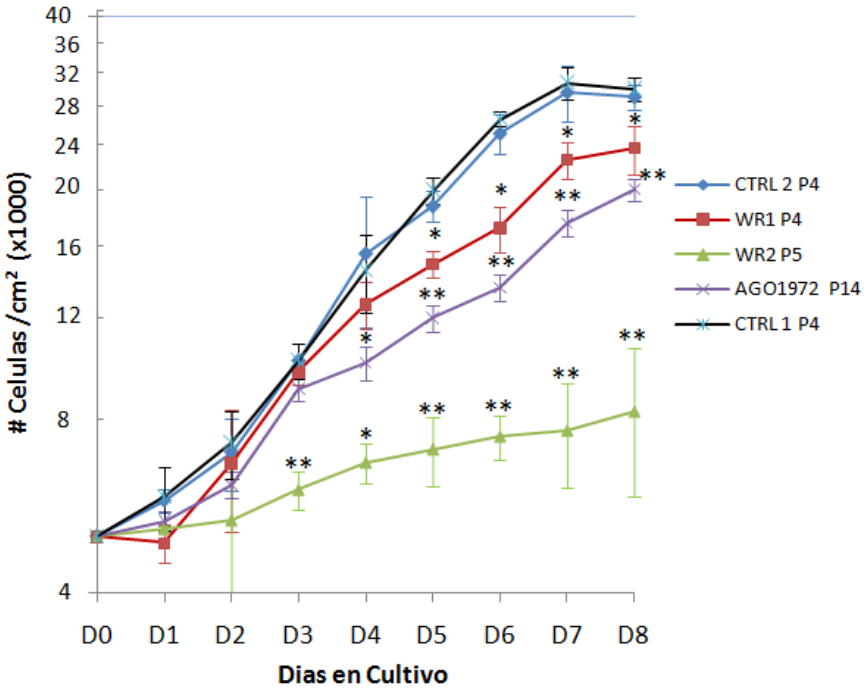


Figura 4. Curvas de crecimiento de cultivos de fibroblastos de pacientes con síndromes progeroides. Las comparaciones fueron hechas por género con los controles sanos Ctrl1, Ctrl2 mediante una prueba t (* valor $p<0.05$, ** valor $p<0.01$). Cada dato representa la media ± dos veces el error estándar de experimentos realizados por triplicado.

Tabla 1. Características de crecimiento de fibroblastos derivados de pacientes con síndromes Progeroides

Tipo Celular	Tasa de proliferación media (doblajes/día)	Tiempo de doblaje poblacional promedio (días)
Control 2 Pasaje 4	0.42	2.4
Control 1 Pasaje 4	0.43	2.3
WR1 Pasaje 4	0.33	3.1
WR2 Pasaje 5	0.10	10.3
AGO1972 Pasaje 14	0.27	3.8

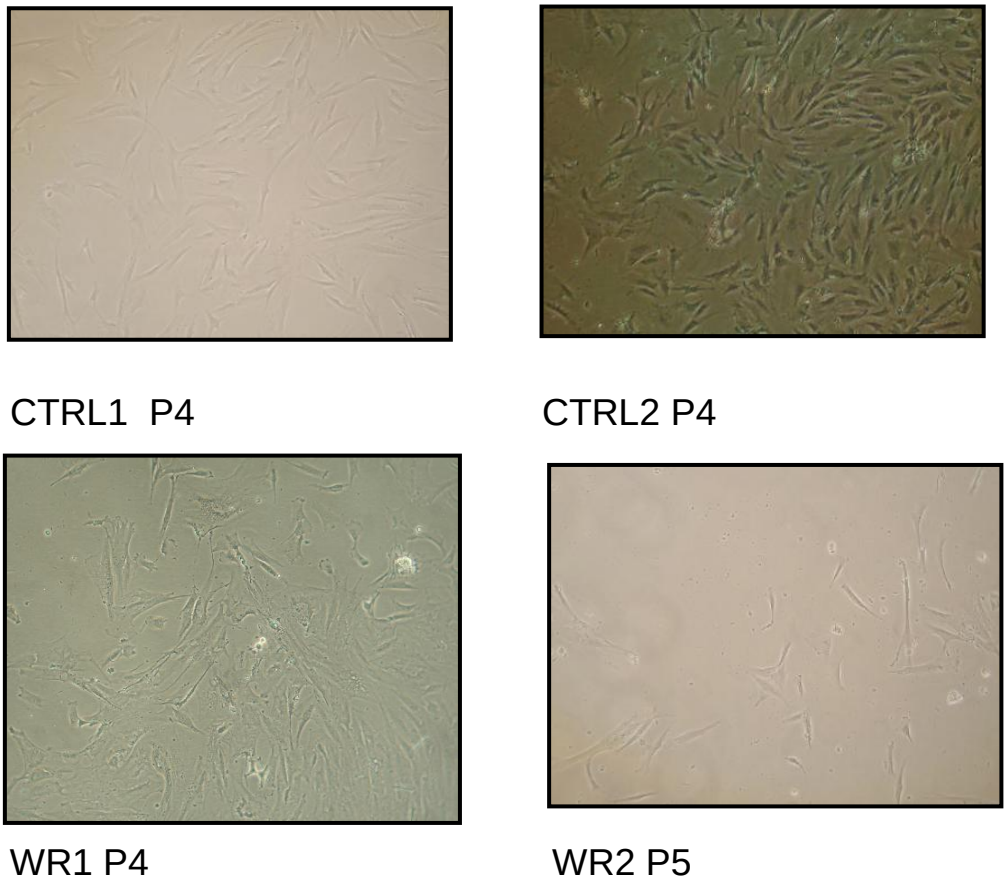


Figura 5. Fibroblastos de pacientes y controles en los pasajes indicados. Aumento total 100X.

4.3.2 Doblajes poblacionales

El NDP de los fibroblastos control permanece estable hasta el pasaje 10 a 3.06 ± 1.31 y 2.91 ± 0.72 para CTRL1 y CTRL2 respectivamente. Para WR1 se observa una situación similar 2.44 ± 0.92 en donde, aunque el valor es menor no alcanza a ser estadísticamente significativo al compararlo con controles (valor P = 0.41, t test vs. CTRL1; valor P = 0.39, t test vs. CTRL2). Gráficamente, el NDP para cada tipo celular se puede observar como la pendiente de cada una de las curvas en una gráfica de doblajes poblacionales acumulados versus pasaje del cultivo (Figura 6).

En el caso de WR2 las comparaciones se ven restringidas ya que las células no proliferaron mas allá del quinto pasaje (Figuras 4 y 6).

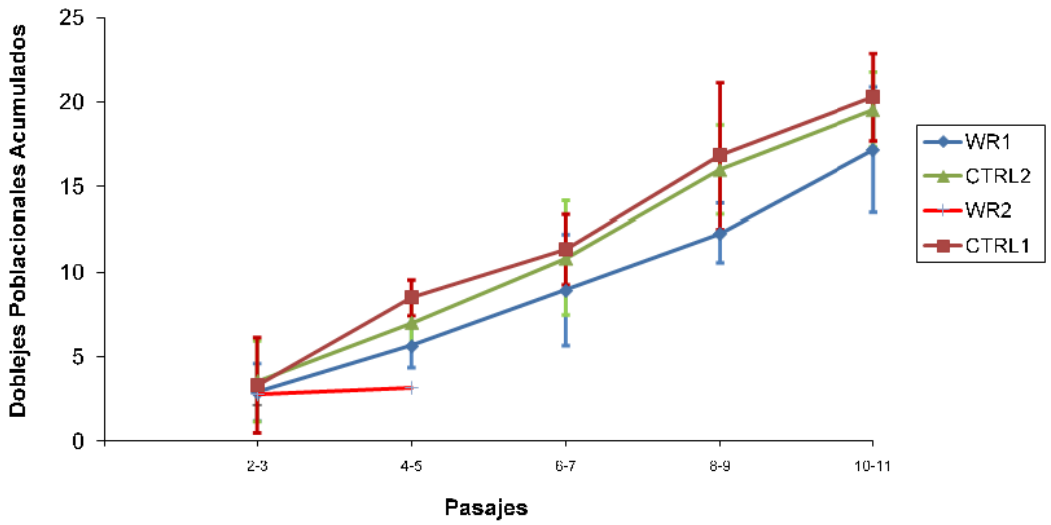


Figura 6. Crecimiento acumulado de fibroblastos de pacientes con SWR. Cada dato representa la media ± desviación estándar de los datos individuales de los pasajes que forman un determinado punto.

4.3.3 Senescencia Celular

El papel de la senescencia celular en la enfermedad fue abordado por medio de ensayos que examinan la presencia de marcadores asociados a este fenotipo y que en conjunto pueden dar una idea complementaria.

La primera aproximación tiene relación con los foci de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF) que hacen parte de los cambios que ocurren en las células una vez han alcanzado la etapa posreplicativa (Narita et. al. 2003). Por esta razón se pretendió examinar la presencia de estructuras similares a SAHF en los núcleos de los fibroblastos en cultivo (SWR, SHG y Controles) usando una tinción nuclear sencilla (Figura 3).

Al examinar 100 células de SWR (WR1 y WR2), y Control (Ctrl2) en pasaje 4-5 y SHG (AGO1972) en pasaje 15 no se encontraron núcleos con "foci" claramente definidos como los reportados en estados de senescencia replicativa (Figura 7).

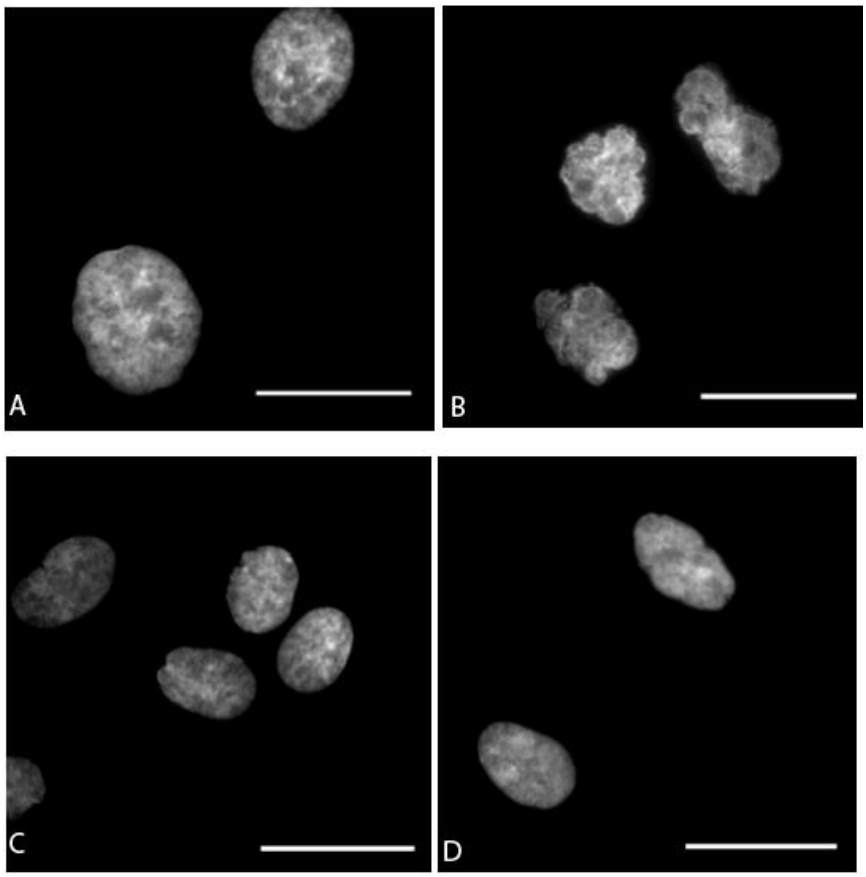


Figura 7. Ausencia de "foci" de ADN en fibroblastos progeroides. Apariencia general del material nuclear después de una tinción con DAPI. A Fibroblastos Ctrl2 P4; B Fibroblastos SHG P15; C y D Fibroblastos SWR (WR1 P4 y WR2 P5 respectivamente). Las barras corresponden a 30 µm.

Es importante resaltar que la formación de SAHF es gradual (Zhang et al., 2005) de tal forma que la cromatina puede estar en el proceso de reacomodación en las células de estudio.

Para evaluar esta posibilidad se realizó una tinción con DAPI de acuerdo a lo descrito en el apartado de materiales y métodos (apartado 4.5.4). Los núcleos teñidos fueron fotografiados a gran aumento (objetivo de 100X) en un microscopio con sistema semi-confocal DSU (Disk Scanning Unit). El plano medio de cada núcleo fue convertido a escalas de grises y en ellas se uso un comando del programa "Image J" (Mean Gray Value) que permite obtener la media de la variable intensidad para el conjunto de los pixeles que se encuentran en el plano tomado por la fotografía. Adicionalmente este programa permite establecer la desviación (estándar) para cada uno de los puntos con

respecto a la media calculada de tal manera que grandes desviaciones en los diferentes puntos estarían hablando de núcleos que no poseen una distribución homogénea de la cromatina. La media de estas desviaciones fue usada para identificar diferencias entre los grupos (Figura 8). Según esta variable se pudieron identificar diferencias al comparar cada uno de los grupos de fibroblastos con el control, aunque inversamente a lo esperado la cromatina fue mas "homogénea" en los fibroblastos de síndromes progeroides que en aquellos control evidenciado por una media de las desviaciones significativamente mas baja para estos grupos.

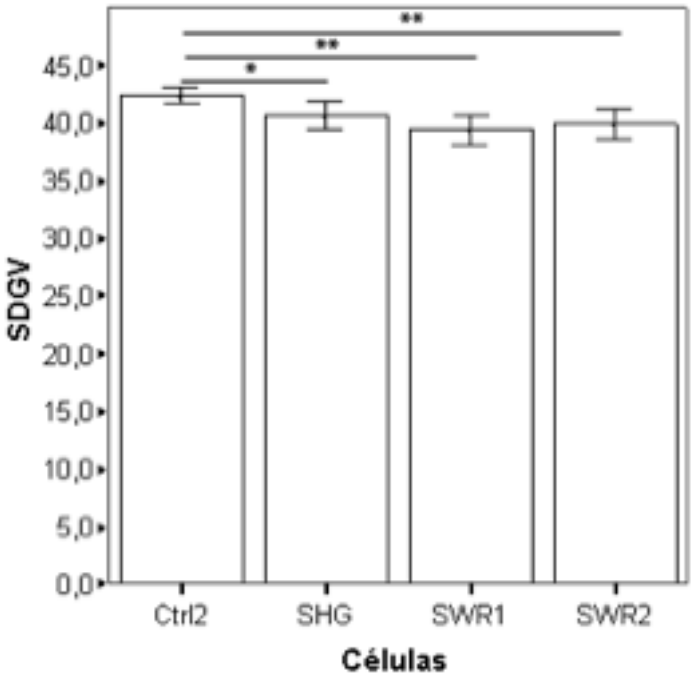
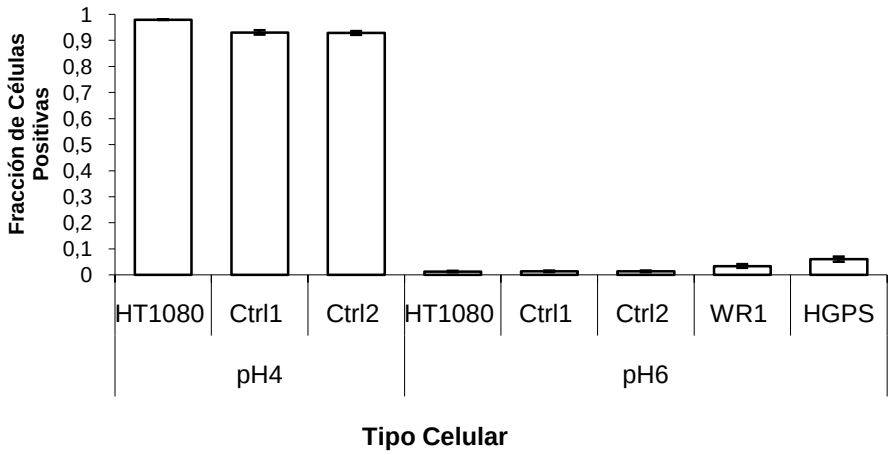


Figura 8. Estado de la cromatina en núcleos de fibroblastos progeroides. Cada píxel al interior de un núcleo le fue asignado un valor numérico de intensidad. Para este conjunto de valores de intensidad se calculó la desviación estándar, valor que caracteriza a cada núcleo. Los resultados representan la media aritmética para cada grupo de estas desviaciones estándar (SDGV). Para este experimento se evaluaron 100 células de cada grupo, fibroblastos Ctrl2 P4; fibroblastos SHG P15; fibroblastos SWR (WR1 P4 y WR2 P5) . * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

La senescencia fue también evaluada por la presencia de actividad ß-galactosidasa a pH 6 en fibroblastos de síndromes progeroides. Los resultados muestran que las células de SWR (WR1) y las células SHG (AGO1972) presentan una activación anómala incipiente de esta enzima a pH 6 en contraste a lo observado en los controles (Figura 9 A y B). Al realizar un análisis de varianza de una vía incluyendo a todos los grupos existen

diferencias significativas (P<0.05). Sin embargo al hacer un prueba Post-Hoc (método de Bonferroni) para identificar cuales grupos están implicados en estas diferencias la significancia se pierde.

A.



B.

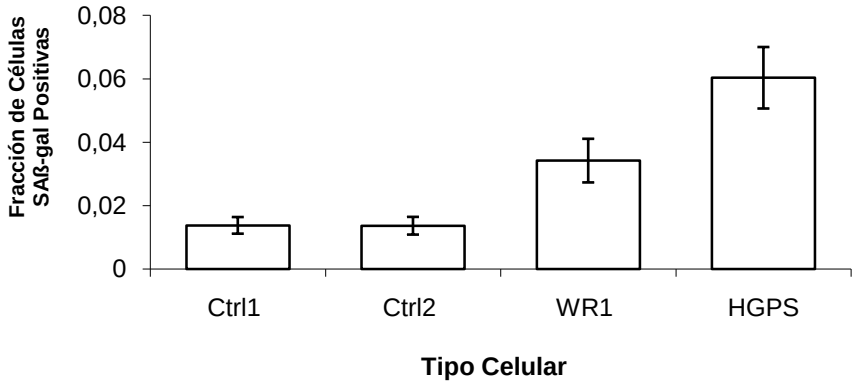


Figura 9. Senescencia replicativa en pases tempranos de fibroblastos SWR. La actividad SAß-gal fue evaluada por la presencia de un precipitado azul al interior de las células posterior a la aplicación del substrato X-Gal a pH 6. A, la actividad fisiológica lisosomal (pH 4) se evaluó en los controles y una línea celular de fibrosarcoma (HT1080) como control de la técnica. B, Detalle de los experimentos realizados a pH 6. Por lo menos 100 células Ctrl1 P6, Ctrl2 P6 y WR1 P7 y 100 en pasaje 16 para SHG evaluadas, los experimentos se hicieron por triplicado. Los resultados representan la media de la relación células marcadas/total de células ± 2 veces el error estándar.

En definitiva, este conjunto de experimentos sugieren que los fibroblastos SWR no presentan fenómenos marcados de senescencia replicativa temprana antes del NDPA 20.

4.4 Discusión

Los defectos proliferativos han sido un común denominador en los síndromes progeroides (Martin et al., 1970; Allsopp et al., 1992; Wallis et al., 2004) y el SWR parece no ser la excepción. Si bien los cultivos de WR1 y WR2 tienen un comportamiento propio en cuanto a parámetros de crecimiento se refiere, los dos reflejan un déficit proliferativo que parece hacerse mas evidente con el tiempo en cultivo (Figuras 4 y 6).

¿Cuál podría ser la causa de este déficit?. En éste estudio se exploró la posibilidad que la senescencia replicativa fuera la responsable de las tendencias observadas en fibroblastos SWR.

De acuerdo a los resultados dos marcadores distintos de senescencia muestran que no existe un papel determinante de este fenómeno en los defectos proliferativos de células SWR, al menos en pasajes tempranos de los cultivos.

El mismo fenómeno ha sido descrito para cultivos de fibroblastos que expresan progerina (Kudlow et al., 2008), en donde los autores demuestran que mas que la senescencia replicativa es la detención del ciclo celular la que explica la disminución de la proliferación en pasajes tempranos. De manera contrastante, en el síndrome de Werner la senescencia replicativa si explica en gran medida la disminución en la proliferación de fibroblastos en cultivo (Dimri et al., 1995; Huang et al 2007); en estas células entre el 30 y 50% es explicado por senescencia replicativa en NDPA 20 vs. menos del 5% para WR1 encontrado en este estudio para el mismo NDPA.

Otra posibilidad para explicar la disminución en la proliferación contempla los mecanismos relacionados con la muerte celular programada. Al menos un estudio (Bridger & Kill, 2004) muestra que en el fenotipo celular SHG se desarrolla de una manera progresiva comenzando con células aparentemente normales hasta llegar a células que poseen una lamina nuclear anormal, morfología nuclear alterada y susceptibilidad a procesos apoptóticos.

Existe la posibilidad de explicaciones similares a los resultados comunes observados en los dos síndromes (SHG y SWR). Nuevos estudios que contemplen la evaluación del ciclo celular y los procesos apoptóticos en una cohorte mas amplia podrán llevar estos datos de un panorama descriptivo a uno más explicativo.

4.5 Materiales y Métodos

4.5.1 Células y condiciones de cultivo

Las siguientes tipos celulares se usaron para la realización de los experimentos: cultivos primarios de fibroblastos de dos pacientes con SWR, cultivos primarios de fibroblastos de un paciente con SHG (AG01972), cultivos primarios de fibroblastos de dos individuos jóvenes normales y línea celular HT1080 (fibrosarcoma).

Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia . A cada participante se le explicó en que consistió la investigación permitiéndoles decidir su inclusión de manera voluntaria en el estudio. Bajo los conceptos éticos correspondientes se les tomo el consentimiento informado (Anexo 1).

Los cultivos primarios fueron establecidos a partir de una biopsia con sacabocados de la parte interna del antebrazo a las edades de 13 años (SWR1 ♀) y 20 años (SWR2 ♂). Dos individuos sanos donaron voluntariamente una muestra como la descrita en los pacientes, a la edad de 22 años (Ctrl1♀) y 20 años (Ctrl2♂).

Los fibroblastos de SHG fueron adquiridos del “Coriell Institute Repositories” y provienen de una muestra de piel de tórax de una paciente caucasoide de 14 años de edad con rasgos progeroides. Desde el punto de vista genético la muestra se caracteriza por poseer una transición en la posición 2036 del gen lámina A (2036 C>T) que conduce al cambio clásico en el codón 608 (G608G) causante del síndrome de Hutchinson-Gilford. Las células suministradas fueron recibidas en el pasaje 12 con un NDPA calculado de 22, según la razon de subcultivo 1:4 utilizado por el proveedor. Las línea celular HT1080

proviene de ATCC, originalmente fueron aisladas de un fibrosarcoma en un hombre caucásico de 35 años.

En cada una de las biopsias (SWR y Controles) fue removido el tejido necrótico para posteriormente seccionar finamente el tejido restante. Los diferentes fragmentos resultantes se dividieron en dos grupos y cada grupo se colocó en un frasco de cultivo (25 cm^2 de superficie) con medio MEM, 10% de suero fetal bovino, 100U/ml de penicilina, y 0.1 mg/ml de estreptomicina a 37°C y 5% de CO_2. Después del establecimiento de los cultivos se usaron las siguientes condiciones para el crecimiento de las células obtenidas: MEM, suplementado con 20mM de glutamina, 10% de suero fetal bovino, 100U/ml de penicilina, y 0.1 mg/ml de estreptomicina; las condiciones de temperatura y CO_2 fueron las mismas mencionadas arriba. Así mismo, estas condiciones se usaron para los cultivos primarios ya establecidos de la paciente con SHG y para la línea celular HT1080.

4.5.2 Doblaje poblacional y crecimiento de cultivos primarios

La curva de crecimiento para cada uno de los tipos celulares se realizó colocando estos a una densidad de 10000 células por pozo en 24 pozos de $2cm^2$ de superficie. Se uso Tripsina/Versene (Lonza) para despegar las células que posteriormente fueron resuspendidas en medio de cultivo y contabilizadas en hemocitómetro. Durante los siguientes 8 días se hicieron conteos directos con tres repeticiones para cada tipo celular usando un hemocitómetro, contando entre 100 y 900 células por pozo.

Para hallar el tiempo de doblaje poblacional se realizó una regresión lineal sobre la fase exponencial de las curvas obtenidas. La ecuación de la recta para dicha regresión es:

$$\ln N = mt + \ln b$$

Donde $\ln N$ corresponde al logaritmo natural del número de células, m es la pendiente de la recta, t representa el tiempo y $\ln b$ el intercepto con las ordenadas en una gráfica semi-logarítmica ($\ln N$ vs t).

El tiempo de doblaje poblacional (TDP) se deduce de la línea de regresión como el Δt necesario para que las células doblen su número, despejando t de la ecuación anterior y realizando la resta respectiva obtenemos que:

$$TDP = (t_1 - t_2) = \ln 2/m$$

en donde t_1 es un tiempo inicial escogido sobre la recta, t_2 es el tiempo al cual la población celular existente en t_1 ha logrado doblarse y m es la pendiente de la recta anteriormente obtenida.

Para hallar el doblaje poblacional (NDP) en cada pasaje los diferentes tipos de fibroblastos fueron cosechados al alcanzar una subconfluencia del 80% con el procedimiento de dispersión por Tripsina/Versene. El NDP fue calculado a cada pasaje por medio de conteos con un hemocitómetro usando la formula estándar

$$NDP = \log_2 (D/D_0)$$

donde D corresponde al número de células cosechadas y D_0 al número de células sembradas.

El número de doblajes poblacionales acumulados (NDPA) alcanzado por un cultivo corresponde a la sumatoria de los NDPs alcanzados en cada subcultivo.

4.5.3 Ensayos de Senescencia

La senescencia celular fue medida alrededor del pasaje 6-7 para cada tipo celular, excepto para SHG (pasaje 16) . Se usó un ensayo de senescencia asociado a β-Galactosidasa para células adherentes. Operacionalmente este ensayo se define como la actividad hidrolítica a pH6 manifestada *in situ* cuando las células son incubadas con un substrato cromogénico conocido como 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-Gal) (Dimri et al., 1995; Itahana et al., 2007).

Se cultivaron las células por triplicado en pozos de $2cm^2$ de superficie hasta un estado subconfluente (50%). Posteriormente se fijaron en una solución de paraformaldehido al 2%

en PBS por 10 minutos para después realizar una reacción colorimétrica a 37° C (en ausencia de CO_2) con solución de tinción (150 mM NaCl, 2 mM de $MgCl_2$, 5 mM de ferricianuro de potasio, 5 mM ferrocianuro potásico, y 40 mM de ácido cítrico / fosfato sódico, pH 6,0) que contiene 1 mg/ml de X-Gal. Una vez que la tinción fue máxima (20 horas aproximadamente), las células fueron lavadas con PBS y cubiertas con glicerol al 70% en PBS. Las imágenes correspondientes a 100 células fueron tomadas a 200X (magnificación total) en un microscopio invertido. Los resultados fueron cuantificados y graficados (Figura 9).

4.5.4 Immunofluorescencia SAHF

Las células para este experimento fueron sembradas en cámaras de cultivo Lab-Tech de 8 pozos (Nunc Brand) y se les permitió un periodo de adaptación de 24 horas para asegurar su adhesión a la superficie de las láminas. Cuando alcanzaron una confluencia del 50% se realizaron dos lavados con PBS (pH 7.3) a temperatura ambiente. El PBS fue retirado y a cada laminilla se le agregó 2 ml de paraformaldehido al 4% en PBS (preparado fresco); el proceso de fijación se extendió por 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados post fijación con PBS (pH 7.3) a temperatura ambiente. Después de remover el PBS se adicionó 1ml de DAPI a una concentración de 0.1μg ml^{-1} en PBS (pH 7.3) por 2 minutos en oscuridad. Al final se realizaron 3 lavados con PBS (pH 7.3) a temperatura ambiente con una duración de 5 minutos cada uno y las láminas se montaron con Vectashield (USA) para ser analizadas. Las preparaciones se observaron con filtros de excitación para DAPI en un microscopio de fluorescencia Olympus con un sistema DSU. La adquisición se realizó con el programa Stereo Investigator V.7.0. Las láminas fueron analizadas inmediatamente o conservadas a -20°C hasta su uso.

4.5.5 Análisis estadístico

Para determinar la significancia entre los diferentes tipos celulares (controles y experimentales) se realizaron los análisis de varianza de una vía con sus respectivas pruebas Post-Hoc para precisar donde se hallaban las diferencias. En el caso de comparación de medias por pares se usó la prueba t de Student correspondiente. Las variables fueron sometidas a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para

verificar los supuestos de las pruebas estadísticas usadas, en caso de alejarse los supuestos se usaron pruebas alternas apropiadas para cada caso. Todas las pruebas se realizaron con el programa SPSS.

5.0 CAPITULO 2: ALTERACIONES EN LA MORFOLOGIA Y TAMAÑO DEL NUCLEO EN PACIENTES CON SWR

5.1 Razonamiento

Como se mencionó en el apartado 4.1 la exploración del SHG podría dar luces acerca de las causas de SWR. Con respecto a la etiología del SHG, existen varios estudios con cultivos primarios derivados de pacientes que muestran anomalías en la forma del núcleo haciéndose estas mas evidentes con el aumento en el pasaje del cultivo (Eriksson et al., 2003; Yang et al., 2005). Este fenotipo celular ha sido interpretado como el resultado de la generación de una variante de la proteína lámina A denominada progerina. La anomalía es el resultado de una maduración defectuosa de la proteína, consecuencia de la generación de un sitio de empalme (splicing) con la mutación. La "expresión" de este sitio de empalme críptico conduce a la eliminación de 50 aminoácidos de la proteína, entre ellos la secuencia de reconocimiento de una metaloproteasa (Zmpste24) encargada de escindir el extremo carboxilo previamente farnesilado (Figura 10c).

Como consecuencia se afecta su proceso de maduración y posteriormente el correcto ensamblaje del núcleo-esqueleto produciendo las formas irregulares reportadas (Eriksson et al., 2003; Young et. al.,2005) .

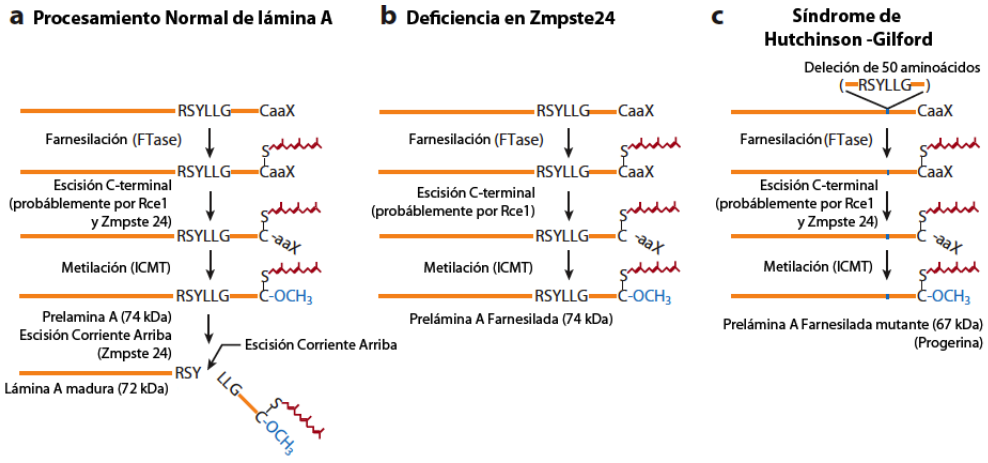


Figura 10. Procesamiento normal y anormal de la proteína lámina A. A. Normal, B. Deficiencia en la metaloproteasa Zmpste24, C. Mutación conducente a la generación de progerina en SHG. Modificado de Davies et al., 2009.

Hasta el momento no existen estudios de células derivadas de pacientes SWR en donde se examine la morfología del núcleo como posible evidencia de un ensamblaje anómalo del núcleo-esqueleto o de un procesamiento inadecuado y subsecuente disfunción de lámina A, procesos que parecen estar relacionados con los rasgos progeroides en el SHG (Haithcock et al., 2005; Yang et al., 2005). Resultados propios en donde se realiza un análisis de ligamiento genético al gen LMN A en varios pacientes con SWR (Morales et al., 2009) junto con estudios realizados por otros (Cao & Hegele, 2003) muestran que el SWR no esta asociado a anomalías en lámina A. Esto sugiere que el defecto genético que genera el SWR pueden alterar proteínas a otro nivel en la misma vía (e.g. defectos en Zmpste24, Figura 10b) o quizás comprometer genes pertenecientes a vías completamente distintas en los dos síndromes.

5.2 Fundamento teórico

Una de las enseñanzas que aportan los síndromes progeroides sobre las causas de los rasgos relacionados con el envejecimiento es que parece existir un común denominador para muchas de estas entidades, el núcleo.

A este organelo su reputación le precede, en gran parte por ser el lugar donde se alberga el material genético. El núcleo ha resultado ser un sitio con una organización interna compartimentalizada, observación que ha sido el resultado de datos obtenidos por diferentes investigadores acerca de la ubicación de proteínas nucleares. Así, algunos lo han definido como una mezcla dinámica de compartimentos carentes de membrana de capacidad funcional variable (Shiels et al., 2007); inclusive pueden aparecer nuevos compartimentos con el estado fisiológico de la célula como lo demuestra la aparición de SAHF descrita arriba.

En cuanto a los límites el núcleo de las células eucarióticas esta separado del citoplasma por la envoltura nuclear, la cual consiste de una doble capa de membranas: la membrana interna y la membrana externa. En este sistema de membranas cada una de ellas es independiente, siendo la membrana externa una continuación del sistema de membranas del retículo endoplasmático rugoso (RER) y la membrana interna un límite caracterizado por contener un "pool" de proteínas característico. Sin embargo, existen puntos de unión de las dos membranas en sitios especializados denominados complejos de poro nuclear

(CPN). Los CPN son canales acuosos formados por al menos 30 tipos diferentes de proteínas conocidas como nucleoporinas (D'Angelo et al., 2009) y cuyas funciones van desde el control de macromoléculas desde y hacia el núcleo hasta la facilitación de la incorporación de las proteínas propias de la membrana interna nuclear provenientes del RER.

Adosado a la parte interna de la membrana interna se encuentra la lámina nuclear, una red formada por proteínas pertenecientes al grupo V de filamentos intermedios y conocidas como laminas y por sus proteínas asociadas (Stuurman et al., 1998). Entre los procesos en los que se ha visto implicada la lámina nuclear se encuentran preservación de la forma del núcleo (Hoffmann et al., 2002; Mallampalli et al., 2005; Wang et al., 2008), organización de la cromatina (Oberdoerffer & Sinclair, 2007; Dechat et al., 2008; Mekhail et al., 2008) , replicación del ADN (Shumaker et al., 2008), transcripción a ARN (Akhtar et al., 2007; Reddy et al., 2008), progresión del ciclo celular (Kutay & Hetzer, 2008; Güttinger el al., 2009), migración nuclear (Starr, 2009), desarrollo celular y diferenciación (Frock et al., 2006) e inclusive apoptosis (Tzur et al., 2006).

Una de las teorías mas extendidas sobre las causas del envejecimiento es la teoría del estrés oxidativo. La acumulación de especies de oxígeno reactivas (ROS) a lo largo del tiempo de vida conducen a una acumulación de los efectos adversos de sus reacciones químicas, entre estos el daño al ADN (revisado por Finkel & Holbrook, 2000). Por lo tanto no es difícil imaginarse que aquellos cambios que alteren la arquitectura nuclear puedan favorecer el ataque al ADN y las consecuencias que de esto se derive, entre ellas muy seguramente procesos relacionados con el envejecimiento.

A favor de estas ideas Haithcock y colaboradores (2005) muestran como en *Caenorhabditis elegans* el proceso normal de envejecimiento involucra un deterioro estocástico y progresivo de la lamina nuclear y de la arquitectura nuclear en muchos de los tejidos exceptuando las neuronas. Un ejemplo paralelo hecho en fibroblastos humanos demuestra como la generación de una isoforma anómala de lámina A (progerina), causante de SHG, ocurre en personas normales en edad avanzada asociando la alteración de la arquitectura nuclear al proceso de envejecimiento normal (Scaffidi & Mistelli 2006). Síndromes progeroides como Werner, Bloom, Rothmund Thomson, ATM y SHG son ejemplos característicos de la alteración de la arquitectura nuclear.

En el caso de síndromes como Werner, Bloom y Rothmund Thomson la carencia de una función adecuada de helicasas ReqQ produce un genoma que es considerado altamente inestable (Bohr, 2008). ATM por otra parte es originado por la alteración de una cinasa que inicia los procesos de reparación, desencadenando las anomalías nucleares (Grattarola et al., 2006) y produciendo las características fenotípicas típicas: deterioro neuronal progresivo, deficiencia en el crecimiento e inestabilidad genómica. Para SHG los cambios en el núcleo son dramáticos y tienen su explicación en el efecto dominante negativo que tiene la progerina sobre lámina A silvestre (Eriksson et al., 2003). En este caso el pleiotropismo en función atribuido a lámina A lleva a que la perdida de su rol ocasione alteraciones en aspectos tan diversos como la morfología nuclear, señalización, estabilización y reparación del material genético, control del ciclo celular, entre otros (Vlcek & Foisner, 2007).

5.3 Resultados

Este apartado presenta dos tipos de resultados: el primero evalúa las características de forma y tamaño nuclear en fibroblastos SWR, SHG y Controles y el segundo analiza la distribución y expresión de la proteína lámina A en estos tres grupos.

El compromiso de la arquitectura nuclear fue abordado desde el punto de vista de la morfología nuclear. Los experimentos de fluorescencia muestran que existe una tendencia elevada en las células SHG a mostrar lobulaciones comparado con lo que se observa en fibroblastos control (Figura 11A) y en algunos de los casos estas lobulaciones muestran acumulación de material antigénico representado posiblemente por acúmulos de progerina y lámina A (Figura 13ª, flechas), como ha sido establecido en otros estudios. Las células SWR no presentan este defecto morfológico en sus núcleos ni las acumulaciones generalizadas de lámina A, lámina C ó progerina.

A. B.

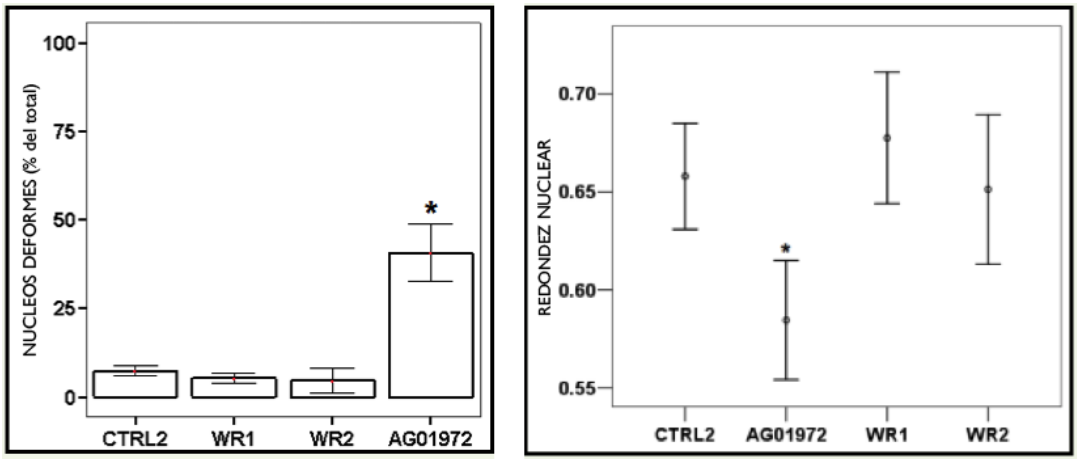


Figura 11. Núcleos deformes están ausentes en fibroblastos SWR. A. Porcentaje de núcleos con al menos 2 lobulaciones. B. Redondez en los núcleos de los diferentes grupos estudiados, un valor cercano a uno significa que el núcleo es mas parecido a un circulo de su misma área. Los grupos incluidos son fibroblastos control (Ctrl2, pasaje 5) , SWR (WR1 pasaje 5 y WR2 pasaje 4) y SHG (AG01972, pasaje 14). * valor P< 0.05 vs. CTRL2, test t-Student test. Para éste experimento fueron contadas 100 células de cada grupo. Los resultados están expresados como la media de tres experimentos ± 2(S.E.M)

Al estudiar que tan circulares son los núcleos mediante el parámetro de redondez nuclear se observa que los fibroblastos SHG se alejan del valor unitario propio de los núcleos mas redondeados. Sin embargo estas observaciones no se aplican para SWR, evaluadas al comparar los grupos SWR y Ctrl2 para esta variable (Figura 11B).

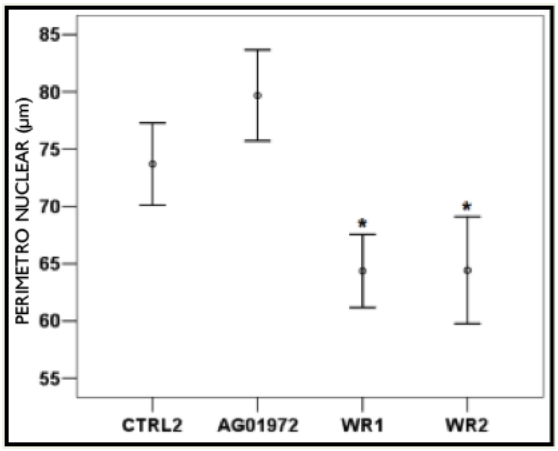


Figura 12. Perímetro nuclear disminuido en fibroblastos SWR. Representación del perímetro celular (medias ± 2(S.E.M)) de tres experimentos distintos. Los grupos incluidos son fibroblastos control (Ctrl2, pasaje 5) , SWR (WR1 pasaje 5 y WR2 pasaje 4) y SHG (AG01972, pasaje 14). * valor P< 0.05 vs. CTRL2, test t-Student test. Para éste experimento fueron contadas 100 células de cada grupo.

Se evaluó también el perímetro nuclear de la figura generada al enfocar el plano medio del núcleo y se uso esta medida como un indicativo indirecto del tamaño del núcleo. De manera muy llamativa se observó que los valores para los fibroblastos SWR eran mucho mas bajos, indicando un menor tamaño en estos núcleos comparado con el tamaño de núcleos del grupo control ($p< 0.05$, t- test). Este resultado se mantuvo tanto para WR1 como para WR2, mostrando una característica compartida a nivel celular para los dos pacientes (Figura 12).

¿Es posible que las alteraciones en el tamaño estén relacionadas con un procesamiento anómalo de la proteína lámina A como sucede en SHG? Para abordar esta pregunta se exploró la localización de esta proteína en el núcleo de células SWR por inmunofluorescencia y se evaluó la presencia de isoformas patológicas mediante la realización de un inmunoblot contra lámina A usando un anticuerpo policlonal que reconoce la región aledaña al acido aspártico 238 de la proteína.

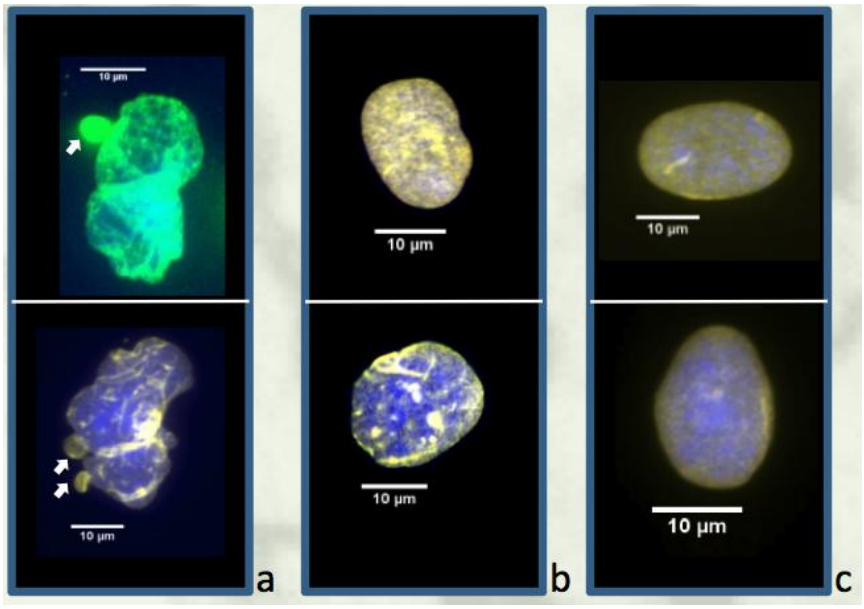


Figura 13. Distribución de isoformas de lámina A en el núcleo de fibroblastos SWR. Inmunofluorescencia de cultivos primarios de fibroblastos de: (a) Paciente con SWR clásico (AG01972), (b) paciente con SWR característico (WR1) y (c) Control no afectado (Ctrl2), usando el anticuerpo policlonal 2032 desarrollado en conejo (Cell Signaling) contra lámina A/C. Se usaron diferentes anticuerpos secundarios anti-conejo conjugados con los siguientes fluoroforos: Verde= Alexa Fluor 488, Amarillo=Alexa Fluor 543, Azul=DAPI. Las flechas muestran las lobulaciones nucleares con la acumulación antigénica Escala 10 µ m. Las fotos muestran la coloración DAPI (en azul) y la marca (en verde o amarillo) para el antigeno reconocido por el anticuerpo policlinal.

Como se mencionó, los núcleos SHG presentaron acumulaciones descritas por otro autores. Estas acumulaciones estuvieron relacionadas principalmente con las deformidades de las células (Figura 13A, flechas) y no se presentan de manera consistente en fibroblastos SWR ni en controles.

La presencia de acúmulos antigénicos en células SHG ha sido relacionada con la expresión de progerina en otros estudios. En este trabajo, como se muestra en la Figura 14, la versión anómala de la proteína lámina A (progerina, 66 KDa) no está presente en extractos proteicos de fibroblastos SWR (en NDPA 15 y 20) ni en aquellos de controles pero si en extractos provenientes de diferentes pasajes de células SHG (NDPA 22 y 25), (Figura 14). Las bandas adicionales corresponden a lámina A (70 KDa, 664 aa) y lámina C (572 aa, 62 KDa).

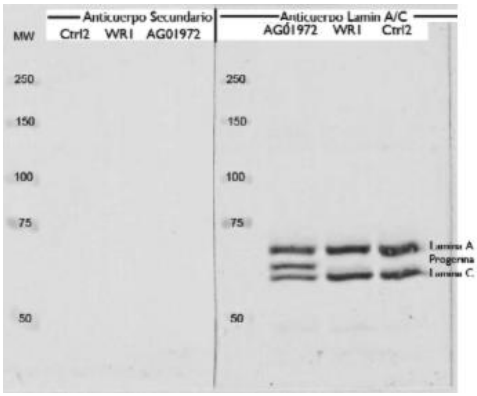


Figura 14. Distribución de isoformas de lámina A en el núcleo de fibroblastos SWR. Inmunofluorescencia de cultivos primarios de fibroblastos de: Paciente con SHG clásico (AG01972), paciente con SWR característico (WR1) y Control no afectado (Ctrl2), usando el anticuerpo policlonal AB2038 (Cell Signaling) que reconoce lámina A y lámina C. Este experimento fue realizado en los NDP 15 y 20 con los mismos resultados.

Es importante resaltar que la presencia de progerina en cultivos primarios de pacientes con SHG ha sido detectada incluso a edades tan tempranas como los 6 años de edad, (Eriksson, et al., 2003). Se asume que en caso de presentar anomalías relacionadas con lámina A, los pacientes SWR con 13 (SWR1) y 20 (SWR2) años de edad, manifestarían estos defectos tanto en morfología nuclear como en expresión proteica .

5.4 Discusión

En los últimos años el auge que ha adquirido el estudio de la lámina nuclear se debe en gran medida a que alteraciones en la generación o procesamiento de sus componentes llevan a características de envejecimiento prematuro, ejemplos clásicos de estos casos son el SHG y la dermopatía restrictiva.

Desde el punto de vista clínico y de aparición temporal de los rasgos progeroides, el SWR y el SHG tiene bastante parecido (comparado con otros síndromes progeroides). Por esta razón algunos investigadores se han preguntado si las causas bien establecidas en SHG explican en alguna medida lo que ocurre en SWR (Cao &Hegele 2003; Arboleda et al., 2007), quizás tratando de emular lo ocurrido para algunos de los casos atípicos de síndrome de Werner que poseen mutaciones en el gen LMN A/C (Bonne & Levy 2003).

Sumando los resultados de este trabajo con estudios de ligamiento realizados en pacientes SWR (Cao & Hegele 2003; Morales et al., 2009) se tiene un cuerpo de evidencia amplio que rechaza la hipótesis de orígenes comunes para estos dos síndromes. No parecen existir mutaciones en la región codificante del gen LMN A/C, ni evidencia celular de formas nucleares aberrantes que puedan hacer sospechar de la generación de una isoforma de lámina A erróneamente procesada. Es más, lámina A parece estar uniformemente distribuida en núcleos de células SWR descartando así los posibles agregados vistos en núcleos SHG.

Existe sin embargo una aparente disminución en el tamaño de los núcleos en SWR, aspecto bastante llamativo teniendo en cuenta que alteraciones en la arquitectura nuclear aparecen en muchas de las entidades progeroides incluyendo SHG. Aun mas importante, sabiendo que los hallazgos relacionados con alteraciones de la arquitectura nuclear han mostrado ser relevantes para el proceso de envejecimiento normal (Wilson, 2005; Warner & Sierra, 2006).

El alcance de este trabajo no permite establecer con exactitud la posible causa de la reducción en el tamaño de los núcleos para SWR. Hasta el momento el control de la forma y tamaño del núcleo ha sido estudiado muy poco. Recientemente Khatau y colaboradores (2009) demuestran como la forma nuclear en fibroblastos es regulada por la morfología de adhesión de la célula al substrato, regulación que es ejecutada por una cubierta de actina que se encuentra topológicamente encima del núcleo. La interacción de

esta cubierta con la lámina nuclear y específicamente con lámina A se hace a través de un complejo denominado LINC (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton). Este complejo esta formado por la proteína nesprina ubicada en la membrana nuclear externa donde interactúa con el citoesqueleto de actina mediante un dominio citoplasmático. También hace parte de LINC las proteínas Sun1 y Sun2 que conectan a nesprina con lamin A todo esto gracias a los dominios de unión de las proteínas Sun y a su localización en la membrana nuclear interna (Crisp et al., 2005).

En el mismo trabajo (Khatau et al., 2009) los autores encuentran que la alteración de este sistema es la responsable de las anomalías vistas en síndromes causados por mutaciones en lámina A asociadas a morfología nuclear alterada. Este parece no ser el caso para SWR en donde se podría plantear la hipótesis que el complejo LINC junto con su funcionalidad no se encuentra alterado.

¿Que otras opciones probables existen para explicar lo observado? Algunos estudios realizados en levaduras demuestran que el tamaño del núcleo depende del tamaño celular (Jorgensen et al., 2007; Neumann & Nurse, 2007). El trabajo de Neumann & Nurse (2007) describe como en levaduras multinucleadas los núcleos adquieren tamaños diferentes dependiendo de su ubicación y de la cantidad de citoplasma que los rodea. Este hecho hace pensar que el factor determinante en el tamaño nuclear no es difusible pues haría que todos los núcleos en estas células tuviesen el mismo tamaño. Esta línea de pensamiento lleva a proponer a la envoltura nuclear o incluso el RER como posibles hospederos del factor responsable de la dinámica del tamaño nuclear.

A este respecto es interesante observar los resultados obtenidos por el grupo de Brandt (2006) que utilizan a *Drosophila melanogaster* para estudiar el proceso de elongación nuclear observado en el desarrollo embrionario de este modelo. El trabajo describe el gen kugelkern (kuk) que al ser regulado a la baja en embriones produce una reducción en el tamaño nuclear al final del proceso de celularización.

La proteína kuk contiene un dominio super-helice en la mitad N-terminal, una secuencia de localización nuclear y un motivo terminal CxxM. La estructura es parecida a la de las proteínas lámina A/C y lámina B, y se hace mas evidente porque esta proteína también experimenta una modificación postrasduccional por la adición, mediante un enlace covalente, de un lípido isoprenoide (prenilación, Figura 10). Los resultados sugieren que

kuk farnesilada se asocia a la membrana nuclear interna y en conjunto con los otros dos dominios induce la expansión de la superficie nuclear permitiendo el crecimiento del núcleo.

Aunque no existe un gen ortólogo identificado para kuk en humanos, esta serie de resultados hacen pensar que disminuciones en los niveles de proteínas preniladas, asociadas ya sea con las membranas nucleares o con el RER, pueden estar explicando las alteraciones observadas en los núcleos SWR.

Al interior del núcleo las únicas proteínas a las que se les agrega un grupo isoprenoide son lámina A y lámina B, y de estas es lámina B la que conserva su prenilación en el tiempo. La sobre-expresión de formas preniladas de lámina B1 (Ralle et al., 2004), lámina B2 ó lámina A (Prüfert et al., 2004) conducen a la biogénesis de la membrana nuclear. Investigaciones que usan extractos de huevos de Xenopus para estudiar el ensamblaje nuclear muestran que cuando se disminuyen los niveles de las proteínas lámina por medio de anticuerpos específicos ocurre ensamblaje del núcleo, pero su tamaño esta disminuido; este mismo resultado se obtiene usando mutantes dominantes negativos de estas proteínas en los extractos (revisado por Hutchinson, 2002).

La ablación completa de lamin B1 en un modelo murino induce muerte tempana después del nacimiento (Vergnes et al., 2004), mientras que la eliminación completa de lámina A permite el desarrollo a termino del animal; causando la muerte de este solo dos meses después del nacimiento debido a distrofia muscular (Sullivan et al., 1999). El carácter esencial de las lámina tipo B se aprecia en experimentos usando ARN de interferencia en células Hela, allí la disminución drástica en la expresión para lámina B1 y lámina B2 induce rápidamente a un proceso apoptótico (Harborth et al., 2001). En contraste estos mismos estudios muestran que la reducción total en los niveles de lamina A no afecta la proliferación de la células Hela.

Mas allá de la eliminación completa de los productos de los genes que codifican los diferentes tipos de lámina no existe un estudio en el que se reduzca la expresión de manera controlada de las proteínas lámina A ó lámina B que resulten en una baja expresión del gen (sin llegar a la eliminación de la proteína) para determinar su compromiso en la morfología nuclear al nivel celular y su papel en la generación de rasgos progeroiges como los vistos en SWR.

Una diferencia en el fenotipo de SHG y SWR esta en el compromiso neurológico. Mientras que los pacientes con SHG no tienen un daño neurológico primario (Foseel, 2000) es decir, los daños neurológicos reportados son secundarios a problemas del sistema circulatorio (Merideth et al., 2008), aquellos reportados para los casos de SWR concuerdan con problemas de desmielinización (Martin & Ceutrick 1984; Ulrich et al., 1995; Pivnick et al., 2000). Recientemente se ha identificado que la duplicación del gen LMN B1 (cromosoma 5q) produce una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso conocida como leucodistrofia autosómica dominante ó ADLD (Padiath et al., 2006).

En el caso de LMN B2 (cromosoma 19p) diferentes mutaciones han sido identificadas en pacientes con lipodistrofia parcial adquirida ó APL (Hegele et al., 2006), rasgo llamativo debido a la alteración del metabolismo de los lípidos y a los depósitos de grasa localizados encontrados en pacientes SWR (revisado por Arboleda et al., 2007).

Las características progeroides presentadas por SWR son evidentes al nacimiento y sugieren una alteración durante el proceso de desarrollo del embrión. Esta observación concuerda con la expresión temporal vista en las laminas tipo B que en mamíferos se expresan durante todo el desarrollo, mientras que lámina A y lámina C son expresadas principalmente en células diferenciadas. El papel que juega la lámina nuclear en el mantenimiento de la arquitectura del núcleo, la relación entre la arquitectura nuclear y el proceso de envejecimiento y las particularidades de las laminas tipo B en lo que se refiere a sus dominios proteicos y a los fenotipos mutantes hace pensar en los genes que las codifican como posibles candidatos a presentar alteraciones en pacientes SWR .

5.5 Materiales y métodos

5.5.1 Inmunofluorescencia

Las células subconfluentes (Ctrl2 P5, WR1 P5, WR2 P4 y AG01972 P14) cultivadas en laminillas se fijaron con PFA (2%) por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS. Se realizó el bloqueo con una solución BSA 1% Tritón X-100 0,3% por 30 minutos. El anticuerppo usado fue anti-lámina A/C policlonal (cat#

2032, cell signaling), fabricado para reconocer los residuos aledaños al acido aspártico 230 de la proteína lámina A (figura 14).

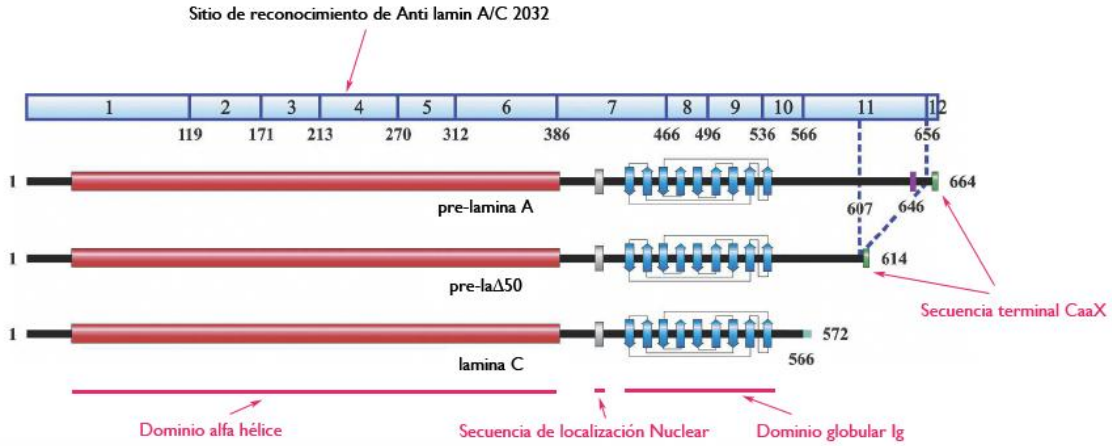


Figura 14. Estructura de la proteina lámina A y lámina C en donde se muestra el sitio de reconocimiento del anticuerpo 2032 usado en este estudio. En la parte superior se muestra un esquema de los 12 exones que codifican la proteína lámina A. Los números en la parte inferior de los exones indican los residuos de la proteína. En la parte inferior aparecen tres productos del gen: pre-lámina A (con su extremo terminal que posteriormente será eliminado), prelaΔ50 ó progerina que ha perdido la región señalada por las líneas punteadas en el exón 11 y lámina C. Modificado de Dechat el al., 2008.

El anticuerpo primario se diluyó 1:200 en solución de bloqueo, con esta mezcla se incubaron las células por 12h a 4°C. Luego de la incubación con anticuerpo primario, las laminillas se lavaron 5 veces con PBT 0,3% por 5 minutos cada vez y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo marcado con Alexa 488 (verde), 543 (amarillo) ó 568 (naranja) por 1h 30 minutos en solución de bloqueo a temperatura ambiente y en oscuridad. El marcador para DNA (DAPI) se uso a una concentración de 1µg ml^{-1} mezclado con el anticuerpo secundario. Al final se realizaron 5 lavados de 5 minutos con PBS y se montaron con Vectashield (USA) para ser analizadas. Las láminas se observaron con los filtros adecuados en un microscopio Olympus con un sistema DSU. La adquisición se realizó con el programa Stereo Investigator V.7.0. Las láminas fueron analizadas inmediatamente o conservadas a -20°C hasta su uso.

Para determinar la extensión de la deformidad nuclear se midieron 50 núcleos seleccionados aleatoriamente al NDP 15 y se hizo el cálculo de la redondez nuclear o relación de contorno (4Π **x** *área* / *perimetro*^{2}). La relación de contorno para un círculo es 1. A medida que el núcleo este mas lobulado, esta relación se aproxima a 0. Para calcular el perímetro y el área se utilizó el menú "analyze" comando "measure" del programa image J.

5.5.2 Inmunoblotting

- *Extracción y cuantificación de proteínas*

Las células se lisaron en pases correspondientes a NDPA 15 y 20 para cada tipo celula (excepto para SHG, NDPA 22 y 25). Las muestras se concentraron y se lisaron usando buffer RIPA (25mM Tris HCl, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40 (v/v), 1% Deoxicolato de Sodio, 0,1% SDS) al cual se le adicionó PMSF a una concentración final de 1mM y el coctel inhibidor de proteasas (mini complete, Roche). La lisis en el buffer se realizó por 5 minutos sobre hielo agitando el frasco ocasionalmente. Los lisados se centrifugaron a 14000g por 15min a 4°C. Posteriormente el producto se sonicó (en un sonicador de sonda) por 30 segundos con un pulso de 50%. El sobrenadante se alicuotó y almacenó a -70°C hasta su uso.

La concentración de proteína de cada muestra se determinó usando el kit BCA, de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las curvas estándar para proteína se construyeron mediante dilución de BSA (2mg/ml) en PBS a una concentración final de 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 y 0 μg/ml. Se adicionó 10μl del estándar o lisados de muestras (1:10 en PBS) en duplicado a platos de 96 pozos y se agregó 200μl de la solución de trabajo (radio 50:1 de reactivos A y B). Los platos se incubaron a 60°C por 30min y la absorbancia se leyó a una longitud de onda 570nm en un lector espectrofotométrico de platos (Ultramark Microplate Systems) contra un blanco de Buffer de extracción.

- *SDS-PAGE de las muestras de proteína*

Se utilizó una cámara de electroforesis BIORAD mini PROTEAN II para la separación de proteínas de acuerdo a su tamaño en geles al 10% SDS-poliacrilamida. El gel se

colocó entre dos placas de vidrio separadas por espaciadores de 0.75mm en un soporte vertical. Luego de la polimerización del gel, este se colocó en tanques de electroforesis y se cubrió con buffer de corrido. Las muestras de proteína diluidas en buffer Laemmli se colocaron en los pozos y se llevó a cabo la electroforesis a 100V, en pozos paralelos se usaron estandares de proteína de pesos conocidos pre-marcados para estimar los tamaños de los productos investigados .

- *Detección de proteínas por Western blot*

Posterior a la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa usando una cámara de transferencia BIORAD Mini Trans-Blot. El gel se cubrió con la membrana de nitrocelulosa que se coloca entre papel Whatmann y dos esponjas de filtración. El montaje se colocó en un cassette de soporte, se insertó en un contenedor lleno de buffer de transferencia, con la membrana de nitrocelulosa mirando hacia el ánodo. La transferencia se llevó a cabo por 1h a 100V o durante la noche a 15V. Luego de la transferencia, la membrana se removió del ensamblaje y se incubó en solución tampón de bloqueo (5% leche descremada en TBS con 0.1% (v/v) Tween-20 (TBS-T)) por 1h o durante la noche a 4°C hasta que fue utilizada.

La membrana de nitrocelulosa se incubó con 5ml del anticuerpo primario correspondiente (anti-lámina, 2032 Cell Signaling, Figura 14) diluido en las concentraciones adecuadas en buffer de bloqueo por 2h o durante la noche a 4 ºC, se lavó 3 veces en TBS-T (5min/lavado). El anticuerpo unido se visualizó mediante incubación de la membrana con el anticuerpo secundario goat-antirabit IgG específico conjugado a peroxidasa (1:4000 en buffer de bloqueo) por 1h a temperatura ambiente y se lavó luego 3 veces con TBS-T (10min/lavado). El anticuerpo secundario unido se detectó usando un substrato quimioluminiscente para la peroxidada. La membrana se incubó con una mezcla 1:1 de los reactivos A y B de ECL por 1min, y se expuso a hiperfilm ECL para visualizar los productos por quimioluminiscencia; posteriormente las películas reveladas fueron escaneadas de manera convencional.

5.5.3 Análisis estadístico

Para determinar la significancia entre los diferentes tipos celulares (controles y experimentales) se realizaron los análisis de varianza de una vía con sus respectivas pruebas Post-Hoc para precisar donde se hallaban las diferencias. En el caso de comparación de medias por pares se usó la prueba t de Student correspondiente. Las variables fueron sometidas a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para verificar los supuestos de las pruebas estadísticas usadas, en caso de alejarse los supuestos se usaron pruebas alternas apropiadas para cada caso.

6.0 CAPITULO 3: RESUMEN, CONCLUSIONES E HIPOTESIS

6.1 Resumen de Resultados

En este trabajo se pretendió conocer los parámetros básicos del cultivo celular y de la morfología nuclear realizando un paralelo con un caso de SHG portador de la mutación clásica (G608G).

La proliferación celular, reflejada en la curvas de crecimiento y en el NDP, esta afectada en cultivos SWR mostrando un grado de variabilidad aparente intragrupo. Este hecho puede ser explicado por la falta de isogenicidad en las células usadas, obstáculo que podría superarse solo en el momento en el que se identifique la causa molecular que subyace al síndrome. Una vez identificado el posible gen, la introducción de este (en su estado patogénico) en células con un background definido permitirá resultados homogéneos eliminando gran parte del ruido observado.

Independiente de la heterogeneidad intragrupo, la tendencia hacia una proliferación deficiente observada en los dos pacientes concuerda con lo reporatado por Rautenstrauch & Snigula (1977) en donde la incorporación de timidina tritiada en fibroblastos pasaje 4 fue menor en una paciente SWR (8 meses) comparada con la incorporación en fibroblastos de su madre (36 años). Quizas el estudio de marcadores de proliferación como ki67 o PCNA puedan evaluar directamente la proliferación y complementar los resultados obtenidos.

Por ahora, la senescencia replicativa temprana no parece ser la explicación a la disminución en la proliferación. Alternativas como la apoptosis o el arresto del ciclo celular en algún punto específico se convierten en potenciales explicaciones para lo observado.

La disminución del tamaño nuclear en células de pacientes SWR es un hallazgo interesante teniendo en cuenta que el núcleo es el sitio preferido para la génesis de muchas de las entidades progeroides. Al igual que lo que sucede en SHG, establecer si las alteraciones en la morfometría nuclear son la causa de los demás defectos encontrados a nivel celular representa un reto. En un estudio con fibroblastos normales transfectados

con progerina se logró desacoplar la morfología nuclear anómala de los defectos de proliferación al eliminar la acción del supresor tumoral p53 (Kudlow et al., 2008), el resultado fue células con núcleos deformes que crecian de manera comparable a los controles sin la transfección. Por otra parte, al tratar fibroblastos SHG con inhibidores de la actividad farnesil transferasa (responsable de la prenilacion de la proteina, fig10) se reduce el número de núcleos deformes pero no las rupturas de doble hebra en el ADN registradas ni la detención del ciclo celular (Liu et al., 2006) .

Hasta el momento parece no existir un origen común entre SHG y SWR. Esto se basa en las diferencias encontradas en morfología nuclear, la ausencia de expresión de transcritos no convencionales del gen LMN A/C en SWR y los reportes de ausencia de mutaciones en la región codificante del gen en paciente SWR. Sin embargo, algunos datos de otros estudios como los discutidos en el apartado 5.4 indican que niveles reducidos (pero no la ausencia total) de proteínas preniladas de la lámina núclear podrían explicar, teoricamente, los hallazgos relacionados con la disminución del tamaño nuclear y la aparición de algunos fenotipos (de sistema nervioso y del tejido adiposo) observados en individuos SWR. De esta manera no se pueden descartar alteraciones en la region promotora de los genes LMN A/C, LMN B1 y LMN B2 o en cualquier factor que influya en la transcripción de estos genes como responsables moleculares del sindrome SWR.

6.2 Conclusiones

Crecimiento Celular:

• Los fibroblastos síndrome de Wiedemann Rautenstrauch presenta una disminución en el proceso de crecimiento al ser comparados con controles.

Senescencia Celular:

• No existe un fenómeno de senescencia marcado en pasajes tempranos de fibroblastos SWR

Morfología Nuclear:

• Los resultados sugieren que no existen alteraciones evidentes en la vía de maduración de la proteina lámina A que lleven a pensar en un origen etiológico común para le SWR y el SHG

•El fenotipo núcleos con perímetros disminuidos es un nuevo rasgo identificado en este estudio para los fibroblastos SWR. La relevancia de este hallazgo y la presencia de este fenotipo en otros tipos celulares de pacientes con SWR deberán ser determinados.

6.3 Hipótesis

De este estudio se derivan algunas hipótesis que cobran peso con los resultados:

La arquitectura nuclear entendida como una mezcla dinámica de compartimentos carentes de membrana de capacidad funcional variable esta afectada en celulas con SWR

Existen procesos diferentes a la senescencia replicativa que juegan un papel en la disminución de la proliferación celular en celulas SWR

Los niveles reducidos de las proteínas preniladas de la lámina pueden considerarse como posible explicación del origen del SWR.

7. Bibliografía

Akhtar A, Gasser SM. The nuclear envelope and transcriptional control. Nat Rev Genet. 2007 Jul;8(7):507-17

Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB: Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 89:10114–10118 (1992).

Arboleda G, Ramirez N, Arboleda H. The neonatal progeroid syndrome (Wiedemann-Rautenstrauch): A model for the study of human aging? Exp Gerontol. 2007 Oct; 42(10):939-43.

Arboleda H, Arboleda G. . Follow-up study of Wiedemann-Rautenstrauch syndrome: long-term survival and comparison with Rautenstrauch's patient "G". Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2005 Aug;73(8):562-8.

Arboleda H, Quintero L, Yunis E. Wiedemann-Rautenstrauch neonatal progeroid syndrome: report of three new patients. J Med Genet. 1997 May;34(5):433-7.

ATCC Cell Biology Catalog, 2007

Beavan LA, Quentin-Hoffmann E, Schönherr E, Snigula F, Leroy JG, Kresse H. Deficient expression of decorin in infantile progeroid patients. J Biol Chem. 1993 May 5;268(13):9856-62.

Berkson J, Magath T, Hurn M. The error of estimate of the blood cell count as made with the hemocytometer. Am J Physiol 128: 309-323, 1939.

Bird J, Ostler EL, Faragher RG. Can we say that senescent cells cause ageing? Exp Gerontol. 2003 Nov-Dec;38(11-12):1319-26.

Bitoun P, Lachassine E, Sellier N, Sauvion S, Gaudelus J. The Wiedemann- Rautenstrauch neonatal progeroid syndrome: a case report and review of the literature. Clin Dysmorphol. 1995 Jul;4(3):239-45.

Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. Nat Chem Biol. 2007 Oct;3(10):640-9.

Bluher M, Kahn BB, Kahn CR. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. Science. 2003 Jan 24;299(5606):572-4.

Bohr VA. Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance. Trends Biochem Sci. 2008 Dec;33(12):609-20.

Bonne G, Levy N. LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. Lancet. 2003 Nov 8;362(9395):1585-6

Bridger JM, Kill IR. Aging of Hutchinson-Gilford progeria syndrome fibroblasts is characterised by hyperproliferation and increased apoptosis. Exp Gerontol. 2004 May;39(5):717-24.

Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. Cell. 2005 Feb 25;120(4):513-22.

Cao H, Hegele RA. LMNA is mutated in Hutchinson-Gilford progeria (MIM 176670) but not in Wiedemann-Rautenstrauch progeroid syndrome (MIM 264090). J Hum Genet. 2003;48(5):271-4.

Castineyra G, Panal M, Lopez Presas H, Goldschmidt E, Sanchez JM. Two sibs with Wiedemann-Rautenstrauch syndrome: possibilities of prenatal diagnosis by ultrasound.
J Med Genet. 1992 Jun;29(6):434-6.

Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). Science. 2001 Jun 1;292(5522):1728-31.

Coschigano KT, Holland AN, Riders ME, List EO, Flyvbjerg A, Kopchick JJ. Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. Endocrinology. 2003 Sep;144(9):3799-810.

Cox LS. Cell senescence: the future of ageing?. Biogerontology. 2009 Jun;10(3):229-33

Crisp M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B, Stahl PD, Hodzic D. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. J Cell Biol. 2006 Jan 2;172(1):41-53.

Cristofalo VJ, Allen RG, Pignolo RJ, Martin BG, Beck JC. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Sep 1;95(18):10614-9.

D'Angelo MA, Raices M, Panowski SH, Hetzer MW. Age-dependent deterioration of nuclear pore complexes causes a loss of nuclear integrity in postmitotic cells. Cell. 2009 Jan 23;136(2):284-95.

Davies BS, Fong LG, Yang SH, Coffinier C, Young SG. The posttranslational processing of prelamin A and disease. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2009;10:153-74.

Dechat T, Pfleghaar K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L, Goldman RD. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. Genes Dev. 2008 Apr 1;22(7):832-53

De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M, Levy N. lámina a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. Science. 2003 Jun 27;300(5628):2055.

Devos EA, Leroy JG, Frijns JP, Van den Berghe H. The Wiedemann-Rautenstrauch or neonatal progeroid syndrome. Report of a patient with consanguineous parents. Eur J Pediatr. 1981 Jul;136(3):245-8.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 1995 Sep 26;92(20):9363-7.

Dominici FP, Argentino DP, Bartke A, Turyn D. The dwarf mutation decreases high dose insulin responses in skeletal muscle, the opposite of effects in liver. Mech Ageing Dev. 2003 Jul;124(7):819-27.

Dominici FP, Hauck S, Argentino DP, Bartke A, Turyn D. Increased insulin sensitivity and upregulation of insulin receptor, insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 in liver of Ames dwarf mice. J Endocrinol. 2002 Apr;173(1):81-94.

Drayton, S., Peters, G., 2002. Immortalisation and transformation revisited. Curr. Opin. Genet. Dev. 12, 98–104

Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, Dutra A, Pak E, Durkin S, Csoka AB, Boehnke M, Glover TW, Collins FS. Recurrent de novo point mutations in láminaA cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. Nature. 2003 May 15; 423(6937):293-8.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 2000 Nov 9;408(6809):239-47

Flurkey K, Papaconstantinou J, Miller RA, Harrison DE. Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jun 5;98(12):6736-41.

Fossel M. Human aging and progeria. J Pediatr Endocrinol Metab. 2000;13(suppl 6):1477–81.

Freshney, R.I. 1994. Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 4th Ed. HobokenNJ, John Wiley & Sons.

Frock RL, Kudlow BA, Evans AM, Jameson SA, Hauschka SD, Kennedy BK. Lamin A/C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation. Genes Dev. 2006 Feb 15;20(4):486-500

Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL, Hildebrandt AL, Coskran T, Black SC, Brees DJ, Wicks JR, McNeish JD, Coleman KG. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. J Clin Invest. 2003 Jul;112(2):197-208. Epub 2003 Jul 3.

George S, Rochford JJ, Wolfrum C, Gray SL, Schinner S, Wilson JC, Soos MA, Murgatroyd PR, Williams RM, Acerini CL, Dunger DB, Barford D, Umpleby AM, Wareham NJ, Davies HA, Schafer AJ, Stoffel M, O'Rahilly S, Barroso I. A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. Science. 2004 May 28;304(5675):1325-8.

Giannakou ME, Goss M, Jacobson J, Vinti G, Leevers SJ, Partridge L. Dynamics of the action of dFOXO on adult mortality in Drosophila. Aging Cell. 2007 Aug;6(4):429-38.

Grattarola M, Borghi C, Emionite L, Lulli P, Chessa L, Vergani L. Modifications of nuclear architecture and chromatin organization in ataxia telangiectasia cells are coupled to changes of gene transcription. J Cell Biochem. 2006 Nov 1;99(4):1148-64.

Güttinger S, Laurell E, Kutay U. Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009 Mar;10(3):178-91

Haithcock E, Dayani Y, Neufeld E, Zahand AJ, Feinstein N, Mattout A, Gruenbaum Y, Liu J. Age-related changes of nuclear architecture in Caenorhabditis elegans. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Nov 15;102(46):16690-5.

Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K.Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. J Cell Sci. 2001 Dec;114(Pt 24):4557-65.

Hayflick L and Moorhead P. The serial cultivation of human diploid cell strains Exp. Cell Res. 1961; 25, 585–621

Hekimi S, Guarente L. Genetics and the specificity of the aging process. Science. 2003 Feb 28;299(5611):1351-4.

Herbig, U., Jobling,W.A., Chen, B.P., Chen, D.J., Sedivy, J.M., 2004. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but Not p16(INK4a). Mol. Cell 14, 501–513.

Herbig, U., Sedivy, J.M., Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. Mech. Ageing Dev. 2006;127, 16–24.

Hoffmann K, Dreger CK, Olins AL, Olins DE, Shultz LD, Lucke B, Karl H, Kaps R, Müller D, Vayá A, Aznar J, Ware RE, Sotelo Cruz N, Lindner TH, Herrmann H, Reis A, Sperling K. Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huët anomaly). Nat Genet. 2002 Aug;31(4):410-4. Epub 2002 Jul 15.

Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloen A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. Nature. 2003 Jan 9;421(6919):182-7.

Hou JW, Wang TR. Clinical variability in neonatal progeroid syndrome. Am J Med Genet. 1995 Aug 28;58(2):195-6.

Hsieh CC, DeFord JH, Flurkey K, Harrison DE, Papaconstantinou J. Implications for the insulin signaling pathway in Snell dwarf mouse longevity: a similarity with the C. elegans longevity paradigm. Mech Ageing Dev. 2002 May; 123(9):1229-44.

Huang S, Risques RA, Martin GM, Rabinovitch PS, Oshima J. Accelerated telomere shortening and replicative senescence in human fibroblasts overexpressing mutant and wild-type láminaA. Exp Cell Res. 2007 Aug 16

Hutchison CJ. Lamins: building blocks or regulators of gene expression? Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Nov;3(11):848-58

Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. Methods Mol Biol. 2007;371:21-31. Review.

Johnson FB, Sinclair DA, Guarente L. Molecular biology of aging. Cell. 1999 Jan 22;96(2):291-302.

Jorgensen, P., N.P. Edgington, B.L. Schneider, I. Rupes, M. Tyers, and B. Futcher. The size of the nucleus increases as yeast cells grow. Mol. Biol. Cell. 2007; 18:3523–3532

Khatau SB, Hale CM, Stewart-Hutchinson PJ, Patel MS, Stewart CL, Searson PC, Hodzic D, Wirtz D. A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Nov 10;106(45):19017-22.

Katz ML, Robison WG Jr. What is lipofuscin? Defining characteristics and differentiation from other autofluorescent lysosomal storage bodies. Arch Gerontol Geriatr. 2002 May-Jun;34(3):169-84.

Kipling D, Davis T, Ostler EL, Faragher RG. What can progeroid syndromes tell us about human aging? Science. 2004 Sep 3;305(5689):1426-31.

Kirkwood TB, Austad SN. Why do we age? Nature. 2000 Nov 9;408(6809):233-8.

Kirkwood, T. B. L. Human senescence. BioEssays 18, 1009–1016 (1996))

Korniszewski, L., Nowak, R., Okninska-Hoffmann, E., Skorka, A., Gieruszczak-Bialek, D., Sawadro-Rochowska, M.,. Wiedemann–Rautenstrauch (neonatal progeroid) syndrome: new case with normal telomere length in skin fibroblasts. Am. J. Med. Genet. 2001; 445 (103): 144–148.

Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. J Clin Invest. 2004 Nov;114(9):1299-307.

Kudlow BA, Kennedy BK, Monnat RJ Jr. Werner and Hutchinson-Gilford progeria syndromes: mechanistic basis of human progeroid diseases. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 May;8(5):394-404.

Kudlow BA, Stanfel MN, Burtner CR, Johnston ED, Kennedy BK. Suppression of proliferative defects associated with processing-defective lamin A mutants by hTERT or inactivation of p53. Mol Biol Cell. 2008 Dec;19(12):5238-48.

Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. J Cell Sci. 2000 Oct;113 (Pt 20):3613-22.

Kutay U, Hetzer MW. Reorganization of the nuclear envelope during open mitosis. Curr Opin Cell Biol. 2008 Dec;20(6):669-77

Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. Aging Cell. 2006 Apr;5(2):187-95.

Libina N, Berman JR, Kenyon C. Tissue-specific activities of C. elegans DAF-16 in the regulation of lifespan. Cell. 2003 Nov 14; 115(4):489-502.

Liu Y, Rusinol A, Sinensky M,Wang Y, Zou Y. 2006. DNA damage responses in progeroid síndromes arise from defective maturation of prelamin A. J. Cell. Sci. 119:4644–49

Määttä A, Järveläinen HT, Nelimarkka LO, Penttinen RP.Fibroblast expression of collagens and proteoglycans is altered in aspartylglucosaminuria, a lysosomal storage disease. Biochim Biophys Acta. 1994 Feb 22;1225(3):264-70.

Maier AB, le Cessie S, de Koning-Treurniet C, Blom J, Westendorp RG, van Heemst D.
Persistence of high-replicative capacity in cultured fibroblasts from nonagenarians. Aging Cell. 2007 Feb;6(1):27-33.

Malfait F, Coucke P, Symoens S, Loeys B, Nuytinck L, De Paepe A. The molecular basis of classic Ehlers-Danlos syndrome: a comprehensive study of biochemical and molecular findings in 48 unrelated patients. Hum Mutat. 2005 Jan;25(1):28-37.

Mallampalli MP, Huyer G, Bendale P, Gelb MH, Michaelis S. Inhibiting farnesylation reverses the nuclear morphology defect in a HeLa cell model for Hutchinson-Gilford progeria syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Oct 4;102(40):14416-21.

Martin GM, Sprague CA, Epstein CJ. Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. Lab Invest. 1970 Jul; 23(1):86-92.

Martin GM. Genetic modulation of senescent phenotypes in Homo sapiens. Cell. 2005 Feb 25;120(4):523-32.

Mathon NF, Malcolm DS, Harrisingh MC, Cheng L, Lloyd AC. Lack of replicative senescence in normal rodent glia. Science. 2001 Feb 2;291(5505):872-5.

McClintock D, Gordon LB, Djabali K. Hutchinson-Gilford progeria mutant lamin A primarily targets human vascular cells as detected by an anti-Lamin A G608G antibody. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 14;103(7):2154-9..

Medawar, P. B. An Unsolved Problem of Biology.Lewis, London. 1952.

Mekhail K, Seebacher J, Gygi SP, Moazed D. Role for perinuclear chromosome tethering in maintenance of genome stability. Nature. 2008 Dec 4;456(7222):667-70.

Merideth MA, Gordon LB, Clauss S, Sachdev V, Smith AC, Perry MB, Brewer CC, Zalewski C, Kim HJ, Solomon B, Brooks BP, Gerber LH, Turner ML, Domingo DL, Hart TC, Graf J, Reynolds JC, Gropman A, Yanovski JA, Gerhard-Herman M, Collins FS, Nabel EG, Cannon RO 3rd, Gahl WA, Introne WJ. Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. N Engl J Med. 2008 Feb 7;358(6):592-604.

Morales LC, Arboleda G, Rodríguez Y, Forero DA, Ramírez N, Yunis JJ, Arboleda H. Absence of Lamin A/C gene mutations in four Wiedemann-Rautenstrauch syndrome patients. Am J Med Genet A. 2009 Nov 24;149A(12):2695-2699

Murga M, Bunting S, Montaña MF, Soria R, Mulero F, Cañamero M, Lee Y, McKinnon PJ, Nussenzweig A, Fernandez-Capetillo O. A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. Nat Genet. 2009 Aug;41(8):891-8

Najjar SS, Salem GM, Idriss ZH. Congenital generalized lipodystrophy. Acta Paediatr Scand. 1975 Mar;64(2):273-9.

Narita, M., S. Nunez, E. Heard, A. W. Lin, S. A. Hearn, D. L. Spector, G. J. Hannon, and S. W. Lowe. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. Cell. 2003..113:703–716.

Narita, M., M. Narita, V. Krizhanovsky, S. Nunez, A. Chicas, S. A. Hearn, M. P. Myers, and S. W. Lowe. A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. Cell. 2006. 126: 503–514.

Navarro CL, Cau P, Lévy N. Molecular bases of progeroid syndromes. Hum Mol Genet. 2006 Oct 15;15 Spec No 2:R151-61.

Neumann, F.R., and P. Nurse. Nuclear size control in fi ssion yeast. J. Cell Biol. 2007; 179:593–600.

Nowak, R., Sawadro-Rochowska, M., Siwicki, J.K., Korniszewski, L. Wiedemann–Rautenstrauch syndrome's fibroblasts display a normal in vitro lifespan. Am. J. Med. Genet. A 2006; 140: 661–662.

Oberdoerffer P, Sinclair DA. The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Sep;8(9):692-702.

Padiath QS, Saigoh K, Schiffmann R, Asahara H, Yamada T, Koeppen A, Hogan K, Ptácek LJ, Fu YH. Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. Nat Genet. 2006 Oct;38(10):1114-23.

Pivnick EK, Angle B, Kaufman RA, Hall BD, Pitukcheewanont P, Hersh JH, Fowlkes JL, Sanders LP, O'Brien JM, Carroll GS, Gunther WM, Morrow HG, Burghen GA, Ward JC. Neonatal progeroid (Wiedemann-Rautenstrauch) syndrome: report of five new cases and review. Am J Med Genet. 2000 Jan 17;90(2):131-40.

Prüfert K, Vogel A, Krohne G. The lamin CxxM motif promotes nuclear membrane growth. J Cell Sci. 2004 Dec 1;117(Pt 25):6105-16.

Puzianowska-Kuznicka M, Kuznicki J. Genetic alterations in accelerated ageing syndromes. Do they play a role in natural ageing? Int J Biochem Cell Biol. 2005 May;37(5):947-60.

Ralle T, Grund C, Franke WW, Stick R. Intranuclear membrane structure formations by CaaX-containing nuclear proteins. J Cell Sci. 2004 Dec 1;117(Pt 25):6095-104.

Rautenstrauch T, Snigula F, Wiedemann HR. Neonatal progeroid syndrome (Wiedemann-Rautenstrauch). A follow-up study. Klin Padiatr. 1994 Nov-Dec;206(6):440-3.

Rautenstrauch T, Snigula F. Progeria: a cell culture study and clinical report of familial incidence. Eur J Pediatr. 1977 Jan 26; 124(2):101-11.

Reddy KL, Zullo JM, Bertolino E, Singh H. Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. Nature 2008;452:243–247.

Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, Bartek J, Scharffetter-Kochanek K, Jansen-Durr P, Wlaschek M. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. Aging Cell. 2006 Oct;5(5):379-89.

Rodemann HP, Bayreuther K, Francz PI, Dittmann K, Albiez M. Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. Exp Cell Res. 1989 Jan;180(1):84-93.

Rubin H. Promise and problems in relating cellular senescence in vitro to aging in vivo. Arch Gerontol Geriatr. 2002 May-Jun;34(3):275-86.

Russell SJ, Kahn CR. Endocrine regulation of ageing. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Sep;8(9):681-91.

Scaffidi P, Misteli T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. Science. 2006 May 19;312(5776):1059-63

Selman C, Lingard S, Choudhury AI, Batterham RL, Claret M, Clements M, Ramadani F, Okkenhaug K, Schuster E, Blanc E, Piper MD, Al-Qassab H, Speakman JR, Carmignac D, Robinson IC, Thornton JM, Gems D, Partridge L, Withers DJ. Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. FASEB J. 2007 Oct 10; In press.

Sherr CJ, DePinho RA. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? Cell. 2000 Aug 18;102(4):407-10.

Shiels C, Adams NM, Islam SA, Stephens DA, Freemont PS. Quantitative analysis of cell nucleus organisation. PLoS Comput Biol. 2007 Jul;3(7):e138. Review.

Shumaker DK, Solimando L, Sengupta K, Shimi T, Adam SA, Grunwald A, Strelkov SV, Aebi U, Cardoso MC, Goldman RD. The highly conserved nuclear lamin Ig-fold binds to PCNA: its role in DNA replication. J Cell Biol. 2008 Apr 21;181(2):269-80.

Starr DA. A nuclear-envelope bridge positions nuclei and moves chromosomes. J Cell Sci. 2009 Mar 1;122(Pt 5):577-86.

Stuurman N, Heins S, Aebi U. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. J Struct Biol. 1998;122(1-2):42-66.

Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C. L. and Burke, B. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. J. Cell Biol. 1999; 147, 913-919.

Tang DG, Tokumoto YM, Apperly JA, Lloyd AC, Raff MC. Lack of replicative senescence in cultured rat oligodendrocyte precursor cells. Science. 2001 Feb 2;291(5505):868-71.

Tatar M, Bartke A, Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. Science. 2003 Feb 28;299(5611):1346-51.

Thorey F, Jager M, Seller K, Krauspe R, Wild A. Kyphoscoliosis in Wiedemann-Rautenstrauch-syndrome (neonatal progeroid syndrome). Z Orthop Ihre Grenzgeb. 2003 May-Jun;141(3):341-4.

Tzur YB, Margalit A, Melamed-Book N, Gruenbaum Y. Matefin/SUN-1 is a nuclear envelope receptor for CED-4 during Caenorhabditis elegans apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Sep 5;103(36):13397-402.

Ulrich J, Rudin C, Bubl R, Riederer BM. The neonatal progeroid syndrome (Wiedemann-Rautenstrauch) and its relationship to Pelizaeus- Merzbacher's disease. Neuropathol Appl Neurobiol. 1995; 21:116–120.

Vergnes L, Péterfy M, Bergo MO, Young SG, Reue K. Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jul 13;101(28):10428-33.

Vlcek S, Foisner R. Lamins and lamin-associated proteins in aging and disease. Curr Opin Cell Biol. 2007 Jun;19(3):298-304.

Wallis CV, Sheerin AN, Green MH, Jones CJ, Kipling D, Faragher RG.Fibroblast clones from patients with Hutchinson-Gilford progeria can senesce despite the presence of telomerase.Exp Gerontol. 2004 Apr;39(4):461-7.

Wang Y, Panteleyev AA, Owens DM, Djabali K, Stewart CL, Worman HJ. Epidermal expression of the truncated prelamin A causing Hutchinson-Gilford progeria syndrome: effects on keratinocytes, hair and skin. Hum Mol Genet. 2008 Aug 1;17(15):2357-69.

Warner HR, Sierra F; American Society for Cell Biology. Nuclear architecture and disease. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2006

Wiedemann HR. An unidentified neonatal progeroid syndrome: follow-up report. Eur J Pediatr. 1979 Jan 18;130(1):65-70.

Williams, G. C. Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. Evolution 11, 398–411 (1957)

Wilson KL. Integrity matters: linking nuclear architecture to lifespan. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Dec 27;102(52):18767-8.

Yang SH, Bergo MO, Toth JI, Qiao X, Hu Y, Sandoval S, Meta M, Bendale P, Gelb MH, Young SG, Fong LG. Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jul 19;102(29):10291-6.

Young SG, Fong LG, Michaelis S. Prelamin A, Zmpste24, misshapen cell nuclei, and progeria--new evidence suggesting that proteinfarnesylation could be important for disease pathogenesis.J Lipid Res. 2005 Dec;46(12):2531-58.

Zanotti S, Negri T, Cappelletti C, Bernasconi P, Canioni E, Di Blasi C, Pegoraro E, Angelini C, Ciscato P, Prelle A, Mantegazza R, Morandi L, Mora M. Decorin and biglycan expression is differentially altered in several muscular dystrophies. Brain. 2005 Nov;128(Pt 11):2546-55.

Zhang R, Poustovoitov MV, Ye X, Santos HA, Chen W, Daganzo SM, Erzberger JP, Serebriiskii IG, Canutescu AA, Dunbrack RL, Pehrson JR, Berger JM, Kaufman PD, Adams PD. Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. Dev Cell. 2005 Jan;8(1):19-30.

Zhang R, Chen W, Adams PD. Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. Mol Cell Biol. 2007 Mar; 27(6):2343-58.

ANEXO : *CONSENTIMIENTO INFORMADO*

Hoja de información sobre consentimiento para la donación de tejido y/o muestra de sangre con fines de investigación

Titulo del estudio: Análisis genético-molecular-celular del Síndrome Progeroide Neonatal (Síndrome de Widemann Rautenstrauch): relevancia como modelo para estudio del envejecimiento humano.

Entidades financiadoras: COLCIENCIAS - Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología "Francisco José de Caldas" y Universidad Nacional de Colombia - División de Investigación Sede Bogotá.

Investigador Principal: Dr. Humberto Arboleda Granados, Universidad Nacional de Colombia.

Esta forma se hace con el propósito de solicitar su permiso para la colección de una o más piezas pequeñas de tejido (piel) y/o una muestra de sangre como individuo caso (ó control) para ser usado en investigaciones futuras que aporten al entendimiento, tratamiento, diagnosis de enfermedades relacionadas con el proceso de envejecimiento.

Procedimiento

Se solicitara su permiso para el almacenamiento del tejido indefinidamente en las instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia.

El material que decidiera donar será almacenado con su nombre, edad, género, grupo étnico e historial clínico de enfermedades. Cuando usted concede el permiso para que este material sea almacenado y usado en investigación, usted también está dando permiso para que los investigadores revisen su información médica con el fin de constatar su estado de salud y para realizar estudios con esta información. Este tejido no será usado en investigación a menos que el estudio que haga uso del mismo haya sido aprobado por los comités de ética respectivos que tiene la Universidad Nacional de Colombia.

Duración:

El material será almacenado indefinidamente y usted podrá ser contactado(a) para obtener información de su estado de salud.

Riesgos:

Existen algunos riesgos inherentes al procedimiento de la toma de la muestra. Entre estos se incluye sangrado de la herida, infección, y posible daño al tejido anexo. Es importante resaltar que el procedimiento será realizado por un medico con experiencia en toma de muestras y con los implementos necesarios para dicha labor. Con esto se pretende minimizar los riesgos anteriormente mencionados.

Si usted decide conceder el permiso para la obtención y uso de su muestra el material que usted done será usado para investigación en biología celular y molecular. Las investigaciones tienen como objetivo identificar factores biológicos que contribuyan al proceso de envejecimiento humano y los problemas de salud asociados.

Hay varias cosas que usted necesita saber antes de dar su consentimiento para la donación y uso de su muestra:

1. Adicional a su nombre, existe otra información suya que estará conectada a la muestra donada. Por ejemplo, información acerca de su etnicidad, género e historial médico que pueden estar disponibles para los investigadores que están estudiando su muestra.
2. No se pretende con este estudio suministrar información biológica o genética del donante a su familia o a cualquier otra persona u organización protegiendo así la confidencialidad de los datos del donante.
3. Usted tiene el derecho de rechazar o permitir que la muestra donada o sus derivados sean guardados o usados para investigaciones futuras. Usted puede retirar su participación en cualquier momento y retirar cualquier muestra derivada después de su retiro.
4. La investigación biológica y específicamente la información genética genera preguntas difíciles acerca de informar al donante sobre cualquier resultado obtenido o de resultados futuros. Algunas personas se sienten ansiosas acerca de la posibilidad de tener un gen “defectuoso” que pueda representar riesgo para la persona o para sus hijos. Algunas personas desean saber acerca de cualquier hallazgo con respecto a su muestra; otras personas no. Los riesgos de no conocer lo que es encontrado incluyen no ser consciente de si hay un

tratamiento para el problema que está siendo estudiado. Sin embargo, estos riesgos pueden cambiar dependiendo si hay un tratamiento o cura para una enfermedad en particular. La decisión final depende de la persona.

Estos son los riesgos mejor conocidos y los retos que presenta la investigación. Puede sin embargo existir otros riesgos que no conozcamos aun.

Costos y compensaciones

Usted no será remunerado económicamente por la donación de su muestra. Al mismo tiempo la donación no implicará gasto alguno para usted por su participación

Preguntas acerca del estudio

Si Usted tiene alguna pregunta acerca del estudio usted puede contactar a

Dr. Humberto Arboleda Granados, Investigador Principal
Instituto de Genética
Universidad Nacional de Colombia,
Bogotá, Colombia
Teléfono: 3165000 ext 11613

Declaración del participante :

He recibido una explicación acerca del estudio mencionado arriba. Yo comprendo y consiento la donación de tejido como individuo caso (ó control) para ser usado en investigaciones médicas. Se me ha suministrado de esta forma para mi información. Si tengo cualquier pregunta acerca del estudio soy consciente de que puedo contactar a la persona mencionada arriba.

_____ _____

Firma del Participante: Fecha de la declaración:

CC: