



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Genética y Biología Molecular

**“Determinación del daño al DNA y proteínas en tardígrados
Hypsibius exemplaris con dosis fraccionadas y agudas de
radiación ionizante”**

T E S I S

Que presenta

Biol. José Alejandro Ramírez Rosas

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directoras de tesis

Dra. María del Refugio Bermúdez Cruz

CINVESTAV (Departamento de Genética y Biología Molecular)

Dra. Eliana Andrea Beltrán Pardo

Colscience. Director de Investigación Colombia Bogotá. UCLA Staff

Research associate. Radiation Oncology Department.

Ciudad de México

Febrero, 2017

AGRADECIMIENTOS

A mis padres José Ramírez Ferral y Leticia Rosas Gamundi, con gran respeto y cariño por su apoyo incondicional a pesar de todo lo ocurrido durante mi formación, porque siempre creyeron en mí, tuvieron ese consejo, ese abrazo y ese regaño necesario en su momento, con todo eso haciendo de mí un hombre de bien, espero nunca más volver a fallarles y prometo encontrar la forma de pagarles todo lo que me han brindado, los amo con todo mi corazón.

A mi hermano Carlos Eduardo Ramírez Rosas, por siempre haber sido mi cómplice, mi soporte, que no solo eres mi hermano sino también eres mi mejor amigo, gracias por haberme permitido compartir contigo tantas cosas aun con nuestras diferencias, sabemos que cariño siempre habrá del uno para el otro.

A mi familia tanto los Ramírez Ferral y los Rosas Gamundi que siempre estuvieron pendientes, siempre pidiendo por mi bien, siempre apoyándome, los amo.

A Maricarmen García Álvarez y Luis Santiago que muy bien saben que son mi pequeña familia, gracias por todos esos consejos, jalones de oreja, esos jueves en familia que pasábamos y que a pesar de que no los vea tan seguido los amo muchísimo.

A la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, por haber confiado siempre en mí y el haberme permitido realizar mi trabajo de tesis en su laboratorio.

A la Dra. Eliana Andrea Beltrán Pardo, por siempre estar al pendiente de mi trabajo, por el apoyo brindado durante el proyecto, por su tiempo y dedicación.

A la Dra. María Luisa Bazán Tejeda, por siempre darnos ánimo cuando las cosas no iban bien, por siempre hacernos ver el lado bueno de las cosas y el alentarnos a no bajar los brazos.

A mis asesores el Dr. Luis Marat Alvarez Salas, el Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe y el Dr. Nicolás Addiel Serafín Higuera, por su tiempo, su dedicación y el siempre tener un buen consejo.

Al Biol. Enrique García Villa, al Dr. Rodolfo Ocadiz Delgado, a la C. Gabriela Mora Macías y el C. Lauro Macías González, por el apoyo brindado para poder desarrollar mi proyecto.

A ti Ari que has sido mi compañera a lo largo de toda esta travesía llena de altibajos que gracias a ti fueron mucho mas fácil de sobrellevar, gracias por no dejarme caer y siempre alentarme a ser mejor, por todos esos momentos difíciles y por todos esos otros momentos llenos de alegría.

A todos mis compañeros de laboratorio, Ulises, Esteban, Fabi, Uber, MariTere y Paco sin su gran apoyo hubiera sido aún más difícil terminar mi proyecto.

A mis amigos de Cinvestav Alex, Sandy, Lalo, Mauricio, Ruth, Mayram y Cesar gracias por todas las alegrías, consejos, regaños, por siempre estar ahí, ustedes son parte importante de todo esto.

Al CINVESTAV por ser una institución con ganas de formar cada día gente mejor preparada y haberme dado la oportunidad de superarme como persona, dejo en cada rincón un recuerdo de tantos años vividos bajo tu techo, siempre será para mí un orgullo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para poder realizar mis estudios de maestría, por medio de la beca con número (CVU/Becario): 626936/608552.

A todos ustedes, mi mayor reconocimiento y gratitud

Resumen

Los tardígrados, también conocidos como “osos de agua”, son organismos microscópicos pluricelulares conocidos por su tolerancia a ambientes extremos entre los que destacan el sobrevivir a temperaturas altas (hasta 151°C), temperaturas por debajo del punto de congelación (-200°C), la exposición a radiación ionizante (3-5 KGy) e incluso al efecto de vacío en el espacio, así como a la radiación cósmica. Se han realizado estudios para comprender los mecanismos que les confieren estas características, entre las condiciones estudiadas se encuentra la radiación gamma, ya que ésta tiene un efecto dual dentro de las células, causando rupturas de doble cadena del DNA y provocando la radiólisis de moléculas, lo que genera radicales libres ($\bullet\text{OH}$), los cuales propician un ambiente oxidativo dentro de las células. El objetivo de este trabajo fue el analizar el efecto de la radiación gamma tanto en el DNA como en las proteínas del *Hypsibius exemplaris*, midiendo los niveles de la histona H2A.X como marcador de daño del DNA y los niveles de carbonilación mediante la derivatización de la 4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) por inmunodetección. La inmunodetección de la Histona H2A.X no reveló señal en ninguno de los grupos, esto sugiere que no hay una acumulación de daño al DNA, bajo las condiciones del ensayo. Por otro lado, en el caso de la detección de los niveles de carbonilación tampoco se observó un cambio significativo entre el grupo control y los grupos tratados con radiación bajo las condiciones utilizadas, lo que sugiere que existe un mecanismo que podría estar contrarrestando el efecto de las especies reactivas de oxígeno. En conclusión, los resultados sugieren que el tardígrado *Hypsibius exemplaris* podría no estar acumulando suficiente daño al DNA como para ser detectado, así como muestran una aparente tendencia a protección de sus proteínas ante la radiación gamma, lo cual sugiere un mecanismo que trabaja activamente en su estado activo el cual evita que proteínas sean oxidadas por las ROS generadas por la radiación gamma.

Summary

The tardigrades, also known as "water bears", are multicellular microscopic organisms known for their tolerance to extreme environments, among which are survival at high temperatures (up to 151°C), at temperatures below freezing (-200°C), exposure to ionizing radiation (3-5 KGy) and even to the effect of vacuum in space, as well as to cosmic radiation. Several studies have been carried out to understand the mechanisms that give them these characteristics, among the studied conditions, it is important to analyze the role of the gamma radiation since it has a dual effect inside the cells and causes double-strand DNA breaks and radiolysis of the molecules, which generates free radicals (\bullet OH), promoting an oxidative environment within the cells. The objective of this work was to analyze the effect of gamma radiation on *Hypsibius exemplaris* both DNA and proteins, measuring the levels of histone H2A.X as a marker of DNA damage and carbonylation levels through the derivatization of 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) detected by immunodetection. Immunodetection of Histone H2A.X did not reveal any signal in any of the groups, suggesting that there is no accumulation of DNA damage under the conditions of the assay. On the other hand, in the case of the detection of carbonylation levels, no significant change was observed between the control group and the groups treated with radiation under the conditions of this test. In conclusion, the results suggest that the tardigrade *H. exemplaris* may not be accumulating enough DNA damage to be detected, as well as, although not conclusive, showing an apparent tendency for protection to proteins from gamma radiation, suggesting a mechanism that works actively in its active state which prevents proteins from being oxidized by ROS generated by gamma radiation.

ÍNDICE

1. Introducción	
1.1. Daño al DNA.....	1
1.1.1. Efecto de la radiación ionizante.....	1
1.1.2. Efecto de las especies reactivas de oxígeno.....	2
1.2. Reparación del DNA.....	3
1.2.1. Reparación homóloga.....	4
1.2.2. Reparación de extremos no homólogos.....	7
1.3. El efecto de radiación en organismos.....	10
1.4. Tardígrados.....	10
2. Antecedentes.....	12
3. Justificación.....	15
4. Hipótesis.....	15
5. Objetivos.....	15
5.1. Objetivo General.....	15
5.2. Objetivos Específicos.....	15
6. Estrategia Experimental.....	16
7. Materiales y métodos.....	16
8. Resultados.....	20
9. Discusión.....	34
10. Conclusión.....	37
11. Perspectivas.....	37
12. Bibliografía.....	38

Introducción

1.1. Daño al DNA

Las células para sobrevivir tienen que superar diversas condiciones de adversidad como lo es el daño al DNA (por factores endógenos y exógeno), tales como las especies reactivas de oxígeno y la radiación ionizante (IR, por sus siglas en inglés), y tienen el potencial de inducir daños reparables e irreparables (Gladyshev and Meselson 2008) (Pearl et al. 2015). Los daños más comunes al DNA incluyen los aductos de bases, inserción/delección, mal apareamiento de sus bases, entrecruzamiento entre hebras, ruptura de una sola cadena (SSB, por sus siglas en inglés) y rupturas de doble cadena (DSB, por sus siglas en inglés) (Hosoya y Miyagawa 2014).

1.1.1. Efecto de la radiación ionizante

Las radiaciones ionizantes son aquellas radiaciones con energía suficiente para ionizar la materia, desplazando los electrones de sus estados ligados al átomo. Los tipos de la radiación ionizante son: alfa, beta, gamma, neutrones y rayos X, las cuales están presentes en nuestro ambiente en rocas, suelos, hasta en la radiación cósmica y en dispositivos médicos. Cada tipo de radiación es clasificada según su efecto (directo o indirecto) y su densidad ionizante [transferencia lineal de energía (LET, por sus siglas en inglés)]. Dependiendo de la cantidad de energía transferida a la materia, la radiación se clasifica ya sea como LET alta (rayos alfa) o LET baja (beta y gamma). La acumulación de IR puede dañar de manera directa o indirecta al DNA. Por ejemplo, por la radiólisis del agua circundante para generar radicales hidroxilo altamente reactivos ($\bullet\text{OH}$) los cuales forman parte de las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés; Friedberg et al. 2006; Desouky, Ding, and Zhou 2015). También causa SSB con la particularidad de que los sitios de ruptura tienen unido en su extremo 3' un grupo fosfato o un grupo fosfoglicolato en lugar de tener un grupo 3'-OH (Henner et al. 1983; Henner, Grunberg, y Haseltine 1983). La lesión más severa inducida al DNA por la radiación ionizante son las DSBs, formadas por los múltiples sitios dañados

cercanos entre ellos y en ambas cadenas del DNA (Lomax, Folkes, y O'Neill 2013), las cuales causan rearrreglos cromosomales, mutaciones, deleciones e inestabilidad genómica en general. Las DSB son reparadas por dos vías principales: la recombinación homóloga (HR, por sus siglas en inglés) o por la unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés; Figura 1; Mladenov et al. 2016).

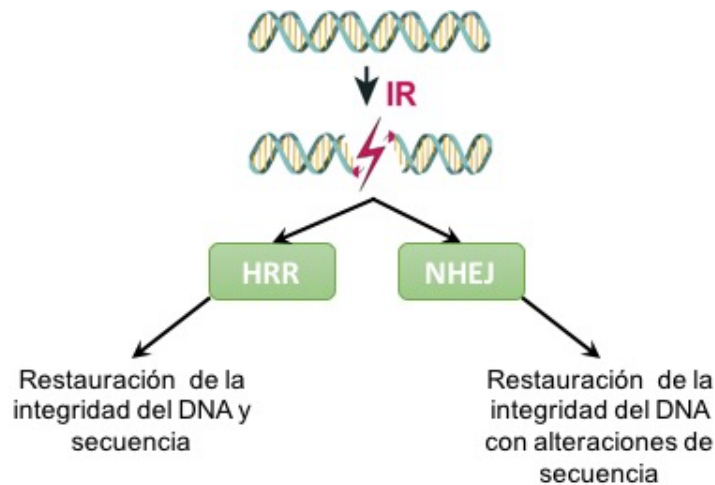


Fig. 1. Principales vías de reparación de DSB. Modificado de Mladenov (2016). Aquí se muestran las 2 principales vías de reparación celular ante el rompimiento de doble cadena por un lado está la HRR en la cual se restaura la integridad tanto genómica como de secuencia del DNA, por el otro está la NHEJ en la cual se restaura la integridad genómica, pero hay alteraciones en la secuencia del ADN.

1.1.2. Efecto de las especies reactivas de oxígeno

El daño causado por las ROS incluye alteraciones en las bases del DNA (oxidación de la Guanina en el residuo 8) las cuales pueden causar mutaciones permanentes, carbonilación de proteínas o pérdida de grupos sulfhidrilo, llevando a la inactivación de enzimas y el incremento de la proteólisis y peroxidación de ácidos grasos de la membrana. Algunas enzimas antioxidantes tienen la capacidad de neutralizar el efecto de ROS convirtiéndolas a moléculas menos reactivas, entre ellas se encuentran las superóxido dismutasas, peroxidasas y catalasas, entre otras (Yu 1994).

1.2. Reparación del DNA

Uno de los eventos iniciales después de la generación de DSB, consiste en la fosforilación de la variante de histona H2AX de mamíferos en el residuo 139, denominada γ H2AX. Esta modificación se propaga de una manera bidireccional, aunque no necesariamente simétrica, sobre dominios grandes rodeando la lesión, abarcando de 1 a 2 kilobases (Kb) en mamíferos, y da lugar a los llamados “focos de reparación del DNA” (Iacovoni et al. 2010; Lee et al. 2013). La γ H2AX se genera por la cinasa ataxia talangiectasia-mutada (ATM) de la familia de cinasas de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K). En mamíferos, el mapeo a lo largo del genoma reveló que la actividad de ATM está relativamente restringida a las regiones que rodean las DSB que van desde aproximadamente de 2 a 10 kb (10, RiN). La cromatina sufre una rápida relajación dependiente de la poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) e independiente de H2AX/ATM inmediatamente después de la inducción de la DSB, seguido de una recondensación dependiente de H2AX/ATM (Burgess et al. 2014; Khurana et al. 2014; Kruhlak et al. 2006; Smeenk et al. 2013; Strickfaden et al. 2016). De manera importante, esta segunda condensación es requerida para la completa activación de la respuesta al daño del DNA (Burgess et al. 2014). Estos movimientos a gran escala pueden promover el uso de distintos sustratos y vías adecuadas de reparación, el secuestro/aislamiento físico del locus roto sin reparar y la señalización al citoplasma para obtener una respuesta celular adecuada (Marnef and Legube 2017).

1.2.1. Reparación homóloga

La reparación homóloga (HR, por sus siglas en inglés) está altamente conservada, es un mecanismo de reparación libre de errores el cual opera con los mismos principios tanto en bacterias como en humanos. Los extremos de la DSB son reconocidos y procesados para generar extremos 3' libres de cadena sencilla, a través de un proceso llamado resección de extremos de

DNA, (Figura 2). Las proteínas involucradas en la resección incluyen a Mre11, Rad50 y Nbs1, las cuales constituyen al complejo MRN. Mre11 tiene una actividad de endonucleasa de cadena sencilla dependiente de Mn^{2+} , así como de actividad de exonucleasa 3'-5' en DNA de cadena sencilla y doble (Paull 2015). La dimerización de MRE11 es esencial para su actividad, unión al DNA, y su interacción con Rad50 (G. J. Williams, Lees-Miller, and Tainer 2010; R. S. Williams et al. 2008) Rad50 posee actividad regulatoria de ATPasa y de adenilato kinasa, interactúa con el DNA y junto con Mre11 forman el núcleo del complejo MRN (G. J. Williams, Lees-Miller, and Tainer 2010). Rad50 estimula la unión al DNA y la actividad de nucleasa de Mre11 y facilita el anclaje al DNA del complejo MRN. NBS1 no tiene actividad enzimática reportada, pero su reclutamiento en la DSB es esencial para el reclutamiento y activación de ATM y la iniciación de la respuesta al daño del DNA (DDR, por sus siglas en inglés). Nbs1 tiene un dominio FHA ("Forkhead"-asociado) que se une a fosfopéptidos y un tándem de repetidos BRCT (Cáncer de Mama 1 Carboxilo Terminal) estructuralmente divergentes uniendo las actividades del núcleo de MRN a proteínas fosforiladas en respuesta al daño en DNA (Lloyd et al. 2009; R. S. Williams et al. 2009). Una proteína importante que interactúa con NBS1 a través de los dominios FHA/BRCT es la nucleasa CtIP (Figura 2). CtIP juega un papel esencial en la activación del complejo MRN y la iniciación de la resección (Eid et al. 2010; Makharashvili and Paull 2015). Datos recientes sugieren que CtIP controla la resección al redirigir la función de MRN: de sensor del daño en DNA a activador de resección (You and Bailis 2010). Como la actividad de nucleasa de MRN no puede generar los productos observados después de la resección en los DSB cuando son preparados para la HR, se cree que el papel de MRN se limita a las etapas iniciales del proceso de reparación, es decir solo se enfoca en realizar la resección inicial y la parte gruesa junto con otras nucleasas la lleva a cabo CtIP. En efecto, la actividad de la exonucleasa 1 (Exo1) y del complejo Dna2/BLM está implicado en la formación de los extremos 3' libres de cadena sencilla. La Exo1 es reclutada al sitio de DSB por CtIP y actúa principalmente en DNA de doble cadena con

extremos 5' libres, los cuales son productos probables del corte estimulado por CtIP a partir de los cortes de Mre11 (MRN) (Cannavo, Cejka, and Kowalczykowski 2013). El componente BLM del complejo Dna2/BLM, pertenece a la familia de las helicasas de RecQ las cuales utilizan ATP para desenrolla los extremos 3' del DNA (Croteau et al. 2014). Este junto con Dna2, el cual muestra similitudes estructurales con la proteína RecB bacteriana, forman un complejo esencial para la formación de extremos 3' libres de cadena sencilla en los sitios de DSB en eucariontes. La Dna2 tiene actividad tanto de endonucleasa 3' en DNA de cadena sencilla (ssDNA, por sus siglas en inglés) como de helicasa, aunque solo la actividad de endonucleasa está implicada en la resección (Mimitou and Symington 2011; Yeeles and Dillingham 2010), y ésta es disminuida por el recubrimiento del ssDNA con la proteína de replicación A (RPA, por sus siglas en inglés) (Kim et al. 2005). El ssDNA recubierto por la RPA es el sustrato principal para el reclutamiento del intercambio de cadenas por las enzimas de recombinación, las recombinasas, y también está involucrada en otros aspectos de la DDR (H. Wang et al. 2001; Y. Wang et al. 1999). Las recombinasas esenciales en eucariontes son Dmc1 y Rad51. Mientras Dmc1 está implicada en la recombinación meiótica, Rad51 es la recombinasa esencial en la HRR en células mitóticas (Figura 2). El ssDNA recubierto por RPA generado en el paso de resección regula de manera negativa la unión del filamento de Rad51. Por lo tanto, una serie de proteínas mediadoras (Rad52, BRCA2, Rad54 y parálogos de Rad51) asisten al desplazamiento de RPA de los extremos 3' libres de cadena sencilla. BRCA2 en eucariontes superiores y Rad52 en levadura, es un mediador principal en la HRR, se une al DNA formando un heptámetro y facilita la carga de los monómeros de Rad51 en el ssDNA reemplazando a RPA (Figura 2). La interacción del dominio C-terminal TR2 de BRCA2 con Rad51 estabiliza el filamento de la nucleoproteína de Rad51, y una fosforilación CDK (ciclina dependiente de kinasa) dependiente de la serina 3291 (S3291), da el cambio molecular para la activación de la actividad de recombinasa de Rad51 (Esashi et al. 2005). BRCA2 es reclutada al sitio de DSB a través de BRCA1, el cual

une la cromatina de manera dependiente de ubiquitinación. BRCA1 también interactúa con PALB2, la cual se sabe que acompaña a BRCA1 (Prakash et al. 2015; Xia et al. 2006). Para la formación del filamento de Rad51, las proteínas mediadoras llamadas parálogos de Rad51 son muy importantes (Figura 2). Estas proteínas comparten una similitud de 20-30% con Rad51 (Masson et al. 2001; Suwaki, Klare, and Tarsounas 2011) y están organizados en dos complejos proteicos diferentes los cuales intervienen en distintas etapas de la HRR: Rad51B-Rad51C-Rad51D-XRCC2 (BCDX2) y Rad51C-XRCC (CX3) (Chun, Buechelmaier, and Powell 2013). Después de la formación del filamento de Rad51 y la invasión de cadena, la HRR puede seguir la vía de alineamiento de cadena dependiente de síntesis (SDSA, por sus siglas en inglés) o la vía de la reparación de la DSB (DSBR, por sus siglas en inglés), esto dependiendo si una o dos uniones de Holliday se forman acoplando uno o dos extremos de la DSB (Ip et al. 2008; Kaur, DeMuyt, and Lichten 2015; Symington and Holloman 2008).

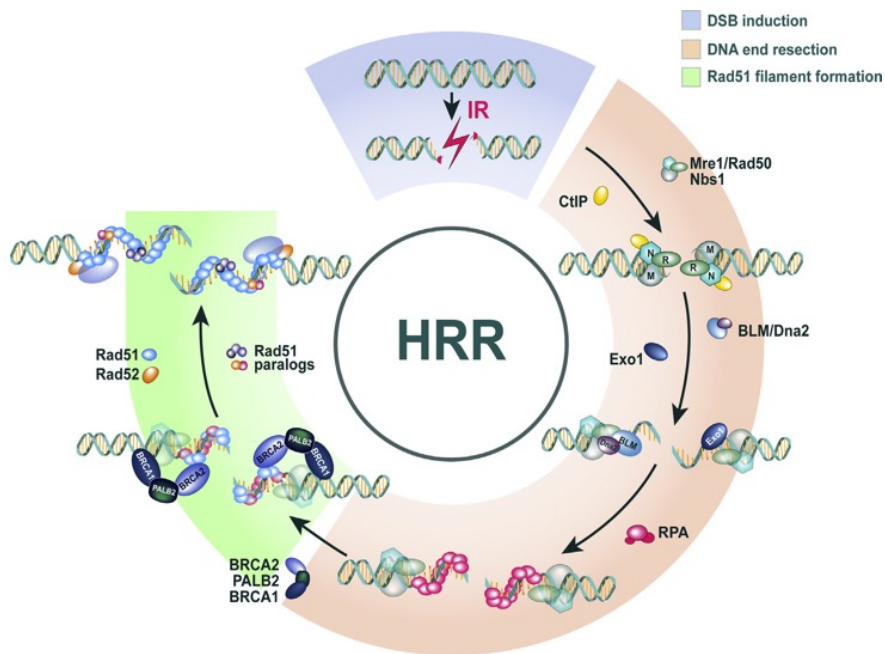


Fig. 2. Representación gráfica del mecanismo de la vía de HRR. Tomado de Mladenov (2016). En esta vía, el complejo MRN reconoce el DSB y junto a CtIP comienza la resección de los extremos, posteriormente se reclutan Exo1 y el complejo BLM/Dna2 para generar extremos 3' y 5' de cadena sencilla los

cuales serán protegidos por la proteína RPA y servirá para el reclutamiento de las recombinasas BRCA2, PALB2 y BRCA1, así como a Rad51, Rad52 y los parálogos de Rad51 para formar un filamento previo a la búsqueda de la secuencia homóloga.

1.2.2. Reparación de extremos no homólogos.

La unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés) es otra de las maquinarias de reparación importantes para eliminar DSB. A comparación de la HR, la NHEJ no requiere la cromátide homóloga como templado para reparar DSB en el DNA (Bétermier, Bertrand, and Lopez 2014). Ku es la primera molécula que reconoce y se une a la DSB (Figura 3; Chiruvella, Liang, and Wilson 2013; Fell and Schild-Poulter 2015) esto debido a su extremadamente alta afinidad. Ku está compuesta de dos polipéptidos con tamaños de cerca de 70 y 86 kDa, estas tienen dominios bien caracterizados (Downs and Jackson 2004). No hay una actividad enzimática prominente asociada con Ku, pero reportes recientes indican que la unión de Ku a los extremos del DNA estimulan la actividad de la 5'-deoxiribosa-5'-fosfato (5'-dRP) y la abásico, apúrico/aprimídico (AP) liasa, las cuales escinden los nucleótidos dañados cerca de los extremos del DNA (Roberts et al. 2010; N. Strande et al. 2012). La lisina 31 (K31) de Ku70 es el sitio primario de catálisis en la reacción nucleofílica, asistido por la lisina 160 (K160) y seis residuos de lisina adicionales de la subunidad Ku80 (N. T. Strande et al. 2014). La función principal de Ku en la NHEJ es la de reclutar al sitio de la DSB la subunidad catalítica de la proteína kinasa dependiente de DNA (DNA-PKcs, por sus siglas en inglés; Figura 3). El ensamble del complejo Ku/DNA-PKcs (DNA-PK) estimula la actividad de cinasa del complejo DNA-PK y orquestan la NHEJ (Davis, Chen, and Chen 2014; Hill and Lee 2010; Jessica A. Neal and Meek 2011; Radhakrishnan, Jette, and Lees-Miller 2014). Con cerca de 450 kDa de peso molecular, DNA-PKcs es el miembro más grande de la familia de cinasas relacionadas a fosfatidilinositol-3-kinasa (PIKK, por sus siglas en inglés), la cual incluye a ATM y ATR (Kong et al. 2011). El complejo DNA-PK

fosforila a un arreglo de proteínas implicadas en la DDR y regula a la NHEJ y el procesamiento de la DSB. Sin embargo, el evento de fosforilación más importante mediado por la DNA-PKcs es su autofosforilación, lo cual es un paso crítico en el procesamiento de las DSB (J. A. Neal et al. 2014). La DNA-PKcs tiene al menos dos regiones de autofosforilación las cuales van de los residuos 2023 al 2056 y del 2609 al 2647 y fueron denominados como regiones PQR y ABCDE, respectivamente (Uematsu et al. 2007). Hay evidencia de que la autofosforilación de la DNA-PKcs en la serina 2609 relaja su interacción con los extremos del DNA y facilita la unión de los extremos. En contraste, la autofosforilación de residuos de serina dentro de la región PQR inhibe el procesamiento de la DSB (Uematsu et al. 2007).

El complejo DNA-PK está involucrado en la fosforilación y reclutamiento al sitio de la DSB de la nucleasa Artemisa (Moshous et al. 2001; Figura 3). Artemisa tiene actividad de exonucleasa de cadena sencilla 5'-3' y actividad endonucleasa 5' y 3' dependiente de DNA-PKcs en horquillas y en extremos libres de cadena sencilla (Goodarzi et al. 2006; Inagaki et al. 2007; Niewolik et al. 2006). Durante la autofosforilación de la DNA-PKcs, se reclutan múltiples proteínas para actividades relacionadas con el procesamiento del sitio de ruptura con el fin de preparar los extremos para su ligación. Las polimerasas μ y λ son miembros de la familia X de polimerasas de DNA y adicionan los nucleótidos faltantes en los extremos de la DSB (Daley et al. 2005; Paull 2005). La estructura cristalizada de la pol λ sugiere que esta hace contacto con el grupo 5' fosfato de la cadena de DNA y ayuda en la estabilización de ambos extremos de la DSB (Garcia-Diaz et al. 2004). La deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT, por sus siglas en inglés), también conocida como DNA nucleotidiltransferasa (DNNTT), cataliza la adición de nucleótidos en el extremo 3' de la molécula de DNA, sin la necesidad de un DNA como templado durante la NHEJ. La TdT muestra una mayor afinidad por extremos 3' libres de cadena sencilla, pero esta también puede adicionar nucleótidos en extremos 3' romos (Boubakour-Azzouz et al. 2012).

Todos estos pasos en el procesamiento de los extremos del DNA los hace compatibles para su ligación, una función que también es regulada por el complejo DNA-PK y es mediado por el módulo de ligación del DNA Ligasa4/XRCC4/XLF (Figura 3). A pesar de que XRCC4 y XLF no muestran homología alguna a nivel aminoacídico, sus estructuras tridimensionales muestran una muy alta similitud. Estas no tienen actividad enzimática conocida y se cree que su papel es de estabilizar los extremos del DNA. En efecto, reportes recientes sugieren que XLF estimula la ligación a través de una estructura de filamento de dímeros alternantes de XRCC4 y XLF los cuales sirven de puente entre los extremos del DNA (Andres et al. 2012; Roy et al. 2015). Un nuevo integrante de la superfamilia XRCC4 fue identificado, el parólogo de XRCC4 y XLF (PAXX o C9orf142) es otro mediador importante de la NHEJ, el cual es reclutado al sitio de la DSB e interactúa directamente con Ku (Figura 3). PAXX promueve la ligación de los extremos del DNA de manera Ku dependiente (Ochi et al. 2015).

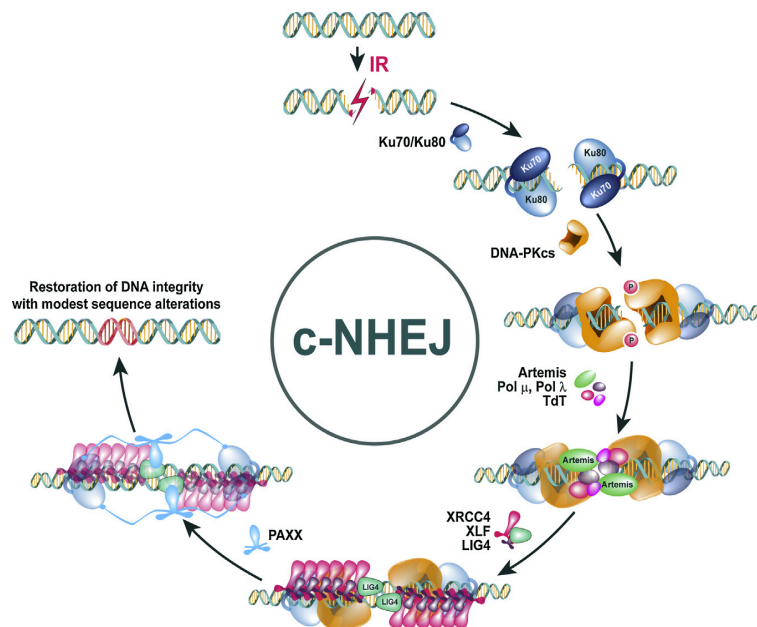


Fig. 3. Representación gráfica del mecanismo de la vía de reparación de NHEJ. Tomada de Mladenov (2016). En esta vía, el DSB es reconocido por Ku70 y Ku80, las cuales van a reclutar a la DNA-PKcs la cual al autofosforilarse recluta a la nucleasa Artemisa, así como a las polimerasas μ y λ , y a TdT para el procesamiento de los extremos del DSB para hacerlos compatibles. El DSB

posteriormente es estabilizado por el complejo Ligasa4/XRCC4/XLF y ligado por la ligasa PAXX.

1.3. El efecto de radiación en organismos

La unidad de medida de la radiación gamma se da en Grays (Gy). En mamíferos, dosis altas de radiación ionizante son letales. La dosis media letal (LD₅₀, por sus siglas en inglés) es aproximadamente de 7 Gy en ratones y de 4 Gy en humanos (Held 2006). En general, los procariontes exhiben una tolerancia mucho más alta a la radiación en comparación con los animales. Por ejemplo, la LD50 para *Escherichia coli* va desde los 50 hasta cientos de Gy dependiendo de la cepa. Sin embargo, casi todas las *E. coli* mueren cuando son irradiadas con 2 kGy (Byrne et al. 2014). Por otro lado, *Deinococcus radiodurans*, la cual es una de las bacterias más conocidas por su radiotolerancia, ya que ha sobrevivido sin perder viabilidad después de haber sido irradiada con 7 kGy de radiación gamma (Krisiko and Radman 2010). Cuando *D. radiodurans* es irradiada, su DNA genómico sufre una violenta fragmentación, pero su DNA fragmentado es corregido rápidamente hasta que el genoma es recircularizado completamente por un extenso sistema de reparación del DNA (Zahradka et al. 2006a). Dentro de los animales, los rotíferos bdelloideos y las larvas de *Polypedilum vanderplanki* (quironómido dormilón) tienen la habilidad de entrar en anhidrobiosis; en este estado de deshidratación ellos pueden soportar algunos miles de Gy de radiación gamma (Gladyshev y Meselson 2008; Watanabe et al. 2006). Los tardígrados, metazoos microscópicos también llamados “osos de agua”, conocidos por su mostrar una amplia tolerancia a condiciones extremas (deseccación congelación, radiación) (Guidetti, Altiero, and Rebecchi 2011; Jönsson et al. 2008; Møbjerg et al. 2011) son invertebrados pequeños de un tamaño de entre 0.1 a 1 mm (Schokraie et al. 2012) y están distribuidos ampliamente en todo el mundo bajo diferentes condiciones ambientales (Horikawa et al. 2006).

1.4. Tardígrados.

Los tardígrados son invertebrados acuáticos descubiertos por el zoólogo alemán Goeze en 1773. Su cuerpo va de 0.1-1.2 mm de largo, tienen simetría bilateral con una cutícula quitinosa compuesta por 5 segmentos; uno de ellos es la cabeza y los otros 4 son segmentos del tronco con un par de patas en cada uno de ellos (G. Mayer et al. 2013; Figura 4). Son organismos tanto de agua dulce como marinos y también pueden ser encontrados en películas de agua sobre musgos y líquenes también conocidos como ambientes limno-terrestres (Ramazzoti and Maucci, 1983). Debido a que su movimiento es lento fueron denominados Tardigrada, del latín tardigradus, de caminar lento, por Spallanzani en 1776. Los tardígrados tienen su propio filo llamado Tardigrada, junto con los filos Artropoda y Nematoda, forma parte del superfilo Ecdizosoa. La cercana posición filogenética de los tardígrados con dos de los invertebrados modelo mejor estudiados, *Caenorhabditis elegans* (nemátodo) y *Drosophila melanogaster* (artrópodo), lo hace un modelo muy atractivo para el estudio de mecanismos moleculares de evolución y desarrollo (Mali et al. 2010). En estudios basados en sus capacidades de tolerancia se ha observado que tienen una tolerancia muy alta a diferentes tipos de radiación: ~5000 Gy de radiación Gamma (Horikawa et al. 2006), Rayos X (May et al., 1964), partículas alfa (Horikawa et al. 2006), protones (Nilsson, Jönsson, and Pallon 2010) y radiación UV (Altiero et al. 2011), entre otros factores tanto físicos como químicos. Sin embargo, los mecanismos directamente implicados en estas capacidades de supervivencia a tales condiciones no han sido dilucidados. Las especies más estudiadas pertenecen a la categoría ecológica de los limno-terrestres. La única especie de tardígrado no limno-terrestre que ha sido utilizado para estudios con radiación y hasta el momento es la especie de agua dulce *Hypsibius exemplaris*.

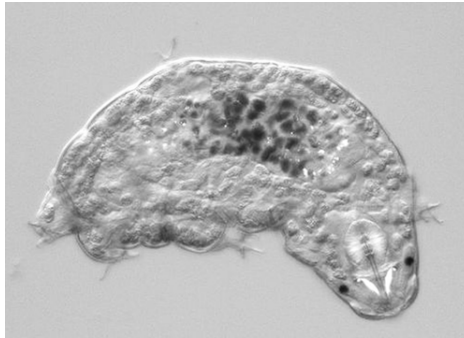


Fig. 4. Imagen de *H. exemplaris* con el alga *Chlorococcum sp* en su estómago. Glime (2013)

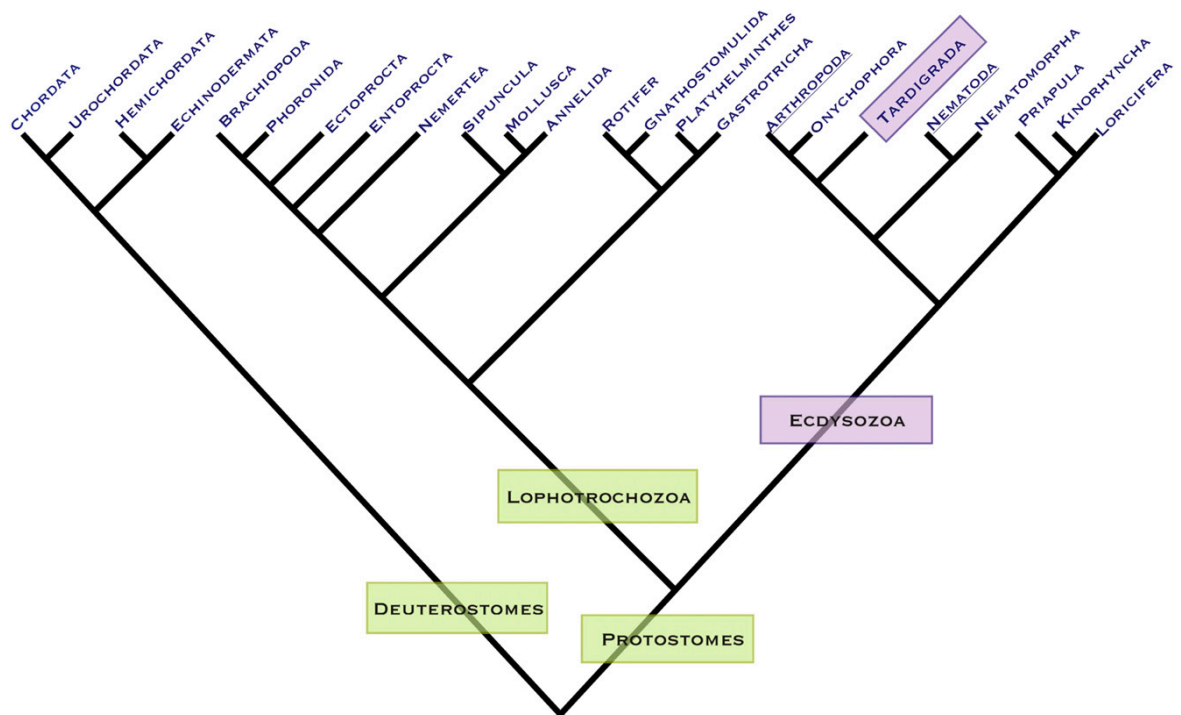


Fig. 5. Posición evolutiva de los tardígrados. Tomado de Gabriel et al. (2007). Los tardígrados tienen su propio filo llamado Tardigrada, junto con los filos Artrópoda y Nematoda, forma parte del superfilo Ecdizosoa.

2. Antecedentes directos

Los estudios sobre el daño al DNA por radiación y su reparación en tardígrados son relativamente escasos. Estudios del efecto de la radiación gamma en tardígrados muestran que estos poseen una gran tolerancia a este tipo de radiación. E. Beltrán-Pardo et al. (2015) caracterizo la tolerancia de *H. exemplaris* a la radiación gamma (LD50/48 4200 Gy) y de manera interesante

encontraron que su tolerancia es parecida a la mostrada por tardígrados como *Milnesium tardigradum* (5000 Gy) y *Richtersius coronifer* (3500 Gy; Jönsson, Harms-Ringdahl, and Torudd 2005). Así mismo, los autores encontraron que los tardígrados son tolerantes a la radiación, incluso en las etapas iniciales del desarrollo (Beltrán-Pardo et al, resultados no publicados). De manera semejante, existe una diferencia en la tolerancia a la radiación en estado desecado y en estado hidratado, Horikawa et al. (2006) compararon el efecto de la radiación Gamma para la supervivencia a corto plazo en ambos estados y observaron diferencias significativas en la supervivencia a partir de las 2 hrs post-irradiación con dosis superiores a los 6000 Gy, donde los organismos hidratados mostraron una mayor supervivencia en comparación con los desecados a estas dosis.

Contribuyendo al esfuerzo por entender los mecanismos detrás de la alta tolerancia de estos organismos a la radiación, algunos reportes han indicado que la expresión de diversas proteínas (HSP70; Jönsson and Schill 2007; RAD51; Beltrán-Pardo et al. 2013; proteína fotoliasa; Horikawa et al. 2013) y transcritos (familia DNAJ; Förster et al. 2012) han mostrado alta expresión durante condiciones de estrés en tardígrados, sin embargo, los estudios no son concluyentes en términos de su asociación directa como medio por el cual se da la tolerancia. Por otro lado, el análisis de la secuenciación del genoma completo de *Ramazottius varieornatus* (Hashimoto et al. 2016) se identificó una proteína supresora de daño (denominada Dsup), la cual al ser expresada en cultivos de células HeLa y tratados con radiación ionizante observaron que el daño al DNA producido disminuyó un 40% en comparación con el control (células HeLa irradiadas sin transfectar; Hashimoto et al. 2016).

Por otro lado, Neumann et al. (2009) realizaron ensayos cometa en *M. tardigradum* encontrando que estos acumulan daños en el DNA cuando pasan tiempos prolongados en estado desecado y una vez que son rehidratados este daño va siendo reparado. Horikawa et al. (2013), determinaron que *R. varieornatus* expuesto a UVC sufre daño en su DNA y puede repararlo en 18 horas postexposición, tanto en condiciones de luz como de oscuridad. Por otro

lado, Rebecchi et al. (2009) midieron el daño al DNA y los resultados parecen indicar que el principal agente causal de daño al DNA son las ROS cuando los tardígrados se encuentran en estado desecado y los únicos agentes de estrés son la humedad relativa y la temperatura. En cuanto a organismos similares, en rotíferos bdelloideos o en el *Polypedilum vanderplanki* el daño generado por la desecación en DNA y reparación es una adaptación evolutiva para sobrevivir episodios de desecación la cual es característica de su hábitat natural (Gladyshev y Meselson 2008). Sin embargo, no se han hecho estudios que midan el daño y reparación al DNA en tardígrados expuestos a radiación gamma en dosis agudas y/o fraccionadas. De acuerdo al estudio de Hashimoto et al, 2016, y Hashimoto y Kunieda (2017) se sugiere que el DNA en tardígrados es protegido de alguna forma de los efectos de la radiación. Sin embargo, no hay confirmación a nivel molecular. Solamente se ha visto mayor supervivencia en células humanas cuando éstas expresan la proteína Dsup de tardígrado y que la proteína Dsup parece tener afinidad al DNA y se localiza en el núcleo de células humanas.

Por otro lado, estudios en *D. radiodurans* demostraron tanto el efecto directo como el efecto indirecto de la radiación gamma (producción de ROS); Zahradka et al. (2006) observo que con 7 Gy aunque el DNA se degrada, este es reparado 4.5 hrs post-irradiación, recuperando así su integridad. Por otro lado, Krisko y Radman (2010) observaron que a dosis no letales, *D. radiodurans* tiene la capacidad de contrarrestar los efectos de las ROS ya que el nivel de carbonilación de proteínas es mínimo, lo cual sugiere que el mecanismo de esta bacteria para contrarrestar los efectos de la radiación gamma es la protección a su proteoma, entre estas proteínas las de reparación tienen un papel crucial para poder reparar y restaurar su integridad genómica. Finalmente, Beltrán Pardo y colaboradores, encontraron mediante estudios de fraccionamiento de la radiación gamma en el tardígrado *H. exemplaris*, que estos animales al ser expuestos a una dosis aguda de 500 Gy tienen mayor supervivencia que al ser expuestos a fracciones de 100 Gy*5 con 24 h de recuperación (resultados no publicados). Esto indica que parecen tener un

límite de tolerancia al daño acumulado. Similar a lo descrito por Gladyshev y Meselson (2008) con rotíferos. Esto sugiere que la formación de ROS es el principal factor y que este puede afectar DNA y proteínas.

3. Justificación

Estudiar el efecto de ROS en las proteínas (carbonilación) y en el DNA (oxidación de la guanina y consecuente rompimiento de las 2 cadenas reflejado en incremento en los niveles de fosforilación de la H2A.X) en el tardígrado *H. exemplaris* es esencial y podría contribuir al entendimiento de los mecanismos mediante los cuales estos animales sobreviven a la radiación.

4. Hipótesis

H. exemplaris posee como mecanismo de supervivencia a altas dosis de radiación:

- 1) Un sistema de protección al DNA el cual disminuye el daño.
- 2) Un sistema que protege las proteínas y esto permite la supervivencia.
- 3) Una combinación de protección al DNA y a las proteínas.

5. Objetivos

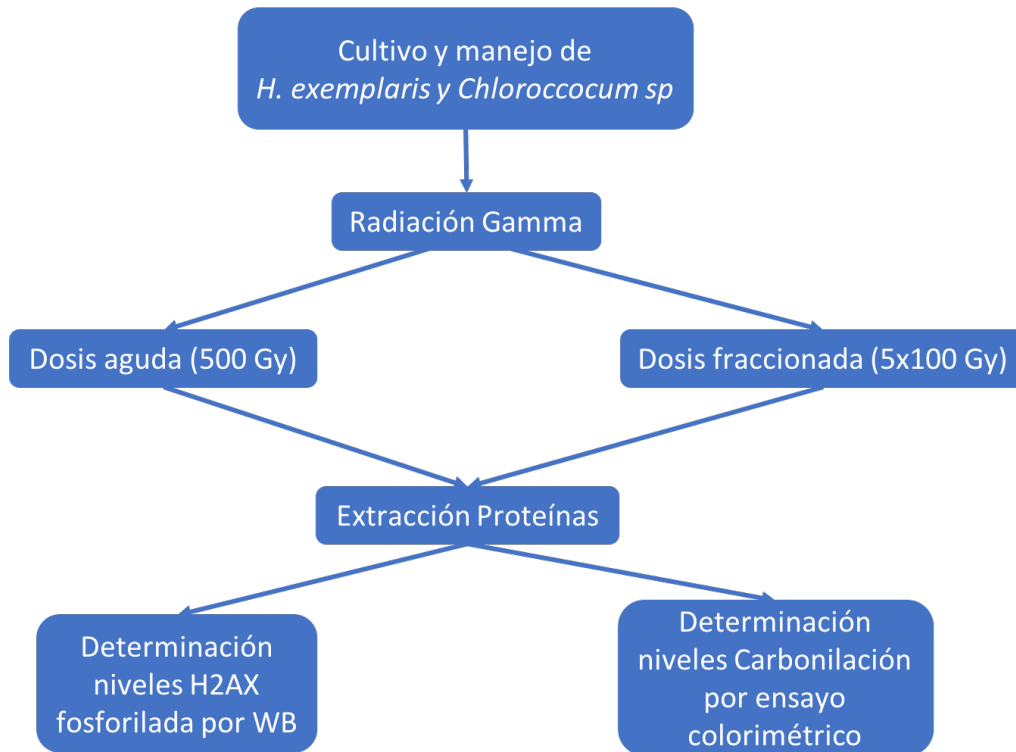
5.1. Objetivo General

Determinar el daño al DNA y proteínas en *H. exemplaris* ante radiación Gamma en dosis fraccionada y aguda.

5.2. Objetivos Específicos

- 1) Montaje del cultivo de *H. exemplaris*
- 2) Determinar los niveles de la histona H2AX, como marcador de daño al DNA en *H. exemplaris*, ante exposición a dosis fraccionadas y agudas de radiación gamma (500 y 5x100 Gy).
- 3) Determinar los niveles de carbonilación en las proteínas de *H. exemplaris*, ante exposición a dosis fraccionadas y agudas de radiación gamma (500 y 5x100 Gy).

6. Estrategia Experimental



7. Materiales y métodos

7.1. Cultivo de *Chlorococcum sp.*

Chlorococcum sp. es utilizada principalmente para alimentar al tardigrado *H. exemplaris* y fue cultivado según el protocolo propuesto por McNuff (2007). El cultivo se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml. Como medio de cultivo se utilizó agua bidestilada estéril a la cual se le adicionó el fertilizante comercial líquido Bayfolan forte®, el cual previo a su uso fue esterilizado por filtración y se diluyeron 200 µl en 1 lt de agua bidestilada estéril, con un volumen de 150 ml de medio de cultivo. Ya que las algas necesitan una luminosidad de al menos 2000 luxes, el cultivo se llevó dentro de un condensador de luz con focos de 1200 luxes cada uno, se llevó a una temperatura de 25°C. Los tiempos de cosecha se realizaron cada 3 semanas, la cosecha se hizo en esterilidad tomando con una pipeta toda el alga que se encontraba en el fondo y poniéndola en tubos Falcon de 15 ml, los cuales se dejaban reposando 16 hr para concentrar el alga en el fondo.

7.2. Cultivo de tardigrado *H. exemplaris*.

Los cultivos de *H. exemplaris* (Z151, Sciento, UK, <https://www.sciento.co.uk>) fueron cultivados según el protocolo propuesto por McNuff (2007). Para el cultivo de *H. exemplaris* se utilizaron cajas de Petri P35 con agua bidestilada estéril y se alimentaron con 50 µl de concentrado de alga, el tiempo de duplicación de población es de 3 semanas. Una vez establecido el cultivo en cajas de Petri se llevó un cultivo en matraz Erlenmeyer con 150 ml de medio Chalkley (soluciones stock: NaCl 2g, KCl 0.08g, CaCl₂ 0.12g en 1 lt) más extracto de suelo (5ml de cada solución stock, 20 ml de extracto de suelo y se afora a 1 lt; McNuff, 2007) y el alga *Chlorococum sp* (4 ml de concentrado) como alimento. El cultivo de *H. exemplaris* se mantuvo a 14°C en una enfriadora de vinos, la cual es una temperatura óptima para la producción y eclosión de huevos, con fotoperiodo de alrededor de L:S de 14-10 hrs en un lugar con sombra.

7.3. Extracción de proteínas

En las primeras condiciones del ensayo se adicionaron 35 µl de buffer Laemmli + 2µl de Quitinasa (c6137, Sigma, U.S.A), se incubó 30 min a 27°C y posteriormente se sonicó por 10 seg a 45%, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min. 40 µl de muestra se fue colocada en 1 carril de un gel de acrilamida el 10%, y la electroforesis se realizó por 1 hr a 100 V, el gel se tiñó con azul de Coomassie por 20 min y se destiñó por 2 hrs, en este caso no se obtuvo proteína (resultados no mostrados).

Para optimizar condiciones, en el siguiente ensayo, se partió de un volumen inicial de 20 µl y se adicionaron 10 µl de Quitinasa + 6 µl de RIPA Mix (Tris-Hcl pH: 8 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Desoxicolato Na⁺ 0.5%, Triton 1%, Complete®) y se incubó 1 hr a 37°C, después se adicionaron 14 µl de buffer RIPA y se incubó por 30 min en hielo. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se adicionaron 20 µl de buffer Laemmli + 30µl de agua bidestilada y 5 % del volumen final de 2-

betamercaptoetanol. Por ultimo, Se tomó 1 ml del matraz con tardígrados y se pusieron en una caja de Petri P35 y se rellenó con agua bidestilada estéril; con una pipeta se contaron y se separaron 2000 en otra caja de Petri P35 para separarlos del alga y se dejaron 2 días sin comida. Posteriormente se pasaron a un microtubo de 1.5 ml, se dejaron sedimentar por 1 hr en agitación, se retiró la mayor parte del agua dejando 20 μ l y se adicionaron 14 μ l de quitinasa dejándola actuar por 1 hr a 37°C. Para la lisis se adicionó buffer ripa y se incubó por 30 min en hielo, después se dieron 3 ciclos de congelación/descongelación de 2 min cada uno, seguido de una microhomoginización con el motor inalámbrico kimble (Sigma-aldrich, Z359971) por 30 seg. Después la muestra se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante. Para cuantificar las muestras se utilizó el método de Bradford (Bradford 1976).

7.4. Determinación de los niveles de la histona H2A.X por inmunodetección.

Se seleccionaron tardígrados en 3 grupos y se realizó el ensayo de inmunodetección con 3 grupos: control, dosis aguda de 500 Gy e irradiados con dosis fraccionada 100 Gy*5 (por 5 días). Posteriormente se realizó la extracción de proteínas.

Se cargaron 50 μ g de cada muestra en un gel de acrilamida al 12%, las muestras corrieron a 120 V por 1 hr, se hizo transferencia a una membrana de PVDF en cámara húmeda a 200 mA por 1 hr, la membrana fue teñida con rojo de Ponceau para corroborar la transferencia, se bloqueó la membrana con leche al 5% por 1 hr, posteriormente se incubó con el anticuerpo primario, anti-histona H2A.X (07-164, Millipore, U.S.A) a una dilución de 1:1000 con 10% de BSA toda la noche a 4°C, se dieron 3 lavados de 5min con TBS-T, se incubó el anticuerpo secundario anti conejo (W4018, Promega, U.S.A) a una dilución 1:10,000 por 1 hr a temperatura ambiente, finalmente, se dieron 3 lavados de 5 min con TBS-T (Trisma 13.9 g, NaCl 87.66 g, Tris-HCl 60.6 g, 1% Tween 20 por 1 lt), se agregaron los sustratos quimioluminiscentes y se reveló en cuarto oscuro.

7.5. Determinación de los niveles de Carbonilación.

Para este ensayo, se utilizó el kit Oxyblot™ para detección de proteínas oxidadas (S7150, Millipore, U.S.A). En un microtubo de 1.5 ml se cargaron 20 µg de proteína (~300 organismos) preferentemente en un volumen inicial de 5 µl, se tomaron 2 alícuotas de cada muestra. Se desnaturalizaron las muestras adicionando 5µl de SDS al 12% para tener una concentración final del 6%. De las 2 alícuotas de cada muestra, una fue sujeta a derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), el cual sirvió como control positivo y para el control negativo esta muestra fue tratada con la solución control (Buffer sin DNPH), adicionando 10 µl de cada reactivo y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente, pasado este tiempo se adicionan 7.5µl de la solución de neutralización en ambos tubos junto con 2-betamercaptoetanol en una concentración final de 0.74 M. Después, las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 10%, y la electroforesis se realizó a 100 V por 1 hr, posteriormente se hizo la transferencia a una membrana de PVDF en cámara húmeda a 300 mA por 1 hr, la membrana se incubó por 1 hr a temperatura ambiente en buffer de bloqueo/dilución (1% BSA/PBS-T) en agitación, esto seguido de la adición del anticuerpo anti-DNPH en una dilución 1:150 y se incubó 1 hr a temperatura ambiente en agitación, se dieron 3 lavados a la membrana con PBS-T 1X uno de 15min y 2 de 5 min. El anticuerpo secundario se preparó en una dilución 1:300 y se incubó por 1 hr a temperatura ambiente en agitación, se dieron 3 lavados a la membrana con PBS-T 1X uno de 15 min y 2 de 5 min, se adicionaron los sustratos quimioluminiscentes y se reveló en cuarto oscuro.

7.6. Determinación de los niveles de α -tubulina por inmunodetección.

En un gel de acrilamida al 10% y usando como control positivo un extracto de proteínas de *G. duodenalis*, se cargaron 20 µg de proteína dejando un carril vacío entre cada muestra, la electroforesis se realizó por 1 hr a 100 V. Posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa

por 1 hr a 300 mA en cámara húmeda, se tiñó con rojo de ponceau para corroborar la transferencia y se bloqueó la membrana con leche al 10% y se incubó 1 hr en agitación. La membrana se lavó 3 veces con TBS-T por 5 min y se adicionó el anticuerpo TAT-1 (Woods et al. 1989) en una dilución 1:15,000 con 1% de leche y se incubó en agitación toda la noche a 4°C, se lavó la membrana 3 veces con TBST-T por 5 min, se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón (Promega, W402B) en una dilución 1:30,000 y se incubó por 1 hr en agitación a temperatura ambiente, se lavó 3 veces con TBS-T por 5 min, se adicionaron los sustratos quimioluminiscentes y se reveló en cuarto oscuro.

8. Resultados

8.1 Cultivo *H. exemplaris*

Los tardígrados *H. exemplaris* fueron cultivados según el protocolo propuesto por McNuff (2007), durante el periodo de aclimatación y establecimiento del cultivo este se llevó a cabo en cajas de Petri P35, fueron alimentados con el alga *Chlorococcum sp* (Figura 6),

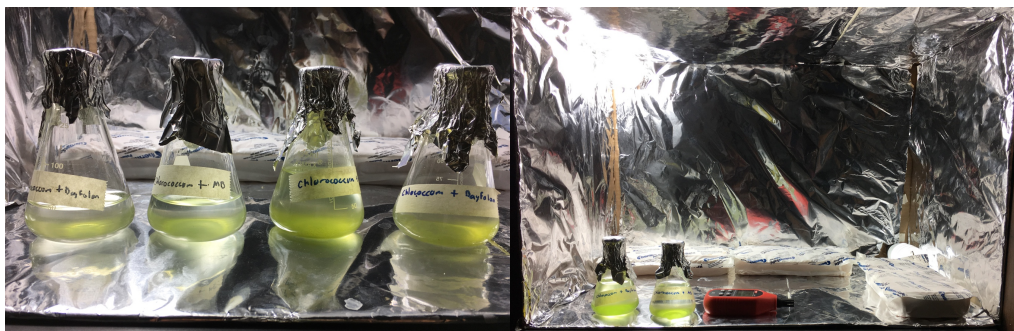


Fig. 6. Cultivo de *Chlorococcum sp*. En la imagen se observa el condensador de luz el cual consta de 2 focos y de una superficie reflejante de aluminio, también se observan 4 matraces en los cuales se aprecia crecimiento del alga al fondo de estos.

Para el caso de los tardígrados, los organismos se cultivaron en cajas P35 y en matraz Erlenmeyer de 250 ml con medio de cultivo de Chalkley's, todo esto a 14°C. (Figura 7).



Fig. 7. Cultivo de *Hypsibius exemplaris*. En la imagen se puede observar un ejemplar adulto, un organismo durante un desove y una cutícula con huevos.

8.2. Extracción de proteínas

En el tiempo que aumentaba el número de organismos en el cultivo de *H. exemplaris* se llevó a cabo la estandarización de la extracción de proteínas con tardígrados *Milnesium sp.* extraídos de una muestra de musgo proporcionada por el Dr. Jönsson, la cual se puso a rehidratar con agua bidestilada en un embudo provisto de una malla y un tubo Falcon de 15 ml, se dejó en agitación por 8 hrs, pasado el tiempo se retiró el exceso de agua y lo que sedimentó en el tubo Falcon fue puesto en una caja de Petri P100 para poder separar a los *Milnesium* para la posterior extracción de proteínas, el ensayo se realizó como se describe en la metodología, todos los ensayos en este caso fueron con 400 organismos; de esta muestra se tomaron 40 μ l (\sim 10 μ g) en un gel de acrilamida el 10% y se tomó como control de extracción una muestra de *Giardia duodenalis* de la cual se cargaron 20 μ g, 30 μ g, 40 μ g y 50 μ g, las muestras corrieron por 1 hr a 100 V, el gel se tiñó con azul de Coomassie por 20 min y se destiñó por 2 hrs, en este ensayo se observaron algunas bandas en el gel como se observa en la figura 8.

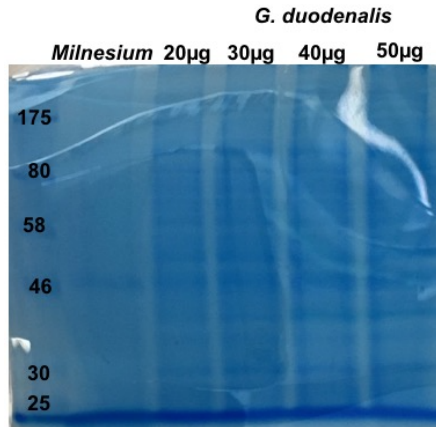


Fig. 8. Electroforesis en gel SDS PAGE AL 10% de proteínas de *Milnesium sp* y *G. duodenalis*. En el carril 2 se observa las proteínas totales de 400 tardígrados de *Milnesium sp*, en los carriles 3-6 se muestra cantidades crecientes de proteína de extracto de proteínas de *G. duodenalis* como control de extracción. Carril 1: Marcador de peso molecular (NEB, prestained protein marker, broad range 7-175).

Para corroborar que el bandeo obtenido en el carril con extracción proteica de tardígrados y que con esas condiciones era reproducible la extracción, se repitieron la extracción con estas condiciones. Para este ensayo de igual manera se tomaron 40 µl (~10µg) de muestra y se corrieron en un gel de acrilamida el 10% y se tomó como control de extracción una muestra de *G. duodenalis* de la cual se cargaron 20 µg dejando un carril libre entre las muestras para descartar contaminación del carril adyacente, las muestras corrieron por 1 hr a 100 V, el gel se tiñó con azul de Coomassie por 20 min y se destiñó por 2 hrs, en este ensayo se volvieron a observar varias bandas en el carril con proteína de tardígrados como se observa en la figura 9.

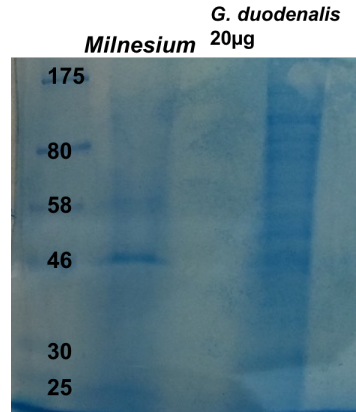


Fig. 9. Electroforesis en gel PAGE 10%-SDS de proteínas de *Milnesium sp* y *G. duodenalis*. En el carril 2 se observa la extracción de total de proteínas de 400 tardígrados *Milnesium sp*, en el carril 4 se cargó 20μg de proteína de *G. duodenalis* como control de extracción. Carril 1: Marcador de peso molecular (NEB, prestained protein marker, broad range 7-175).

Para contar con un control de carga, se decidió realizar un ensayo de inmunodetección, en este caso para la proteína de citoesqueleto α -tubulina, al no haber anticuerpos comerciales disponibles para tardígrado para realizar este ensayo se utilizó el anticuerpo anti- α -tubulina TAT-1 (00020911, Sigma-Aldrich, U.S.A) el cual se generó contra la α -tubulina de *Trypanosoma brucei*. Para evaluar las posibilidades de reconocimiento, que previo a la inmunodetección, se realizó un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la α -tubulina de *T. brucei*, de *G. duodenalis* (ya que en nuestro laboratorio se ha utilizado el anticuerpo en esta especie), de *H. exemplaris*, así como las de *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* ya que son los organismos evolutivamente mas cercanos a los tardigrados; de este alineamiento se encontró que las secuencias de *T. brucei* y de *H. exemplaris* tienen una identidad del 81%, por lo tanto, se procedió a realizar el ensayo (Figura 10).

	1	10	20	30	40	50
TrypanosomaMREAT	CIHIGQAG	COVGNACWEL	CLEHGIO	PDGAMP	SDKTIGVE
Giardia	MGGAEIK	MRECI	SVHIGQAG	VOIGNACWEL	CLEHGIO	HDGOMP
HypsibiusMRECI	SIHVQAG	VOIGNACWEL	CLEHGIO	PDGOMP	SDKTIVG
DrosophilaMRECI	SIHVQAG	VOIGNACWEL	CLEHGIO	PDGOMP	SDKTIVG
CaenorhabditisMREVI	SIHVQAG	VOIGNACWEL	CLEHGIO	PDGTMPSD	QQADG

	60	70	80	90	100	110
Trypanosoma	SETCA	GKHVPRAV	FVLDLEPTVV	DEVRTG	TYROLF	HPEOLI
Giardia	SETCA	GKHVPRAV	FVLDLEPTVV	DEVRTG	SYROLY	HPEOLI
Hypsibius	SETCS	GKHVPRAV	FVLDLEPTVV	DEVRTG	TYROLF	HPEOLI
Drosophila	SETCA	GKHVPRAV	FVLDLEPTVV	DEVRTG	TYROLF	HPEOLI
Caenorhabditis	SDTCN	GRYVPRS	IFVLDLEPTVV	DEVRTG	TYKRLF	HPEOLI

	120	130	140	150	160	170
Trypanosoma	IVDLCL	DRIRK	LADNCT	CLOCF	LVYH	AVGGGT
Giardia	IVDLVLD	RVRL	LADNCS	CLOCF	LIHHS	FGGGT
Hypsibius	IVDLVLD	RVRL	LADNCT	CLOCF	LIHHS	FGGGT
Drosophila	IVDLVLD	RVRL	LADNCT	CLOCF	LIHHS	FGGGT
Caenorhabditis	LIDTVLD	RVRL	LADNCS	CLOCF	FVHHS	FGGGT

	180	190	200	210	220	230
Trypanosoma	SPOVST	AVVEPYNS	SVLSTHS	LEHTD	VAA	MLDNEAI
Giardia	SPOIAT	AVVEPYNT	ILAAHS	MLEHSD	CAF	MVDNEAMYD
Hypsibius	APQVST	AVVEPYNS	ILTTHT	TLEHSD	CAF	MVDNEAI
Drosophila	APQVST	AVVEPYNS	ILTTHT	TLEHSD	CAF	MVDNEAI
Caenorhabditis	APQVST	AVVEPYNS	ILTTHT	TLEHSD	CAF	MVDNEAI

	240	250	260	270	280	290
Trypanosoma	VVSSIT	ASLRFDGAL	NVDL	TEFQ	NLV	PYPRI
Giardia	CISSIT	ASLRFDGAL	NVDL	TEFQ	NLV	PYPRI
Hypsibius	IVSSIT	ASLRFDGAL	NVDL	TEFQ	NLV	PYPRI
Drosophila	IVSSIT	ASLRFDGAL	NVDL	TEFQ	NLV	PYPRI
Caenorhabditis	VVSSIT	ASLRFDGAL	NVDL	NEFQ	NLV	PYPRI

	300	310	320	330	340	350
Trypanosoma	AVFEPAS	MMTKCD	PRHGKYMAC	CLMY	RGDV	VPKDVNA
Giardia	SVFEPAN	MMVKCD	PRHGKYMAC	CLMY	RGDV	VPKDVNA
Hypsibius	SCFEPAN	QMVKCD	PRHGKYMAC	CLMY	RGDV	VPKDVNA
Drosophila	ACFEPAN	QMVKCD	PRHGKYMAC	CLMY	RGDV	VPKDVNA
Caenorhabditis	SCFEPAN	QMVKCD	PRHGKYMA	VCLMY	RGDV	VPKDVNA

	360	370	380	390	400	410
Trypanosoma	GINYQP	PPTV	PCGDLAKV	ORAV	CMIS	NSTA
Giardia	GINYQP	PPTV	PCGDLAKV	ORSCL	MLIS	NSTA
Hypsibius	GINYQP	PPTV	PCGDLAKV	ORAV	CMIS	NSTA
Drosophila	GINYQP	PPTV	PCGDLAKV	ORAV	CMIS	NSTA
Caenorhabditis	GINYQP	PPTV	PCGDLAKV	ORAV	CMES	NSTA

	420	430	440	450
Trypanosoma	EEGFFS	EARED	LAALEKDY	EVGAES
Giardia	EEGFFS	EARED	LAALEKDY	EIGAET
Hypsibius	EEGFFS	EARED	LAALEKDY	EVGVD
Drosophila	EEGFFS	EARED	LAALEKDY	EVGMD
Caenorhabditis	EEGFFS	EARED	LAALEKDY	EVGADS

Fig. 10. Alineamiento de la proteína α -tubulina de diferentes organismos modelos para ver el nivel de conservación entre estas. Los números de acceso de las proteínas usadas son: *T. brucei* AAA30262.1, *G. intestinalis* ESU44180.1, *H. exemplaris* OQV22293.1, *D. melanogaster* NP_476772.1, *C. elegans* CAB03001. En el alineamiento, los recuadros rojos con letras blancas marcan los residuos conservados y los recuadros con perímetro azul y letras rojas marcan residuos ligeramente conservados, con características químicas similares. El alineamiento basado en la estructura secundaria se realizó utilizando el programa ESPript 3.0 (<http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>), en donde se alimentó un alineamiento previamente realizado con el programa ClustalW.

De igual manera se tomaron 40 μ l (~10 μ g) de la muestra y fue cargado en un gel de acrilamida al 10% y se tomó como control positivo extracto de proteínas de *G. duodenalis* de la cual se cargaron 20 μ g de proteína, el ensayo se realizó como se describe en la metodología y como se observa en la figura 11, dicho anticuerpo permitió la identificación de una banda en un peso de 55KDa el cual corresponde con el tamaño esperado para la α -tubulina.

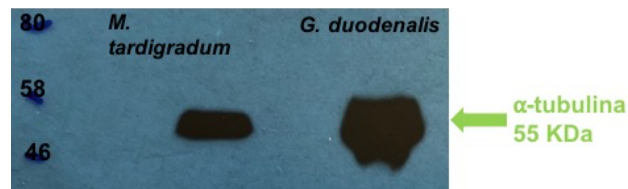


Fig. 12. Inmunodetección de α -tubulina en *Milnesium sp* y *G. duodenalis*. Empleando el anticuerpo anti α -tubulina contra *Trypanosoma* con extracto de proteínas de proteínas de *Milnesium sp* y *G. duodenalis*, en el carril 2, se muestra las proteínas de *Milnesium sp*, en el carril 4, se muestra proteína de *G. duodenalis* como control de detección. Carril 1: Marcador de peso molecular (NEB, prestained protein marker, broad range 7-175). Se corrieron geles SDS_PAGE al 10%.

Cuando ya se contaba con un cultivo basto de *H. exemplaris*, se realizó el ensayo de inmunodetección con extracto proteico total de *H. exemplaris* bajo las mismas condiciones del experimento anterior y utilizando como control de carga el extracto proteico de células HeLa. Como se observa en la fig. 11, la señal detectada de la tubulina en *H. exemplaris* es muy tenue por lo que se decidió adicionalmente, usar como control de carga gel tenido por Coomassie (Figura 11).

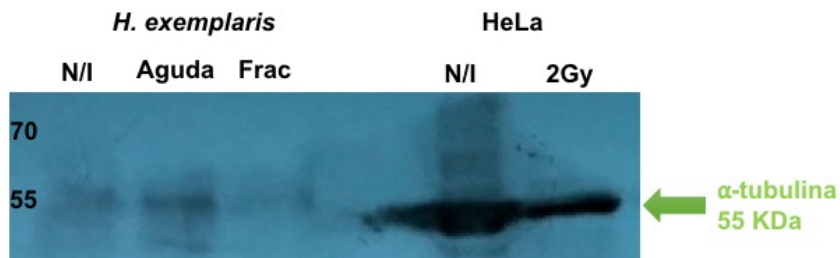


Fig. 11. Inmunodetección de α -tubulina en *H. exemplaris* y células HeLa. Empleando el anticuerpo anti α -tubulina contra *Trypanosoma* con extracto de proteínas de *H. exemplaris* y células HeLa, el carril 2, grupo control no irradiado de tardígrados, el carril 3, grupo irradiado con dosis aguda (500 Gy), el carril 4, grupo irradiado con dosis fraccionada (5X100 Gy), el carril 5 esta vacío, el carril 6, control no irradiado de células HeLa y el carril 7, grupo irradiado con 2 Gy de células HeLa. Carril 1: Marcador de peso molecular (NEB, prestained protein marker, broad range 7-175). Se corrieron geles SDS_PAGE al 12%.

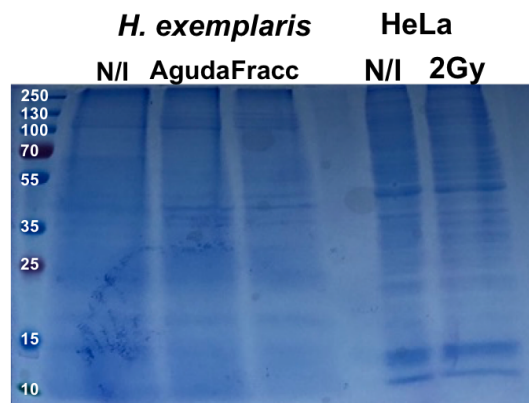


Fig. 12. Gel SDS PAGE teñido con azul de Coomassie de proteínas de *H. exemplaris* y células HeLa. El carril 2, grupo control no irradiado de

tardígrados, el carril 3, grupo irradiado con dosis aguda (500 Gy), el carril 4, grupo irradiado a dosis fraccionada (5X100 Gy), el carril 5 quedó libre, el carril 6, control no irradiado de células HeLa y el carril 7, grupo irradiado con 2 Gy de células HeLa. Carril 1: Marcador de peso molecular (NEB, prestained protein marker, broad range 10-230). La electroforesis fue realizada en geles SDS_PAGE al 12%.

8.3. Detección de la Histona H2A.X

Previo a la detección de la histona se hizo un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la histona H2A.X de Humano con la de *H. exemplaris*, así como con la secuencia de *D. melagonaster*, esto debido a que no hay anticuerpos comerciales específicos para tardígrados. Este alineamiento reveló un 63% de identidad, y en la fig. 12, se observa que *H. exemplaris* tiene conservado el dominio SQ, el cual es el que se fosforila cuando hay daño al DNA (Figura 13).

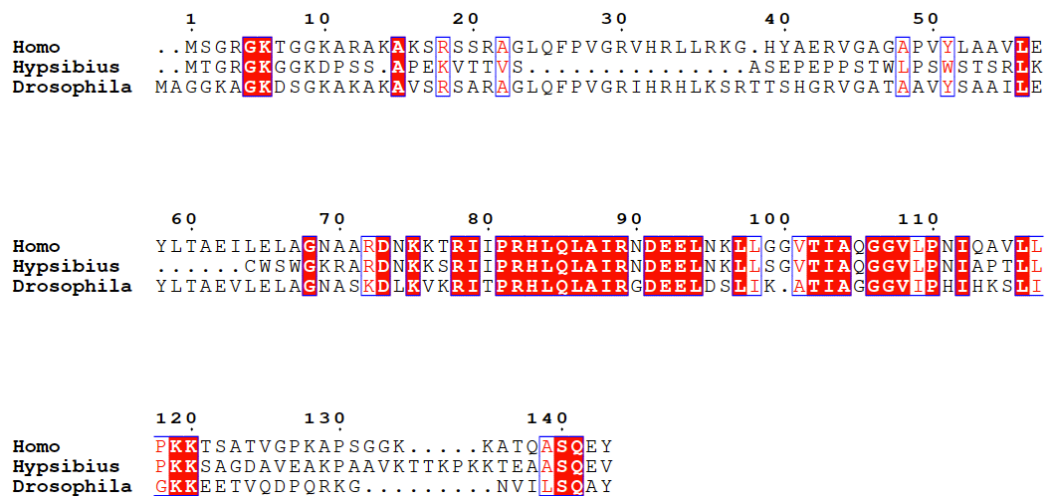


Fig. 13. Alineamiento histona H2A.X de diferentes organismos. Los números de acceso de las proteínas usadas son: *H. sapiens* NP_002096.1, *H. exemplaris* OWA54131.1, *D. melanogaster* NP_001262997.1. El alineamiento basado en la estructura secundaria se realizó utilizando el programa ESPrift 3.0 (<http://esprift.ibcp.fr/ESPrift/ESPrift/>), en donde se alimentó un alineamiento previamente realizado con el programa ClustalW.

Para la estandarización de las condiciones para la detección de la histona fosforilada con el anticuerpo comercial se utilizaron células HeLa, las cuales fueron irradiadas con 2, 4 y 6 Gy de rayos X, los cuales tienen un efecto similar al de la radiación gamma, a las células se les dieron las distintas dosis de radiación X y se procesaron 20 min postirradiación. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford y 50 µg de cada muestra, se siguió la metodología previamente descrita y como podemos observar en la figura 14 se observan bandas en los grupos irradiados sobre los 15 KDa lo cual concuerda con el peso esperado para la histona H2A.X, mientras que el control no irradiado (C) no presenta señal.



Fig.14. Inmunodetección histona H2A.X en células HeLa. Empleando el anticuerpo anti-histona H2A.X contra humano con extractos de proteína de células HeLa, el carril 2, grupo control no irradiado, el carril 3, células irradiadas con 2 Gy, el carril 4, células irradiadas con 4 Gy y el carril 5, células irradiadas con 6 Gy. Carril 1: Marcador de peso molecular (NEB, prestained protein marker, broad range 7-175). Se corrieron geles SDS_PAGE al 12%.

Una vez estandarizada la extracción de proteínas y las condiciones para la inmunodetección, y ya con el cultivo de los tardígrados *H. exemplaris* optimizado con una duplicación de población de entre 2 y 3 semanas. Se realizó la detección del daño causado por la radiación gamma, se designó como dosis aguda 500Gy y la dosis fraccionada 5x100 Gy con un periodo de recuperación de 24 hrs. Para esto, se tomaron grupos de 3500 organismos para cada condición a irradiar y se llevaron al Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM y fueron irradiados con una fuente de Co⁶⁰ (fotones con una energía de 1.2MeV). Las muestras fueron procesadas 15 min después de ser

irradiadas con el protocolo previamente descrito, obteniendo alrededor de 0.5µg/µl teniendo un total de 75 µg). Al ver que los rendimientos de la extracción eran muy bajos se evaluó concentrar las proteína, esto se hizo probando 2 metodologías la primera fue con acetona y los resultados mostraron que al resuspender la pastilla de tardígrados había pérdida del ~65% de proteína (concentración inicial: 387µg, concentración final: 136 µg); la segunda fue con ácido tricloroacético y los resultados fueron similares solo que en este caso la pastilla era difícil de resuspender y la perdida era de ~55% (concentración inicial: 387 µg, concentración final: 202 µg). En ensayos posteriores se logró mejorar los rendimientos de extracción para evitar la precipitación de proteínas y evitar pérdidas, logrando ahora obteniendo en promedio 2 µg/µl teniendo un total de 300 µg. De estas muestras se cargaron 50 µg y como control positivo se cargaron 20 µg de muestras de células HeLa, se siguió el protocolo previamente descrito, mientras no se observan bandas en el peso de 15 kDa en las muestras de *H. exemplaris*, para el control positivo si, bandas de 15 kDa en extracto proteico de células HeLa (resultados no mostrados).

8.4 Detección de los niveles de carbonilación en proteínas

Para detectar proteínas carboniladas, se usó el kit comercial y como control positivo se usaron las células Hela. En eppendorf de 1.5 ml se colocaron 20 µg de proteína, se tomaron 2 alícuotas de cada muestra (radiación aguda y fraccionada). Las muestras se desnaturalizaron mediante la adición de SDS al 12% para tener una concentración final del 6%. De las 2 alícuotas de cada muestra una fue sujeta a derivatización con DNPH el cual sirvió como control positivo y para el control negativo se trato con la solución control (no contiene DNPH), y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente, después se adicionó la solución de neutralización en ambos tubos junto con 2-betamercaptoetanol en una concentración final de 0.74 M. Posteriormente, las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 10%, y la electroforesis y transferencia del gel a membrana y la inmunodetección

correspondiente con el anticuerpo que reconoce a DNPH fue realizado como se describió en la metodología. Como se observa en la figura 15, se ve un barrido más oscuro en el carril de la muestra de células HeLa irradiada con 6 Gy en comparación con el carril de la muestra no irradiada, lo cual indica que hay un basal de carbonilación en células no tratadas.

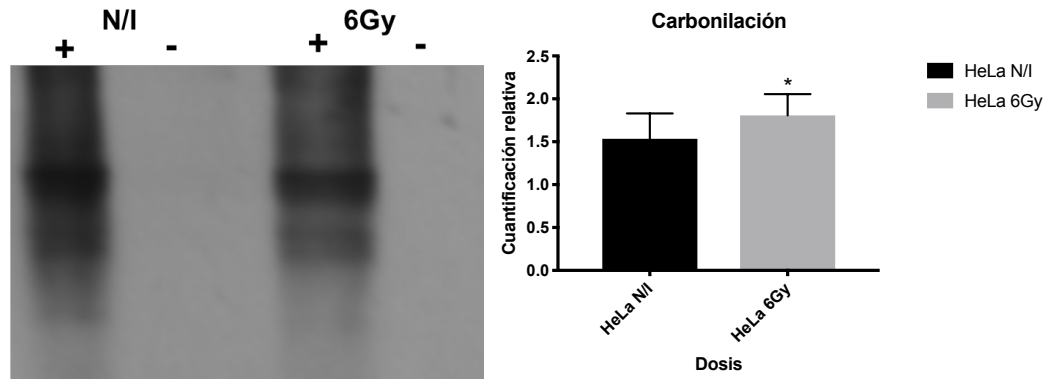


Fig. 15. Detección de niveles de carbonilación en células HeLa. En el panel izquierdo: empleando el anticuerpo anti-DNPH con extractos de proteína de células HeLa, el carril 2 células control no irradiadas tratado con DNPH, el carril 3, células control no irradiadas sin DNPH, el carril 4, células irradiadas con 6 Gy tratadas con DNPH, el carril 5, células irradiadas con 6 Gy sin DNPH. Se corrieron geles SDS_PAGE al 10%. En el panel del lado derecho, se muestra una gráfica con la cuantificación relativa de la señal en la cual se muestra que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), para el análisis se utilizó el programa Prism 8 GraphPad (<https://www.graphpad.com/>).

Posteriormente, y una vez estandarizado el ensayo, este se realizó con extractos proteicos de *H. exemplaris* de los grupos irradiados con dosis aguda, con dosis fraccionada y el control no irradiado con las condiciones descritas. En la figura 16, no se observa un aumento significativo de la señal en la muestra irradiada con dosis aguda y fraccionada con respecto al control no irradiado, lo que se comprobó con la cuantificación relativa de la señal con el software Image J, como se observa en la gráfica no hay diferencia significativa en tres ensayos diferentes.

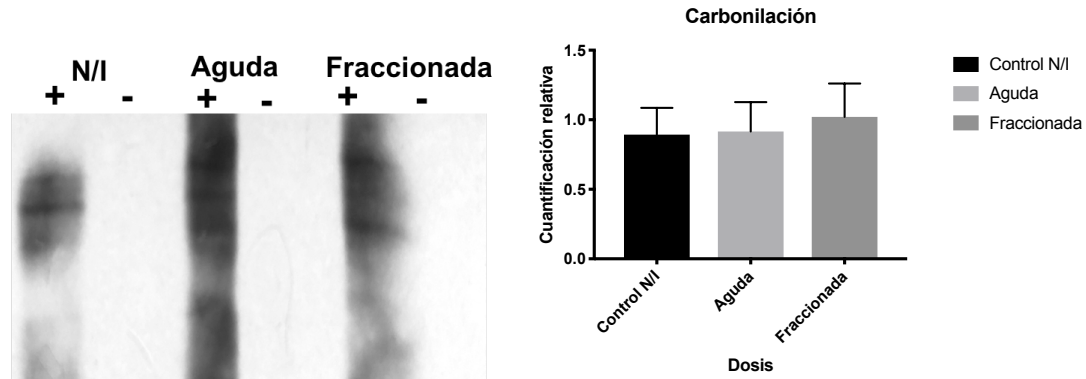


Figura 16. Detección de niveles de carbonilación en *Hypsibius exemplaris*. En el panel izquierdo: empleando el anticuerpo anti-DNPH con extractos de proteína de *H. exemplaris*, el carril 1, grupo control no irradiado tratado con DNPH, el carril 2, grupo control no irradiado sin DNPH, el carril 3, grupo irradiado con dosis aguada (500 Gy) con DNPH, el carril 4, grupo irradiado con dosis aguada (500 Gy) sin DNPH, el carril 5, grupo irradiado a dosis fraccionadas (5X100 Gy) con DNPH, el carril 6, grupo irradiado a dosis fraccionadas (5X100 Gy) sin DNPH. Se corrieron geles SDS_PAGE al 10%. En el panel del lado derecho, se muestra una gráfica con la cuantificación relativa de la señal en la cual se muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), para el análisis se utilizó el programa Prism 8 GraphPad (<https://www.graphpad.com/>).

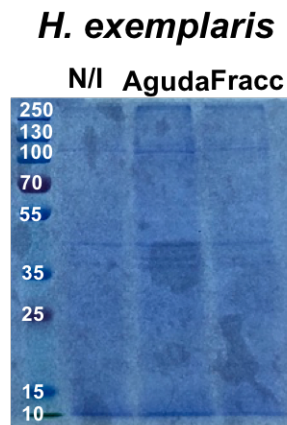


Fig. 18. Gel SDS PAGE teñido con azul de Coomassie de muestras de *H. exemplaris*. El carril 2, grupo control no irradiado de tardígrados, el carril 3, grupo irradiado con dosis aguada (500 Gy), el carril 4, grupo irradiado a dosis

fraccionada (5X100 Gy), Carril 1: Marcador de peso molecular (NEB, prestained protein marker, broad range 10-250). Se corrieron geles SDS_PAGE al 10%.

9. Discusión

La base para el establecimiento del cultivo de *Hypsibius exemplaris*, fue basado en lo publicado por McNuff (2007) con algunas modificaciones, tanto para el cultivo de *H. exemplaris* teniendo mejores rendimientos con el cultivo en matraz en cuanto número de huevos por cutícula (hasta 8), tamaño promedio de organismos, tiempo de duplicación de población (2 semanas), las algas se mantienen en buen estado por mayor tiempo. En el caso del cultivo de *Clorococcum sp.* se tuvo mejores rendimientos con el uso del fertilizante comercial reduciendo el tiempo en el que el matraz se llena de alga de 4 a 3 semanas.

Una parte crucial para el proyecto y la progresión de los ensayos fue la extracción de proteínas empezando por un protocolo básico y optimizando este para mejorar la cantidad obtenida de proteína sin comprometer la integridad de las proteínas.

En 1997 Rogakou y colaboradores, observaron en cultivos celulares de mamíferos que la Histona H2A.X se fosforilaba en la serina 139 de manera rápida y extensiva después de ser sometidos a radiación ionizante, siendo está la señal indirecta del rompimiento de doble cadena de las hebra del DNA, la formación de la γ -H2A.X comienza segundos después de la exposición a la radiación ionizante y rápidamente pasa por un valor medio de formación al minuto y teniendo un máximo de formación entre los 9 y 30 min, lo cual concuerda con lo observado en la figura 13, en donde se detectaron los niveles de esta señal en el control positivo (Hela) aunque no se detectó señal alguna en los tardígrados de *H. exemplaris*, esto puede ser debido que se están utilizando dosis subletales para esta especie o a la presencia de alguna o algunas proteínas que pudieran estar protegiendo al DNA del efecto

oxidativo, como la Dsup15, una proteína del tardígrado *R. verieornatus* la cual se une al DNA y se ha visto que al ser tranfectada en células HEK293 estas aumentan su radiotolerancia en un 40% en comparación a las no transfectadas (Hashimoto et al. 2016).

El efecto indirecto de la radiación que es la formación de ROS, tal y como lo observaron Han y colaboradores en 2010, quienes encontraron que hay un aumento directamente proporcional al aumento de la dosis de radiación gamma, la cual propicia un ambiente oxidativo en las células; esto concuerda por lo visto por Krisco y colaboradores en 2010 en donde demostraron que al aumentar la dosis de radiación gamma aumenta la cantidad de proteínas carboniladas. Por otro lado, este trabajo se basó en el principio biológico del fraccionamiento de la dosis de radiación gamma descrito por Muriel en 2002, el cual indica que al fraccionar una dosis de radiación subletal esta induce un daño letal. Esto se refleja en el resultado obtenido con el ensayo de carbonilación de proteínas en donde se puede apreciar en la figura 17 no hay un aumento significativo en la cantidad de proteínas carboniladas en el grupo de *H. exemplaris* tratado con dosis fraccionada con respecto al grupo con dosis aguda. Este cambio no significativo puede ser debido a un comportamiento similar al observado por Krisco y Radman 2013 en la bacteria radiotolerante *D. radiodurans* que cuando es irradiado con dosis subletales de radiación gamma, no hay aumento significativo los niveles carbonilación, lo que indica que esto puede ser parte de las estrategias para contrarrestar los efectos de las ROS con el fin de mantener su proteoma protegido para poder reparar el genoma, el cual se ha comprobado que sufre degradación. Por otro lado, en el trabajo de Kuzmic et al. (2018), en donde llevaron a cabo la detección *in situ* de la carbonilación de proteínas en *H. exemplaris* después de la exposición a dosis letales de radiación UV (60, 120 y 180 kJ/m²), los autores encontraron una relación entre el aumento de la dosis con el aumento en la carbonilación en proteínas, en el que resaltan que la detección *in situ* tiene una amplia ventaja sobre la inmunodetección en fase solida ya que mencionan que este

procedimiento no requiere de ningún protocolo de extracción y así se reducen las reacciones de carbonilación que ocurren espontáneamente antes del análisis así como la pérdida de proteínas carboniladas, lo cual, explicaría los niveles de carbonilación en el grupo control. La repercusión en la sobrevivencia está ligada a la incapacidad de las células de reparar tanto al DNA ya que se ven afectadas algunas proteínas encargadas de reparación, factores de elongación, algunas enzimas del ciclo de Krebs y de la cadena transportadora de electrones (Dukan and Nyström, 1998, 1999; Tamarit et al., 1998), así como la acumulación de proteínas carboniladas las cuales forman agregados proteicos y estos son se vuelven citotóxicos (Nyström, 2005). Al no haber una diferencia significativa bajo las condiciones del ensayo entre el grupo control y los grupos tratados con radiación, esto probablemente debido a que no se logró optimizar la técnica para detección de carbonilación en proteínas de *H. exemplaris* se podría sugerir que al menos existe una tendencia la cual estaría indicando que la cantidad de radiación no acumuló la suficiente oxidación para conducir a la carbonilación y que esta fue contrarrestada por algunas enzimas encargadas de contrarrestar los efectos de las ROS, tales como, las catalasas, peroxidasas, superóxido dismutasa, entre otras. Dichas enzimas están presentes en el tardígrado *Macrobiotus richtersi* y estas aumentan su expresión cuando entran en estado de tun (Rebecchi, Altiero, et al. 2009), lo cual sugiere que un fenómeno similar podría estar ocurriendo con *H. exemplaris* con la particularidad de que este lo estaría realizando en su estado activo o alguna proteína o molécula que proteja al DNA como es el caso de *R. varioernatus*. Aunque no concluyentes, los resultados sugieren que el tardígrado *Hypsibius exemplaris* podría no estar acumulando suficiente daño al DNA como para ser detectado, lo que indicaría que el ambiente oxidativo pudo haber sido contrarrestado y consecuentemente no habría efecto en la carbonilación de las proteínas así como muestran una aparente protección a las proteínas ante la radiación gamma, lo cual sugiere un mecanismo que trabaja activamente en su estado activo el cual evita que proteínas sean oxidadas por las ROS generadas por la radiación gamma.

10. Conclusiones

- ❖ Se logró exitosamente establecer el cultivo de *H. exemplaris* así como el de *Chlorococcum sp.*
- ❖ Se logró establecer un protocolo de extracción de proteínas de tardígrados.
- ❖ No se detectaron niveles de la Histona H2A.X fosforilada en *H. exemplaris* entre el grupo control no irradiado y los grupos irradiados con dosis fraccionado y aguda.
- ❖ No se detectaron cambios significativos en los niveles de carbonilación entre el grupo control no irradiado y los grupos irradiados con dosis fraccionado y aguda.

11. Perspectivas

- Optimizar el método de extracción de proteínas
- Realizar los ensayos empleando como control el DMSO.
- Determinar la detección tanto de la carbonilación como de los niveles de la Histona H2A.X a diferentes tiempos postirradiación.

12. Bibliografía

- Altiero, Tiziana et al. 2011. "Ultraviolet Radiation Tolerance in Hydrated and Desiccated Eutardigrades." *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 49(SUPPL.1): 104–10.
- Andres, Sara N. et al. 2012. "A Human XRCC4-XLF Complex Bridges DNA." *Nucleic Acids Research* 40(4): 1868–78.
- Beltrán-Pardo, Eliana et al. 2015. "Tolerance to Gamma Radiation in the Tardigrade *Hypsibius Dujardini* from Embryo to Adult Correlate Inversely with Cellular Proliferation." *PLoS ONE* 10(7).
- Beltrán-Pardo, Eliana A. et al. 2013. "Sequence Analysis of the DNA-Repair Gene Rad51 in the Tardigrades *Milnesium Cf. Tardigradum*, *Hypsibius Dujardini* and *Macrobiotus Cf. Harmsworthi*." *Journal of Limnology* 72(SUPPL 1): 80–91.
- Bétermier, Mireille, Pascale Bertrand, and Bernard S. Lopez. 2014. "Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process?" *PLoS Genetics* 10(1).
- Boubakour-Azzouz, Imenne et al. 2012. "Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Requires KU80 and XRCC4 to Promote N-Addition at Non-V(D)J Chromosomal Breaks in Non-Lymphoid Cells." *Nucleic Acids Research* 40(17): 8381–91.
- Bradford, Marion M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry*.
- Burgess, Rebecca C., Bharat Burman, Michael J. Kruhlak, and Tom Misteli. 2014. "Activation of DNA Damage Response Signaling by Condensed Chromatin." *Cell Reports* 9(5): 1703–18.
- Byrne, Rose T. et al. 2014. "Escherichia Coli Genes and Pathways Involved in Surviving Extreme Exposure to Ionizing Radiation." *Journal of Bacteriology* 196(20): 3534–45.
- Cannavo, E., P. Cejka, and S. C. Kowalczykowski. 2013. "Relationship of DNA Degradation by *Saccharomyces Cerevisiae* Exonuclease 1 and Its

- Stimulation by RPA and Mre11-Rad50-Xrs2 to DNA End Resection.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(18): E1661–68. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1305166110>.
- Chiruvella, Kishore K., Zhuobin Liang, and Thomas E. Wilson. 2013. “Repair of Double-Strand Breaks by End Joining.” *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(5).
- Chun, J., E. S. Buechelmaier, and S. N. Powell. 2013. “Rad51 Paralog Complexes BCDX2 and CX3 Act at Different Stages in the BRCA1-BRCA2-Dependent Homologous Recombination Pathway.” *Molecular and Cellular Biology* 33(2): 387–95. <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.00465-12>.
- Croteau, Deborah L., Venkateswarlu Popuri, Patricia L. Opresko, and Vilhelm A. Bohr. 2014. “Human RecQ Helicases in DNA Repair, Recombination, and Replication.” *Annual Review of Biochemistry* 83(1): 519–52. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-060713-035428>.
- Daley, James M., Renee L. Vander Laan, Aswathi Suresh, and Thomas E. Wilson. 2005. “DNA Joint Dependence of Pol X Family Polymerase Action in Nonhomologous End Joining.” *Journal of Biological Chemistry* 280(32): 29030–37.
- Davis, Anthony J., Benjamin P C Chen, and David J. Chen. 2014. “DNA-PK: A Dynamic Enzyme in a Versatile DSB Repair Pathway.” *DNA Repair* 17: 21–29.
- Desouky, Omar, Nan Ding, and Guangming Zhou. 2015. “Targeted and Non-Targeted Effects of Ionizing Radiation.” *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 8(2): 247–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jrras.2015.03.003>.
- Downs, Jessica A., and Stephen P. Jackson. 2004. “A Means to a DNA End: The Many Roles of Ku.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5(5): 367–78. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm1367>.
- Eid, Wassim et al. 2010. “DNA End Resection by CtIP and Exonuclease 1

- Prevents Genomic Instability." *EMBO reports* 11(12): 962–68.
<http://embor.embopress.org/cgi/doi/10.1038/embor.2010.157>.
- Esashi, Fumiko et al. 2005. "CDK-Dependent Phosphorylation of BRCA2 as a Regulatory Mechanism for Recombinational Repair." *Nature* 434(7033): 598–604. <http://www.nature.com/doi/doi/10.1038/nature03404>.
- Fester, Frank et al. 2012. "Transcriptome Analysis in Tardigrade Species Reveals Specific Molecular Pathways for Stress Adaptations." *Bioinformatics and Biology Insights* 6: 69–95.
- Fell, Victoria L., and Caroline Schild-Poulter. 2015. "The Ku Heterodimer: Function in DNA Repair and Beyond." *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 763: 15–29.
- Friedberg, Errol C. et al. 2006. ASM Press *DNA Repair and Mutagenesis*.
<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00024382-200608000-00017>.
- Garcia-Diaz, Miguel et al. 2004. "A Structural Solution for the DNA Polymerase λ -Dependent Repair of DNA Gaps with Minimal Homology." *Molecular Cell* 13(4): 561–72.
- Gladyshev, E., and M. Meselson. 2008. "Extreme Resistance of Bdelloid Rotifers to Ionizing Radiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(13): 5139–44.
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0800966105>.
- Goodarzi, Aaron A et al. 2006. "DNA-PK Autophosphorylation Facilitates Artemis Endonuclease Activity." *The EMBO Journal* 25(16): 3880–89.
<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7601255>.
- Guidetti, Roberto, Tiziana Altiero, and Lorena Rebecchi. 2011. "On Dormancy Strategies in Tardigrades." *Journal of Insect Physiology* 57(5): 567–76.
- Hashimoto, Takuma et al. 2016. "Extremotolerant Tardigrade Genome and Improved Radiotolerance of Human Cultured Cells by Tardigrade-Unique Protein." *Nature Communications* 7: 12808.
<http://www.nature.com/doi/doi/10.1038/ncomms12808>.
- Hashimoto, Takuma, and Takekazu Kunieda. 2017. "DNA Protection Protein,

- a Novel Mechanism of Radiation Tolerance: Lessons from Tardigrades.” *Life* 7(2): 26. <http://www.mdpi.com/2075-1729/7/2/26>.
- Held, Kathryn D. 2006. “Radiobiology for the Radiologist, 6th Ed., by Eric J. Hall and Amato J. Giaccia.” *Radiation Research* 166(5): 816–17. <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1667/RR0771.1>.
- Henner, W. D., L. O. Rodriguez, S. M. Hecht, and W. A. Haseltine. 1983. “Gamma Ray Induced Deoxyribonucleic Acid Strand Breaks. 3’ Glycolate Termini.” *Journal of Biological Chemistry* 258(2): 711–13.
- Henner, W D, S M Grunberg, and W a Haseltine. 1983. “Enzyme Action at 3’ Termini of Ionizing Radiation-Induced DNA Strand Breaks.” *The Journal of biological chemistry* 258(24): 15198–205. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6361028>.
- Hill, Richard, and Patrick W K Lee. 2010. “The DNA-Dependent Protein Kinase (DNA-PK): More than Just a Case of Making Ends Meet?” *Cell Cycle* 9(17): 3460–69.
- Horikawa, Daiki D. et al. 2013. “Analysis of DNA Repair and Protection in the Tardigrade *Ramazzottius Varieornatus* and *Hypsibius Dujardini* after Exposure to UVC Radiation.” *PLoS ONE* 8(6).
- Horikawa, Daiki D et al. 2006. “Radiation Tolerance in the Tardigrade *Milnesium Tardigradum*.” *International journal of radiation biology* 82(12): 843–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.12.003>.
- Hosoya, Noriko, and Kiyoshi Miyagawa. 2014. “Targeting DNA Damage Response in Cancer Therapy.” *Cancer Science* 105(4): 370–88.
- Iacovoni, Jason S et al. 2010. “High-Resolution Profiling of GammaH2AX around DNA Double Strand Breaks in the Mammalian Genome.” *The EMBO journal* 29(8): 1446–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20360682> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2868577>.
- Inagaki, K. et al. 2007. “The Role of DNA-PKcs and Artemis in Opening Viral DNA Hairpin Termini in Various Tissues in Mice.” *Journal of Virology* 81(20): 11304–21. <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01225-07>.

- Ip, Stephen C. Y. et al. 2008. "Identification of Holliday Junction Resolvases from Humans and Yeast." *Nature* 456(7220): 357–61.
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature07470>.
- Jönsson, K. Ingemar et al. 2008. "Tardigrades Survive Exposure to Space in Low Earth Orbit." *Current Biology* 18(17).
- Jönsson, K. Ingemar, and Ralph O. Schill. 2007. "Induction of Hsp70 by Desiccation, Ionising Radiation and Heat-Shock in the Eutardigrade *Richtersius Coronifer*." *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 146(4): 456–60.
- Jönsson, K Ingemar, Mats Harms-Ringdahl, and Jesper Torudd. 2005. "Radiation Tolerance in the Eutardigrade *Richtersius Coronifer*." *International journal of radiation biology* 81(9): 649–56.
- Kaur, Hardeep, Arnaud DeMuyt, and Michael Lichten. 2015. "Top3-Rmi1 DNA Single-Strand Decatenase Is Integral to the Formation and Resolution of Meiotic Recombination Intermediates." *Molecular Cell* 57(4): 583–94.
- Khurana, Simran et al. 2014. "A Macrohistone Variant Links Dynamic Chromatin Compaction to BRCA1-Dependent Genome Maintenance." *Cell Reports* 8(4): 1049–62.
- Kim, Do Hyung et al. 2005. "Enzymatic Properties of the *Caenorhabditis Elegans* Dna2 Endonuclease/ Helicase and a Species-Specific Interaction between RPA and Dna2." *Nucleic Acids Research* 33(4): 1372–83.
- Kong, Xianming et al. 2011. "Emerging Roles of DNA-PK besides DNA Repair." *Cellular Signalling* 23(8): 1273–80.
- Krisko, Anita, and Miroslav Radman. 2010. "Protein Damage and Death by Radiation in *Escherichia Coli* and *Deinococcus Radiodurans*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(32): 14373–77.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2922536&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- . 2013. "Biology of Extreme Radiation Resistance: The Way of

- Deinococcus Radiodurans.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Kruhlak, M J et al. 2006. “Changes in Chromatin Structure and Mobility in Living Cells at Sites of DNA Double-Strand Breaks.” *The Journal of cell biology* 172(6): 823–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16520385>.
- Kuzmic, Mira et al. 2018. “Carbonylation Accumulation of the Hypsibius Exemplaris Anhydrobiote Reveals Age- Associated Marks.” : 1–13.
- Lee, Cheng-Sheng, Kihoon Lee, Gaëlle Legube, and James E Haber. 2013. “Dynamics of Yeast Histone H2A and H2B Phosphorylation in Response to a Double-Strand Break.” *Nature Structural & Molecular Biology* 21(1): 103–9. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nsmb.2737>.
- Lloyd, Janette et al. 2009. “A Supramodular FHA/BRCT-Repeat Architecture Mediates Nbs1 Adaptor Function in Response to DNA Damage.” *Cell* 139(1): 100–111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.043>.
- Lomax, M. E., L. K. Folkes, and P. O’Neill. 2013. “Biological Consequences of Radiation-Induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy.” *Clinical Oncology* 25(10): 578–85.
- Makharashvili, Nodar, and Tanya T. Paull. 2015. “CtIP: A DNA Damage Response Protein at the Intersection of DNA Metabolism.” *DNA Repair* 32: 75–81.
- Mali, Brahim et al. 2010. “Transcriptome Survey of the Anhydrobiotic Tardigrade Milnesium Tardigradum in Comparison with Hypsibius Dujardini and Richtersius Coronifer.” *BMC genomics* 11: 168. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2848246&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Marnef, Aline, and Gaëlle Legube. 2017. “Organizing DNA Repair in the Nucleus: DSBs Hit the Road.” *Current Opinion in Cell Biology* 46: 1–8.
- Masson, Jean Yves et al. 2001. “Identification and Purification of Two Distinct Complexes Containing the Five RAD51 Paralogs.” *Genes and Development* 15(24): 3296–3307.
- Mayer, Georg, Susann Kauschke, Jan Rüdiger, and Paul A. Stevenson. 2013. “Neural Markers Reveal a One-Segmented Head in Tardigrades

- (Water Bears).” *PLoS ONE* 8(3).
- Mimitou, Eleni P., and Lorraine S. Symington. 2011. “DNA End Resection- Unraveling the Tail.” *DNA Repair* 10(3): 344–48.
- Mladenov, Emil, Simon Magin, Aashish Soni, and George Iliakis. 2016. “DNA Double-Strand-Break Repair in Higher Eukaryotes and Its Role in Genomic Instability and Cancer: Cell Cycle and Proliferation-Dependent Regulation.” *Seminars in Cancer Biology* 37–38: 51–64.
- Møbjerg, N. et al. 2011. “Survival in Extreme Environments - on the Current Knowledge of Adaptations in Tardigrades.” *Acta physiologica (Oxford, England)* 202(3): 409–20.
- Moshous, Despina et al. 2001. “Artemis, a Novel DNA Double-Strand Break Repair/V(D)J Recombination Protein, Is Mutated in Human Severe Combined Immune Deficiency.” *Cell* 105(2): 177–86.
- Neal, J. A. et al. 2014. “Unraveling the Complexities of DNA-Dependent Protein Kinase Autophosphorylation.” *Molecular and Cellular Biology* 34(12): 2162–75. <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.01554-13>.
- Neal, Jessica A., and Katheryn Meek. 2011. “Choosing the Right Path: Does DNA-PK Help Make the Decision?” *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711(1–2): 73–86.
- Neumann, Simon, Andy Reuner, Franz Br??mmer, and Ralph O. Schill. 2009. “DNA Damage in Storage Cells of Anhydrobiotic Tardigrades.” *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 153(4): 425–29.
- Niewolik, Doris et al. 2006. “DNA-PKcs Dependence of Artemis Endonucleolytic Activity, Differences between Hairpins and 5’ or 3’ Overhangs.” *Journal of Biological Chemistry* 281(45): 33900–909.
- Nilsson, E J Charlotta, K Ingemar Jönsson, and Jan Pallon. 2010. “Tolerance to Proton Irradiation in the Eutardigrade Richtersius Coronifer - a Nuclear Microprobe Study.” *International journal of radiation biology* 86(5): 420–27.
- Ochi, T. et al. 2015. “PAXX, a Paralog of XRCC4 and XLF, Interacts with Ku

- to Promote DNA Double-Strand Break Repair.” *Science* 347(6218): 185–88. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1261971>.
- Paull, Tanya T. 2005. “Saving the Ends for Last: The Role of Pol δ In DNA End Joining.” *Molecular Cell* 19(3): 294–96.
- . 2015. “Mechanisms of ATM Activation.” *Annual Review of Biochemistry* 84(1): 711–38. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-060614-034335>.
- Pearl, Laurence H. et al. 2015. “Therapeutic Opportunities within the DNA Damage Response.” *Nature Reviews Cancer* 15(3): 166–80. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc3891>.
- Prakash, Rohit, Yu Zhang, Weiran Feng, and Maria Jasin. 2015. “Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(4).
- Radhakrishnan, Sarvan Kumar, Nicholas Jette, and Susan P. Lees-Miller. 2014. “Non-Homologous End Joining: Emerging Themes and Unanswered Questions.” *DNA Repair* 17: 2–8.
- Rebecchi, Lorena, Michele Cesari, et al. 2009. “Survival and DNA Degradation in Anhydrobiotic Tardigrades.” *The Journal of experimental biology* 212(Pt 24): 4033–39.
- Rebecchi, Lorena, Tiziana Altiero, et al. 2009. “Tardigrade Resistance to Space Effects: First Results of Experiments on the LIFE-TARSE Mission on FOTON-M3 (September 2007).” *Astrobiology*.
- Roberts, Steven A. et al. 2010. “Ku Is a 5′-DRP/AP Lyase That Excises Nucleotide Damage near Broken Ends.” *Nature* 464(7292): 1214–17. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature08926>.
- Roy, Sunetra et al. 2015. “XRCC4/XLF Interaction Is Variably Required for DNA Repair and Is Not Required for Ligase IV Stimulation.” *Molecular and Cellular Biology* 35(17): 3017–28. <http://mcb.asm.org/lookup/doi/10.1128/MCB.01503-14>.

- Schokraie, Elham et al. 2012. "Comparative Proteome Analysis of Milnesium Tardigradum in Early Embryonic State versus Adults in Active and Anhydrobiotic State." *PLoS ONE* 7(9).
- Smeenk, G. et al. 2013. "Poly(ADP-Ribosyl)ation Links the Chromatin Remodeler SMARCA5/SNF2H to RNF168-Dependent DNA Damage Signaling." *Journal of Cell Science* 126(4): 889–903.
<http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.109413>.
- Strande, Natasha et al. 2012. "Specificity of the DRP/AP Lyase of Ku Promotes Nonhomologous End Joining (NHEJ) Fidelity at Damaged Ends." *Journal of Biological Chemistry* 287(17): 13686–93.
- Strande, Natasha T. et al. 2014. "Requirements for 5' dRP/AP Lyase Activity in Ku." *Nucleic Acids Research* 42(17): 11136–43.
- Strickfaden, Hilmar et al. 2016. "Poly(ADP-Ribosyl)ation-Dependent Transient Chromatin Decondensation and Histone Displacement Following Laser Microirradiation." *Journal of Biological Chemistry* 291(4): 1789–1802.
- Suwaki, Natsuko, Kerstin Klare, and Madalena Tarsounas. 2011. "RAD51 Paralogs: Roles in DNA Damage Signalling, Recombinational Repair and Tumorigenesis." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 22(8): 898–905.
- Symington, Lorraine S., and William K. Holloman. 2008. "Resolving Resolvases: The Final Act?" *Molecular Cell* 32(5): 603–4.
- Uematsu, Naoya et al. 2007. "Autophosphorylation of DNA-PKCS Regulates Its Dynamics at DNA Double-Strand Breaks." *Journal of Cell Biology* 177(2): 219–29.
- Wang, Hongyan et al. 2001. "Replication Protein A2 Phosphorylation after DNA Damage by the Coordinated Action of Ataxia Telangiectasia-Mutated and DNA-Dependent Protein Kinase." *Cancer Research* 61(23): 8554–63.
- Wang, Y et al. 1999. "Roles of Replication Protein A and DNA-Dependent Protein Kinase in the Regulation of DNA Replication Following DNA

- Damage." *The Journal of biological chemistry* 274(31): 22060–64.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10419533>.
- Watanabe, Masahiko et al. 2006. "Biological Effects of Anhydrobiosis in an African Chironomid, *Polypedilum Vanderplanki* on Radiation Tolerance." *International Journal of Radiation Biology* 82(8): 587–92.
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=irab20%5Cnhttp://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09553000600876652>.
- Williams, Gareth J., Susan P. Lees-Miller, and John A. Tainer. 2010. "Mre11-Rad50-Nbs1 Conformations and the Control of Sensing, Signaling, and Effector Responses at DNA Double-Strand Breaks." *DNA Repair* 9(12): 1299–1306.
- Williams, R. Scott et al. 2008. "Mre11 Dimers Coordinate DNA End Bridging and Nuclease Processing in Double-Strand-Break Repair." *Cell* 135(1): 97–109.
- . 2009. "Nbs1 Flexibly Tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to Coordinate DNA Double-Strand Break Processing and Repair." *Cell* 139(1): 87–99.
- Woods, A et al. 1989. "Definition of Individual Components within the Cytoskeleton of *Trypanosoma Brucei* by a Library of Monoclonal Antibodies." *J Cell Sci*.
- Xia, Bing et al. 2006. "Control of BRCA2 Cellular and Clinical Functions by a Nuclear Partner, PALB2." *Molecular Cell* 22(6): 719–29.
- Yeeles, J. T P, and Mark S. Dillingham. 2010. "The Processing of Double-Stranded DNA Breaks for Recombinational Repair by Helicase-Nuclease Complexes." *DNA Repair* 9(3): 276–85.
- You, Zhongsheng, and Julie M. Bailis. 2010. "DNA Damage and Decisions: CtIP Coordinates DNA Repair and Cell Cycle Checkpoints." *Trends in Cell Biology* 20(7): 402–9.
- Yu, B P. 1994. "Cellular Defenses against Damage from Reactive Oxygen Species." *Physiological reviews* 74(1): 139–62.
- Zahradka, Ksenija et al. 2006a. "Reassembly of Shattered Chromosomes in *Deinococcus Radiodurans*." *Nature*.

<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature05160>.

———. 2006b. “Reassembly of Shattered Chromosomes in *Deinococcus Radiodurans*.” *Nature*.