
REPARACIÓN DEL ADN: UNA POSIBLE RELACIÓN ENTRE LA DEFICIENCIA DE FOLATO Y LA MUERTE NEURONAL

DNA Repair: A Link Between Folate Deficiency and Neuronal Cell Death

NELSON J. RAMÍREZ¹, B.Sc.; GONZALO ARBOLEDA², MD., Ph. D.;
HUMBERTO ARBOLEDA³, MD., M.Sc.

¹Grupo de Neurociencias. Universidad Nacional de Colombia.
Sede Bogotá, ciudad universitaria, Carrera 30 No. 45-03.
AA. 14490. Bogotá, Colombia.

Autor Correspondencia: njramirez@unal.edu.co

²Departamento de Patología - Grupo de Neurociencias,
Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia.
Sede Bogotá, ciudad universitaria, Carrera 30 No. 45-03.
AA. 14490. Bogotá, Colombia.

³Departamento de Pediatría - Grupo de Neurociencias,
Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia.
Sede Bogotá, ciudad universitaria, Carrera 30 No. 45-03.
AA. 14490. Bogotá, Colombia.

Teléfono: 316 50 00, ext.11613. Fax: 316 55 26

Presentado 6 de diciembre de 2006, aceptado 28 de marzo 2007, correcciones 22 de mayo de 2007.

RESUMEN

El presente artículo explora el papel que desempeña el folato como conocido metabolito del ciclo de un carbono (OCM, del inglés one-carbon metabolism) en la alteración de la integridad de las células nerviosas. Aquí se discute evidencia reciente de la literatura que muestra la reparación del ADN como un proceso relacionado con la apoptosis neuronal inducida por ausencia de folato.

Palabras clave: apoptosis, metabolismo, ADN glicosilasas, deficiencia de ácido fólico, reparación del ADN.

ABSTRACT

This essay explores the role of folate in disruption of neural cell integrity. Here, it is discussed recent evidence which shows DNA reparation as a process related to neuronal apoptosis induced by folate depletion.

Key words: Apoptosis, metabolism, DNA glycosylases, Folic Acid, DNA Repair.

INTRODUCCIÓN

El folato es la materia prima en el metabolismo de un carbono (OCM, del inglés one-carbon metabolism), proceso implicado en la síntesis y reparación del ADN y diversas reacciones de metilación.

El folato adquirido en la dieta es la única fuente para los requerimientos del OCM, por lo tanto variaciones en su ingesta afectan el balance de productos intermediarios, entre ellos el aminoácido homocisteína conocido por sus efectos tóxicos en las células a altas concentraciones. Se cree que las alteraciones en el OCM conducen a apoptosis neuronal por diferentes vías: (i) incrementando los niveles de homocisteína extracelular (Lipton, 1997; Ho *et al.*, 2002); (ii) alterando el proceso de metilación (Ulrey *et al.*, 2005) y (iii) influenciando la síntesis de ADN a través de un desequilibrio en la proporción de los precursores (Fenech, 2001). Los dos primeros representan procesos patológicos bien documentados en disfunción neuronal y muerte celular. Sin embargo, en un estudio reciente (Krumann *et al.*, 2004) es reportado el papel del desequilibrio en los precursores del ADN que ocurre en la alteración del OCM y su relación con apoptosis. Este desajuste consiste en el bloqueo de la síntesis de purinas y timidina, lo cual conduce a la acumulación de dUTP y al mismo tiempo a un incremento en la incorporación errada de dUMP durante la replicación y reparación. El estudio examina si la supresión específica de una glicosilasa de ADN (Uracil-DNA glicosilasa, UNG EC 3.2.2.3) que corrige estos errores en el ADN, induce apoptosis neuronal.

En el primer conjunto de experimentos se muestra como el *knockdown* para la expresión de UNG induce muerte celular en neuronas hipocampales embrionarias de rata. Es interesante como después del uso de Oligonucleótidos Antisentido (ASO, del inglés *anti-sense oligonucleotide*) para disminuir la expresión de la UNG humana por pocas horas (3-9 h), el número de neuronas continúa disminuyendo aún cuando los niveles de proteína (immunoblot) y mRNA (RT-PCR) fueron recuperados después de 12 h. Esto quizás indica que las caspasas fueron inducidas y así la muerte celular ocasionada fue un proceso irreversible. El uso de la técnica de ARN de interferencia (RNAi) como una aproximación alterna a la técnica ASO debería ser considerada. A pesar de que no hay diferencias significativas entre metodologías para la regulación a la baja de un gen (Scherer y Rossi, 2003; Tachikawa *et al.*, 2006), el RNAi presumiblemente toma ventaja de la maquinaria celular específicamente diseñada para una inhibición selectiva del proceso de transcripción del gen escogido; en contraste, ASO actúa por difusión hacia su blanco lo que implica un incremento en la sonda a usarse y en la probabilidad de efectos inespecíficos.

El segundo conjunto de experimentos investiga la validez de la siguiente hipótesis: “la inhibición de la expresión de la UNG causa muerte celular del tipo apoptosis en estos mismos cultivos neuronales”. De los experimentos con el inhibidor de caspasas de amplio espectro z-VAD-fluorometil cetona (zVAD), es posible verificar la implicación de estas proteínas efectoras del proceso apoptótico ya que el inhibidor produce una atenuación considerable en los efectos tóxicos de los antisentidos (AS) para UNG.

Estos resultados sugieren que la apoptosis es el mayor evento involucrado en neuronas UNG-suprimidas. Adicionalmente, la toxicidad de los AS debido a unión con blancos inespecíficos no es apreciable cuando las caspasas son inhibidas o al menos esa toxicidad está bajo el control de caspasas.

La evaluación de la acumulación de p53 en neuronas después de la inhibición de la expresión de UNG fue el objetivo en el siguiente grupo de experimentos. Modificaciones post-trasduccionales son responsables de la estabilización de p53, que juega un papel crítico en la mediación del arresto del ciclo celular, la reparación del ADN y el proceso apoptótico. La fosforilación de p53 en la serina 15 es el evento de estabilización analizado en este conjunto de experimentos, mostrando que la apoptosis inducida por AS para UNG es inducida por un mecanismo dependiente de p53. A este respecto un análisis complementario acerca de las diferentes formas de regulación de p53 (metilación, acetilación, sumoilación o fosforilación en otros residuos) podría ser interesante (Appella y Anderson, 2001). Por ejemplo la metilación de p53 es un buen candidato, resaltando que la adición de grupos metilo es un proceso que se encuentra alterado cuando hay anomalías en el OCM. La actividad de metiltransferasas sobre p53 afectando de manera positiva su estabilidad fue reportada recientemente (Chuikov *et al.*, 2004). Un *knockout* transgénico para p53 confirmó que la proteína es necesaria para inducir apoptosis neuronal bajo la supresión de UNG; pero sin embargo el *knockout* y los experimentos de inhibición de p53 no evalúan la estabilización adicional de p53 previamente discutida. Adicionalmente, existe controversia al respecto de la efectividad de la inhibición de p53 por Pifithrin (Komarova *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2004; Walton *et al.*, 2005), compuesto utilizado en los experimentos de inhibición. A pesar de estas observaciones es claramente demostrada la mediación de p53 en la apoptosis producida por regulación a la baja de UNG.

El ensayo del cometa y el ensayo de inhibición de la poliADP-ribosa polimerasa (PARP, EC2.4.2.30) fueron las técnicas usadas para la evaluación en el daño del ADN como una causa de la apoptosis neuronal en neuronas reguladas a la baja para UNG. El daño en el ADN es evidente al microscopio debido a la apariencia similar a un cometa del ADN en neuronas expuestas a AS. En otro artículo (Kruman *et al.*, 2000), el mismo grupo de investigación había reportado previamente una secuencia de eventos cuando ocurre activación de las vías apoptóticas por homocisteína; esta progresión tiene diferentes etapas comenzando con daño en el ADN, activación de PARP, activación de caspasas y activación de p53 siguiendo con una disminución en el potencial de membrana mitocondrial y terminando con desintegración nuclear. Allí es reportado un incremento en la muerte por necrosis, cuando hay inhibición de caspasas, en neuronas hipocampales tratadas con homocisteína. Este hecho fue explicado por un incremento en la activación de PARP, enzima que es clivada por caspasas en la muerte celular apoptótica, produciendo depleción de ATP y necrosis. Sin embargo, no se puede excluir que la homocisteína puede causar la muerte de las neuronas por un mecanismo apoptótico independiente de caspasas. En neuronas suprimidas para UNG la supervivencia no estuvo afectada significativamente por el mismo inhibidor de caspasas (zVAD), lo cual es acorde con un papel neurotóxico de la homocisteína.

La demostración de como la alteración del OCM afecta la expresión de UNG *in vivo* fue llevada a cabo usando un *knockout* para la Cistationina-Beta-Sintasa (CBS, EC 4.2.1.22), un modelo de hiperhomocisteinemia asociado con incremento en incorporación anómala de dUMP en el ADN vía disminución de las reservas de dTTP. Cambios en la expresión de la UNG en cerebro y timo comparando ratones CBS silvestres y *knockouts* representan las observaciones más interesantes. La UNG, que es normalmente expresada a altos niveles en timo debido a su alto potencial proliferativo, fue indetectable en el *knockout* para CBS. En contraste, la expresión de la UNG en el cerebro fue alta en el mutante e indetectable en el silvestre. En células mitóticas, la interpretación de los resultados es que la hiperhomocisteinemia severa y la alteración del OCM bloquean la síntesis de precursores de ADN, lo cual resulta en la inhibición de la actividad de proliferación en los tejidos del ratón *knockout*. Ya que la expresión de la UNG está bajo el control del ciclo celular y está asociada con la maquinaria de replicación del ADN la supresión de esta maquinaria puede regular a la baja la expresión de la UNG. En el caso de las células post-mitóticas, entre ellas las neuronas, la regulación a la alta de la UNG en estos *knockouts* es posible si este proceso sirve como un mecanismo compensatorio en el cual las células intentan activar un mecanismo de reparación específico cuando la incorporación anómala de uracilo es elevada. Otro estudio en neuronas embrionarias de rata (Vinson y Hales, 2002) mostró que la exposición de estas a metotrexato, una sustancia que inhibe el OCM e incrementa los niveles de homocisteína, incrementa los transcritos de UNG (30-40%) después de 6h de cultivo con 0,5 μ M de metotrexato; sin embargo, la expresión y la actividad de la proteína no fue afectada. Con esta evidencia, los experimentos deben ser probados en otros modelos con alteración del OCM (Ernest *et al.*, 2002), con el fin de verificar si existe un cambio real en el nivel de la proteína UNG o en su actividad. La exposición a metotrexato de células progenitoras neurales C17.2 mostró el impacto sobre el OCM y sobre el balance de los precursores del ADN, y adicionalmente muestra una conexión entre alteración del OCM e inhibición de la actividad proliferativa de las células *in vitro*. El resultado puede ser un poco confuso debido a que el metotrexato incrementa los niveles de homocisteína y desencadena vías apoptóticas y no apoptóticas en las células como fue previamente discutido, enmascarando así el efecto sobre la síntesis de ADN y la proliferación.

La importancia de la UNG en la supervivencia neuronal es demostrada por al menos otros dos estudios (Endres *et al.*, 2004; Imam *et al.*, 2006), pero hay algunas preguntas aún sin responder relacionadas al papel de la UNG y otras glicosilasas en el cerebro. El *knockout* para UNG sobrevive hasta la adultez y no exhibe un incremento desmesurado en la frecuencia de mutaciones espontáneas (Nilsen *et al.*, 2000); esto podría ser explicado por la presencia de SMUG1 (del inglés, *single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase* EC 3.2.2.-) otra uracilo ADN glicosilasa que substituye la actividad en ratones deficientes en la UNG (Nilsen *et al.*, 2001; An *et al.*, 2005). Entonces, ¿Qué ocurre con SMUG1 en neuronas hipocámpales?, ¿Existe otra ADN glicosilasa, aparte de aquellas identificadas hasta ahora (Lindahl y Wood, 1999) que puedan substituir la actividad de UNG en el cerebro?, ¿Están las demás uracilo-DNA glicosilasas reguladas a la baja en neuronas?

Los estudios acerca de la UNG complementan el punto de vista de los autores con respecto a la asociación entre la neurodegeneración y la activación de la maquinaria del ciclo celular en neuronas post-mitóticas (Kruman *et al.*, 2004). Una de las premisas sobre la cual esta tesis está basada, es la interacción entre los factores involucrados en la reparación del ADN y las proteínas que se conoce están asociadas con la maquinaria de replicación del ADN. Esta teoría y otras, tales como la que plantea neurogénesis en el cerebro (Scott y Hansen, 1997), han comenzado a descubrir un nuevo campo de investigación cuyo estudio explora el ciclo celular en el sistema nervioso central adulto.

La importancia del estudio de la alteración en el OCM está sustentada por la aparición de desórdenes neurológicos en humanos tales como defectos del tubo neural (Wald, 2005; Blom *et al.*, 2006; Dunlevy *et al.*, 2007), enfermedad de Alzheimer (Luchsinger y Mayeux, 2004; Meeks *et al.*, 2006), y aquellos relacionados con el síndrome de Down (Fillon-Emery, 2004; Gueant *et al.*, 2005); así, el ciclo celular y la reparación del ADN podrían estar más asociados de lo anteriormente pensado a patologías neurodegenerativas y/o del neurodesarrollo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la International Brain Research Organization y al Venezuela Neuroscience Course 2005: "Brain-Environment Interactions" por brindar el contexto académico para desarrollar las ideas acá plasmadas.

BIBLIOGRAFÍA

- AN Q, ROBINS P, LINDAHLT, BARNES DE. C-T Mutagenesis and C-Radiation Sensitivity Due to Deficiency in the Smug1 and Ung DNA Glycosylases. *EMBO J.* 2005;24(12):2205-2213.
- APPELLA E, ANDERSON CW. Post-Translational Modifications and Activation of p53 by Genotoxic Stresses. *Eur J Biochem.* 2001;268:2764-72.
- BLOM HJ, SHAW GM, DEN HEIJER M, FINNELL RH. Neural Tube Defects and Folate: Case Far From Closed. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7:724-731.
- CHUIKOV S, KURASH JK, WILSON JR, XIAO B, JUSTIN N, IVANOV GS, *et al.* Regulation of p53 Activity Through lysine Methylation. *Nature.* 2004;432:353-360.
- DUNLEVY LP, CHITTY LS, BURREN KA, DOUDNEY K, STOJILKOVIC-MIKIC T, STANIER P, *et al.* Abnormal Folate Metabolism in Foetuses Affected by Neural Tube Defects. *Brain.* 2007;130:1043-1049.
- ENDRES M, BINISZKIEWICZ D, SOBOL RW, HARMS C, AHMADI M, LIPSKI A, *et al.* Increased Postischemic Brain Injury in Mice Deficient in Uracil-DNA Glycosylase. *J Clin Invest.* 2004;113: 1711-21.
- ERNEST S, CHRISTENSEN B, GILFIX BM, MAMER OA, HOSACK A, RODIER M, *et al.* Genetic and Molecular Control of Folate-Homocysteine Metabolism in Mutant Mice. *Mamm Genome.* 2002;13:259-267.
- FENECH M. The Role of Folic Acid and Vitamin B12 in Genomic Stability of Human Cells. *Mutat Res.* 2001;475:57-67.

FILLON-EMERY N. Homocysteine Concentrations in Adults with Trisomy 21: Effect of B Vitamins and Genetic Polymorphisms. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:1551-1557.

GUEANT JL, ANELLO G, BOSCO P, GUEANT-RODRIGUEZ RM, ROMANO A, BARONE C, *et al.* Homocysteine and Related Genetic Polymorphisms in Down's Syndrome IQ. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005;76:706-709.

HO PI, ORTIZ D, ROGERS E, SHEA TB. Multiple Aspects of Homocysteine Neurotoxicity: Glutamate Excitotoxicity, Kinase Hyperactivation and DNA Damage. *J Neurosci Res.* 2002;70(5):694-702.

IMAM SZ, KARAHALIL B, HOGUE BA, SOUZA-PINTO NC, BOHR VA. Mitochondrial and Nuclear DNA-Repair Capacity of Various Brain Regions in Mouse is Altered in an Age-Dependent Manner. *Neurobiol Aging.* 2006;27:1129-1136.

KOMAROVA EA, NEZANANOV N, KOMAROV PG, CHERNOV MV, WANG K, GUDKOV AV. p53 Inhibitor Pifithrin- α can Suppress Heat Shock and Glucocorticoid Signaling. *J Biol Chem.* 2003;278:15465-15468.

KRUMAN II, CULMSEE C, CHAN SL, KRUMAN Y, GUO Z, PENIX L, *et al.* Homocysteine elicits a DNA Damage Response Promotes Apoptosis and Hypersensitivity to Excitotoxicity. *J Neurosci.* 2000;20:6920-6926.

KRUMAN II, SCHWARTZ E, KRUMAN Y, CUTLER RG, ZHU X, GREIG NH. Suppression of Uracil-DNA Glycosylase Induces Neuronal Apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279:43952-43960.

KRUMAN II, WERSTO RP, CARDOZO-PELAEZ F, SMILENOV L, CHAN SL, CHREST FJ, *et al.* Cell Cycle Activation Linked to Neuronal Cell Death Initiated by DNA Damage. *Neuron.* 2004;41:549-561.

LINDAHL T, WOOD R. Quality Control by DNA Repair. *Science* 1999; 286: 1897-1905.

LIPTON SA, KIM WK, CHOI YB, KUMAR S, D'EMILIA DM, RAYUDU PV, *et al.* Neurotoxicity Associated with Dual Actions of Homocysteine at the N-methyl-D-aspartate Receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(11):5923-5928.

LUCHSINGER JA, MAYEUX R. Dietary Factors and Alzheimer's Disease. *Lancet Neurol.* 2004;3:579-587.

MEEKS TW, ROPACKI SA, JESTE DV. The Neurobiology of Neuropsychiatric Syndromes in Dementia. *Curr Opin Psychiatry.* 2006;19:581-586.

MURPHY PJ, GALIGNIANA MD, MORISHIMA Y, HARRELL JM, KWOK RP, LJUNGMAN M, *et al.* Pifithrin- α inhibits p53 Signaling After Interaction of the Tumor Suppressor Protein with hsp90 and Its Nuclear Translocation. *J Biol Chem.* 2004;279:30195-30201.

NILSEN H, ROSEWELL I, ROBINS P, SKJELBRED CF, ANDERSEN S, SLUPPHAUG G, *et al.* Uracil-DNA Glycosylase (UNG)-Deficient Mice Reveal a Primary Role of the Enzyme During DNA Replication. *Mol Cell.* 2000;5:1059-1065.

NILSEN H, HAUSHALTER KA, ROBINS P, BARNES DE, VERDINE GL, LINDAHL T. Excision of Deaminated Cytosine from the Vertebrate Genome: Role of SMUG1 Uracil-DNA Glycosylase. *EMBO J.* 2001;20:4278-4286.

SCHERER LJ, ROSSI JJ. Approaches for the Sequence-Specific Knockdown of mRNA. *Nat Biotechnol.* 2003;21:1457-1465.

SCOTT DE, HANSEN SL. Post-Traumatic Regeneration, Neurogenesis and Neuronal Migration in the Adult Mammalian Brain. *Va Med Q.* 1997;124:249-261.

TACHIKAWA K, BRIGGS SP. Targeting the Human Genome. *Curr Opin Biotechnol.* 2006; 17: 659-665.

ULREY CL, LIU L, ANDREWS LG, TOLLEFSBOL TO. The Impact of Metabolism on DNA Methylation. *Hum Mol Genet.* 2005;14:R139-R147.

VINSON RK, HALES BF. Expression and Activity of the DNA Repair Enzyme Uracil DNA Glycosylase During Organogenesis in the Rat Conceptus and Following Methotrexate Exposure *in vitro*. *Biochem Pharmacol.* 2002;15:711-721.

WALD NJ. Folic Acid and the Prevention of Neural-Tube Defects. *N Engl J Med.* 2005;350:101-103.

WALTON MI, WILSON SC, HARDCASTLE IR, MIRZA AR, WORKMAN P. An Evaluation of the Ability of Pifithrin-Alpha and -Beta to Inhibit p53 Function in Two Wild-Type p53 Human Tumor Cell Lines. *Mol Cancer Ther.* 2005;4:1369-1377.

