



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PARTICIPACIÓN DE LA CATALASA EN LA
SENESCENCIA CELULAR DE FIBROBLASTOS
EMBRIONARIOS DE RATÓN.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

DAVID ALEJANDRO RIVERA MIRANDA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES

FEBRERO 2022





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos académicos

Al Dr. Luis Covarrubias por permitirme ser parte de su laboratorio y por el apoyo académico y económico para poder realizar este proyecto. Por su apoyo, críticas a lo largo de este proyecto.

A la Dra. Gilda Guerrero Flores por el apoyo, planeación y la enseñanza durante los experimentos de este proyecto. Sin tu ayuda no hubiera podido terminar el proyecto, gracias por todo.

A la Dra. Celina García Melendrez por los comentarios y sugerencias a lo largo de este proyecto.

Al Dr. Leandro David Hernández García por su apoyo técnico durante la obtención de blastocitos de ratón en el Laboratorio de Producción de Roedores Transgénicos.

Al comité sinodal por sus valiosos comentarios y correcciones. Gracias a su tiempo y dedicación pude tener una visión más amplia del tema.

Agradecimientos personales

A mi mamá por todo el apoyo a lo largo de mi vida. Te agradezco muchísimo todo lo que has hecho por mí, por la educación que me diste, los regaños que me merecía y los sacrificios que tuviste que hacer para que pudiera terminar una carrera. Gracias a ti soy quien soy. Te amo Fran.

A Paco, Silvia y Angel por todas sus palabras de aliento, sus bromas, su apoyo. No tengo como pagarles todo lo que han hecho por mí.

A Ayli, Dani, Chuchín y Said por sus sonrisas, sus juegos, sus berrinches y su compañía pude terminar este viaje.

A Saúl, Rodrigo, Paulina, Mariana, Dan, Robe, Luis. Gracias por su compañía a lo largo de la carrera. Son y han sido unos muy buenos amigos, los quiero mucho.

A Vero (<3), Mishel, Javi, Marco, Alán y Conchita por su apoyo en el laboratorio y su grandiosa amistad. Gracias por hacer que mi estadía en Cuerna hubiera sido muy bonita. Los quiero mucho.

A Gilda por tu amistad, por tu apoyo, por los cafés y las cervezas, por toda tu compañía, por el chisme. Muchas gracias por todo. Te quiero mucho.

El presente estudio fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico con el proyecto “La catalasa como un regulador del metabolismo del hígado” (DGAPA, IN214219) y la beca de Ayudante de Investigador por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) otorgada a David Alejandro Rivera Miranda (CVU:1008809, expediente ayudante: 18349, I1200/15/2019)

Índice

Introducción	7
1. Especies reactivas de oxígeno.	7
2. Senescencia celular.....	8
2.1 Freno al ciclo celular	9
2.2 Características morfológicas y cambios ultra-estructurales en las células senescentes.....	10
2.3 Senescencia replicativa en humanos y senescencia inducida por estrés oxidativo en ratones.....	11
2.4 Modelos de ratones para estudiar la senescencia celular in vivo.	12
3. Peroxisomas.....	14
3.1 Metabolismo de lípidos en el peroxisoma.	14
3.2 Metabolismo redox del peroxisoma.....	15
3.3 Importación de proteínas de la matriz peroxisomal.	16
4. Catalasa	19
4.1 Importación peroxisomal de la catalasa.....	21
4.2 Alteraciones metabólicas relacionadas a la deficiencia de catalasa	23
Antecedentes.....	25
Hipótesis	31
Objetivo general	31
Materiales y métodos.....	32
Resultados	43
1. Fibroblastos embrionarios de ratones silvestres $Cat^{+/+}$ y mutantes $Cat^{-/-}$ no presentan diferencias en la proliferación celular.	43
2. Las isoformas de catalasa peroxisomal (Cat^p -SKL) y citosólica (Cat^c - Δ KANL) mostraron actividad y se localizaron en el peroxisoma y citosol, respectivamente.	55
3. La sobreexpresión de catalasa aumenta la proliferación de MEF silvestres $Cat^{+/+}$	60
4. Complementación de células troncales embrionarias (ESC) mutantes de catalasa $Cat^{-/-}$ con isoformas de catalasa citosólica Cat^c - Δ KANL y peroxisomal Cat^p -SKL.....	68
Discusión.....	70
1. Los fibroblastos mutantes $Cat^{-/-}$ tienen una viabilidad disminuida y baja capacidad proliferativa debido posiblemente al daño celular producido por el estrés oxidativo asociado a la criopreservación.	70
2. No hay diferencias en la capacidad proliferativa de fibroblastos silvestres $Cat^{+/+}$ y mutantes $Cat^{-/-}$ debido posiblemente a que el estrés oxidativo afecta similarmente a ambos genotipos.....	71
3. La catalasa citosólica Cat^c - Δ KANL podría aumentar la proliferación de fibroblastos por un mecanismo que disminuye los niveles de ROS en el citosol.....	73

4. La catalasa peroxisomal Cat ^p -SKL podría aumentar la esperanza de vida de fibroblastos Cat ^{+/+} por un mecanismo que involucra el metabolismo de lípidos y la señalización ROS.....	74
5. La ausencia de catalasa en el peroxisoma puede repercutir en la autofagia.....	76
6. Células troncales embrionicas Cat ^{-/-} complementadas con isoformas de catalasa Cat ^p -SKL y Cat ^c -ΔKANL podrían ser utilizadas para dilucidar la señalización de H ₂ O ₂ peroxisomal sobre la acumulación de lípidos y otros procesos celulares en animales.	77
Conclusiones.....	79
Referencias bibliográficas.....	80
Apéndices.	85
Apéndice 1: proliferación celular de fibroblastos embrionarios de ratón silvestres Cat ^{+/+} y mutantes Cat ^{-/-} ...	85
Apéndice 2: vectores empleados en biología molecular.....	89
Apéndice 3: proliferación celular de fibroblastos embrionarios de ratón Cat ^{+/+} transfectados con las isoformas de catalasa.....	90
Apéndice 4: derivación de células troncales embrionarias Cat ^{-/-}	94

Introducción

1. Especies reactivas de oxígeno.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) se les denomina a las moléculas producidas por la reducción parcial de oxígeno molecular (O_2). Las ROS se generan como subproductos derivados de reacciones metabólicas y la respiración aeróbica (Hernández-García *et al.*, 2010). Por lo tanto, su generación depende de la actividad metabólica y celular. Además, frecuentemente se asocia a organelos específicos. Las principales ROS producidas en mamíferos son: el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^\cdot) (Covarrubias *et al.*, 2008).

Debido a que la generación de ROS es un proceso intrínseco del metabolismo, las células deben tener un balance entre la degradación y producción de estas moléculas para mantener la homeostasis celular. La degradación de ROS se lleva a cabo por mecanismos enzimáticos y no-enzimáticos. Bajo condiciones de estrés ambiental y metabólico, los mecanismos antioxidantes pueden ser ineficientes, produciéndose un aumento en los niveles de ROS. Debido a sus propiedades químicas inherentes las ROS pueden reaccionar con los componentes moleculares (ej. causando oxidación de lípidos, carbonilación de proteínas, daño a las bases del DNA) y así causar daño celular. El estrés oxidativo es el fenómeno en el que una célula acumula una concentración excesiva de ROS que resulta en biomoléculas oxidadas, muchas de las cuales ya no son funcionales. No obstante, las ROS pueden actuar como segundos mensajeros al modificar el estado de oxidación de proteínas y lípidos. La señalización redox puede regular diferentes procesos celulares, como la proliferación, la diferenciación y la muerte celular (Covarrubias *et al.*, 2008; Schieber & Chandel, 2014).

El radical O_2^- es principalmente producido por la fosforilación oxidativa en la mitocondria y por las NADPH oxidasas. La degradación de superóxido se lleva a cabo por las superóxido dismutasas (SOD) que concomitantemente generan peróxido de hidrogeno (H_2O_2). El peróxido también puede ser producido por diferentes enzimas oxidasas, como las acil-Coa oxidasas (Acox) de la β -oxidación peroxisomal. El H_2O_2 es la principal ROS de la señalización redox debido a su estabilidad relativa, difusión y reactividad selectiva. Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno puede oxidar residuos de cisteína dentro de proteínas, alterando su estructura y función. Las enzimas peroxiredoxinas (Prx), catalasa y glutatión peroxidasas degradan el H_2O_2 . El H_2O_2 puede reaccionar con iones metálicos (ej. Fe^{2+}) y formar el radical HO^\cdot , el cual, al ser altamente reactivo, oxida indiscriminadamente a muchos componentes celulares (Covarrubias *et al.*, 2008; Schieber & Chandel, 2014). Por lo tanto, el contexto celular, el tipo de ROS, su concentración local y las tasas de generación y eliminación determinan si se produce señalización redox o estrés oxidativo.

2. Senescencia celular

La senescencia celular es un estado celular que adoptan las células frente a diferentes estímulos estresantes o procesos fisiológicos. Este estado viable y metabólicamente activo se caracteriza por el freno del ciclo celular, expansión del tamaño celular, daño a componentes macromoleculares, un característico fenotipo secretorio y alteraciones metabólicas (Gorgoulis *et al.*, 2019; Ogrodnik *et al.*, 2019).

La senescencia celular fue descrita hace más de 60 años en células humanas cultivadas *in vitro* cuando se observó que, después de varias divisiones celulares, las células dejan de dividirse (Hayflick, 1965). Este fenómeno específico de células humanas cultivadas *in vitro* se denominó senescencia replicativa y es causado principalmente por el acortamiento de telómeros (Sharpless & Sherr, 2015). La senescencia celular también puede inducirse por diferentes estímulos estresantes, como la quimioterapia, el estrés oxidativo, la activación de oncogenes, el daño al DNA, las alteraciones mitocondriales, el estrés en retículo endoplásmico, etc. (Hérmendez-Segura *et al.*, 2019).

El estudio de las características que definen y los mecanismos que controlan la senescencia se llevó a cabo principalmente en cultivo *in vitro* de células mitóticas, como fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales. Con el reconocimiento de que células senescentes se encuentran en diferentes tejidos de mamíferos, incluyendo humanos, la función de la senescencia y sus efectos celulares autónomos y no-autónomos han permitido definir el programa senescente como una respuesta pleiotrópica antagonista evolutiva, es decir, un programa celular que la selección natural favoreció para promover la eficacia reproductiva en las primeras etapas de la vida, pero que en fases posteriores de la vida este programa celular está acompañado de consecuencias adversas para la sobrevivencia del organismo (He & Sharpless, 2017; Campisi, 2013). Por ejemplo, la senescencia está involucrada en la reparación de tejidos después de daño, promueve la eliminación de células dañadas por el sistema inmune y se ha descrito un programa de senescencia celular programada durante el desarrollo embrionario que participa como parte de los procesos y mecanismos de la morfogénesis de diferentes estructuras embrionarias (He & Sharpless, 2017). La estimulación aberrante de señalización oncogénica o la pérdida de supresores tumorales también inducen senescencia celular, por lo que se ha considerado que la supresión tumoral es una función importante de la senescencia debido a que impone un freno al ciclo celular en células que tienen daño y pueden someterse a transformación neoplásica (Milanovic *et al.*, 2018). En lo que respecta a los efectos adversos, la acumulación de células senescentes en los tejidos a lo largo del proceso de envejecimiento llevó a considerar la senescencia como un proceso que contribuye al desarrollo de patologías relacionadas con la edad y el envejecimiento (He & Sharpless, 2017). Entre estos efectos adversos, se ha mostrado que las células senescentes promueven la proliferación de células cancerígenas por un mecanismo celular no-autónomo, por lo que contribuye a la carcinogénesis (Campisi, 2013).

2.1 Freno al ciclo celular

La característica principal de las células senescentes es el freno perdurable del ciclo celular, es decir, que son incapaces de proliferar bajo condiciones fisiológicas normales (Di Micco *et al.*, 2020). Este freno del ciclo celular se distingue de la quiescencia y diferenciación terminal, procesos que también involucran el freno del ciclo celular, por su durabilidad, características asociadas y mecanismos de inicio y mantenimiento.

La diferenciación terminal es un proceso programado de desarrollo en el que células progenitoras se diferencian y adquieren un fenotipo morfológico y funcional, lo que conlleva concomitantemente al freno estable del ciclo celular. Los factores transcripcionales que controlan la diferenciación también promueven el freno irreversible del ciclo celular a través de la inhibición de cinasas dependientes de ciclina (CDK, del inglés *cyclin-dependent kinase*) (Ruijtenberg & Heuvel, 2016). Por otra parte, la quiescencia es un proceso por el cual una célula con capacidad proliferativa se somete a un estado no proliferativo reversible en respuesta a diversos estímulos (ej. inhibición por contacto, exposición a citosinas anti-proliferativas) (Sharpless & Sherr, 2015). El mecanismo molecular que inicia y mantiene la quiescencia se basa en la regulación de la vía Rb-E2F. Las células quiescentes tienen bajos niveles de expresión de activadores de la vía Rb-E2F (CycD y Cdk2) y altos niveles inhibidores de CDK (CDKi, por sus siglas en inglés) (ej. p21, p27). El fenotipo quiescente es reversible y las células pueden continuar la entrada al ciclo celular bajo ciertos estímulos de crecimiento y desarrollo (Yao, 2014).

En las células senescentes el freno del ciclo celular impide que las células proliferen cuando se sometan a estimulación mitogénica y oncogénica (Sharpless & Sherr, 2015). El freno es establecido y mantenido por las principales vías de supresores tumorales p53/p21^{WAF1/CIP1} y p16^{INK4A}/Rb (Herranz & Gil, 2018; Di Micco *et al.*, 2020). La respuesta de daño a DNA (DDR, del inglés *DNA damage response*) activada por diferentes tipos de señales estresantes induce la estabilización de p53, el cual promueve un programa transcripcional anti-proliferativo, entre los que se encuentra la activación transcripcional del gen *Cdkn1a*. El producto de este gen, p21^{WAF1/CIP1}, inhibe la actividad de todas las CDK, lo que resulta en la hipo-fosforilación de Rb. La proteína Rb hipo-fosforilada se une e inactiva los complejos E2F, iniciando la salida del ciclo celular. Si el estímulo estresante es transitorio, la activación de p53 inhibe temporalmente el ciclo celular. Si el estrés es persistente u otras señales adicionales intervienen, se puede activar permanentemente p53. Además, se puede inducir la transcripción del locus *INK4/ARF* que contiene tres supresores tumorales: ARF (proteína producida por procesamiento alternativo del gen *Cdkn2a*; también llamada p14^{ARF} en humanos y p19^{ARF} en ratones), p16^{INK4A} (*Cdkn2a*) y p15^{INK4B} (*Cdkn2b*). Mientras que p16^{INK4A} inhibe a CDK4/6 e induce la hipo-fosforilación de Rb, la proteína ARF participa en el freno del ciclo celular al activar positivamente a p53 a través de la inhibición de MDM2, una ligasa de ubiquitina que induce la degradación de p53 (Herranz & Gil, 2018; Di Micco *et al.*, 2020). Aunque la estructura y función de p15^{INK4B} es similar a p16^{INK4A}, poca atención se ha puesto sobre el papel de p15^{INK4B} en la senescencia celular

(Hérrnandez-Segura *et al.*, 2019). Las otras características que identifican la senescencia celular (daño celular, metabolismo alterado y fenotipo secretorio) cooperan para reforzar el freno del ciclo celular por diferentes mecanismos (ver revisiones de Gorgoulis *et al.*, 2019; Hérrnandez-Segura *et al.*, 2019; Sharpless & Sherr, 2015)

2.2 Características morfológicas y cambios ultra-estructurales en las células senescentes.

Desde los primeros estudios de la senescencia celular *in vitro*, se observó que las células senescentes se caracterizan por tener una morfología aplanada e irregular, diferente a la forma de una célula proliferativa, abarcar una mayor área de fijación al sustrato y presentar un gran número de vacuolas en el citoplasma (Hayflick & Moorhead, 1961).

La senescencia induce un aumento del número y tamaño de diferentes organelos. Por ejemplo, las células senescentes presentan un mayor número de mitocondrias, las cuales además de tener alterado el potencial de membrana, tienen mayor producción de ROS, fuga de protones y presentan alteración en las tasas de fusión y fisión (Gorgoulis *et al.*, 2019). También se observa un mayor número y tamaño de lisosomas disfuncionales que trata de ser compensado con un aumento de su biogénesis (Gorgoulis *et al.*, 2019; Robbins *et al.*, 1970). Las células senescentes tienen mayor número de peroxisomas, los cuales presentan estrés oxidativo y deficiencias en su capacidad de importación de proteínas (Legakis *et al.*, 2002). El mayor número de estos organelos puede ser una respuesta celular que contrarresta la acumulación de organelos disfuncionales al aumentar la biogénesis de compartimentos funcionales (Gorgoulis *et al.*, 2019). Por otra parte, el aumento del número de organelos puede ser un efecto indirecto debido a la estimulación por factores de crecimiento y proliferativos, que son señales provenientes del medio de cultivo *in vitro*, en células senescentes sin capacidad proliferativa (Gorgoulis *et al.*, 2019).

Las células senescentes en tejidos y en cultivos se caracterizan por un aumento en el volumen celular (Biran *et al.*, 2017). Se ha propuesto que este fenómeno de hipertrofia es un efecto indirecto producido por la constante promoción de proliferación y crecimiento (ej. factores de crecimiento en medio de cultivo *in vitro* y el fenotipo secretorio en tejidos). Si bien las células con freno del ciclo celular no pueden proliferar, la presencia de estas señales proliferativas y de crecimiento inducen el aumento en el tamaño celular. Esto también explicaría la promoción de biogénesis de organelos (Ogrodnik *et al.*, 2019). Además, el aumento en el volumen celular es suficiente para evitar la progresión del ciclo celular en fibroblastos humanos y por lo tanto contribuye al freno del ciclo celular durante la senescencia (Neurohr *et al.*, 2019). Así, el aumento del tamaño celular es una causa y consecuencia del fenotipo senescente.

2.3 Senescencia replicativa en humanos y senescencia inducida por estrés oxidativo en ratones.

La senescencia es una respuesta inducida por diferentes factores estresantes que, dependiendo de la intensidad, duración y tipo de agente estresante, conducen a diferentes programas senescentes. Por ejemplo, el programa de senescencia inducida por alteraciones mitocondriales presenta su propio fenotipo secretorio (Wiley *et al.*, 2016). Además, dependiendo del tipo celular y la especie se pueden producir diferentes programas de senescencia.

A excepción de los tejidos germinales, los tejidos somáticos humanos y las líneas celulares humanas normales no tienen actividad de telomerasa debido a la nula expresión de la subunidad transcriptasa reversa de la telomerasa (hTERT) (Kim *et al.*, 2001; Martin-Rivera *et al.*, 1995). Así, la senescencia de fibroblastos humanos en cultivos *in vitro* se debe al acortamiento de telómeros que se produce en cada división celular (Bodnar *et al.*, 1998). Estos extremos cromosomales desprotegidos activan crónicamente la respuesta de daño a DNA, la cual induce la activación de los efectores p53 y p21^{WAF1/CIP1} para frenar el ciclo celular en la fase G1. El inhibidor de CDKi p16^{INK4A} también se activa, pero es independiente del daño en los telómeros (Fagagna *et al.*, 2003; Herbig *et al.*, 2004).

La mayoría de los tejidos de ratón presentan actividad y expresión la expresión de la subunidad mTERT (Martin-Rivera *et al.*, 1995) y tienen grandes telómeros estables (>40 Kb en comparación a los 10 Kb en humanos; Kodama *et al.*, 2001). En función de lo anterior, el acortamiento de telómeros no parece ser un factor que induce la senescencia en las células de ratón proliferativas. Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, del inglés *mouse embryonic fibroblast*), a pesar de tener actividad de telomerasa (Kodama *et al.*, 2001), senescen después de pocas duplicaciones celulares (8-10 duplicaciones poblacionales) al cultivarse en condiciones estándar de cultivo *in vitro* (21% O₂) (Parrinello *et al.*, 2003). El cultivo en 21% O₂ produce aberraciones cromosomales desde el inicio de derivación de fibroblastos, en la fase de adaptación al cultivo. Posteriormente, durante los pases celulares y en la senescencia se acumula daño oxidativo en el DNA en sitios genómicos diferentes a los telómeros (Busuttil *et al.*, 2003). Estas alteraciones estimulan la activación de la respuesta de daño a DNA, la cual, en asociación con p19^{ARF} activa p53 para inducir el freno del ciclo celular (Di Micco *et al.*, 2020). Además, aumenta la expresión de p16^{INK4A} que contribuye a establecer la senescencia (Parrinello *et al.*, 2003). Debido a las pocas duplicaciones celulares los telómeros no muestran un acortamiento importante (Kodama *et al.*, 2001).

Cuando los fibroblastos humanos se cultivan en bajas concentraciones de oxígeno (3% O₂) se retrasa el inicio en el que las células senescen comparado a lo que sucede a 20% O₂ (Poulios *et al.*, 2007). En cambio, los MEF crecen más rápido y a mayores densidades a 3% O₂ que el cultivo a 20% O₂, pudiendo alcanzar hasta 60 duplicaciones poblacionales sin evidencia de senescencia (Parrinello *et al.*, 2003). A pesar de lo anterior, los

cultivos muestran una ligera expresión de p16^{INK4A} y p19^{ARF}, así como una ligera estabilización de p53. Los MEF de pases tardíos cultivados en 3% O₂ retienen la actividad y regulación de p53, p21^{WIP1/CIP1} y p19^{ARF}, por lo que senescen cuando se irradian con rayos X o hay sobre-estimulación oncogénica (ej. Ras). La vía Rb es también funcional en estos MEF crecidos a 3% O₂, pues en condiciones sin señales de crecimiento y proliferación (sin suero fetal bovino) no se fosforila Rb y disminuye la síntesis de DNA. La funcionalidad de p53 y Rb podría explicar que las células puedan proliferar con una baja expresión de p16 y p19. Por último, en 3% O₂ los fibroblastos de ratón acumularon menos daño oxidativo al DNA, así como rupturas cromosómicas con respecto al cultivo en 20% O₂ (Busuttil *et al.*, 2003; Parrinello *et al.*, 2003). Los MEF derivados de ratones nulos en el componente de RNA de la telomerasa (mTr^{-/-}) de generación tardía senescen en condiciones de 20% de oxígeno, pero no a 3%. Esto indica que la alteración de los telómeros no es la principal causa de la senescencia de MEF, sino que la mayor sensibilidad a estrés oxidativo de las células de ratón induce la senescencia celular (Parrinello *et al.*, 2003). Con base en lo anterior, las células de ratón pueden ser un modelo a través del cual se pueda estudiar el papel que tienen los diferentes tipos de estrés oxidativo exógenos y endógenos sobre la senescencia celular.

Otra diferencia importante entre las células senescentes de ratón y humano es el perfil secretorio. El fenotipo secretorio asociado a senescencia (SASP, del inglés *senescence-associated secretory phenotype*) de fibroblastos de ratón inducido por estrés oxidativo difiere marcadamente del fenotipo secretorio de células humanas senescentes. Específicamente, los MEF proliferativos y senescentes (inducidos por estrés oxidativo en 21% O₂) tienen los mismos niveles de expresión de diferentes componentes del SASP: interleucina 6, proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina (IGFBP6), inhibidor de la metalopeptidasa TIMP (TIMP1) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); metalo-peptidasa de matriz (MMP1, 3, 10 y 12) y citosinas de las familias Cxcl (Cxcl1, 2, 4, 5) y Ccl (Ccl1, 2, 11, 12) (Coppé *et al.*, 2010). Es decir, el estado senescente inducido por estrés oxidativo no promueve un perfil secretorio en células de ratón. Esto no significa que las células de ratón senescentes no desarrollen un fenotipo secretorio bajo otros estímulos. Por ejemplo, los MEF senescentes inducidos por daño al DNA (tratamiento con rayos X) tienen un perfil secretorio similar al SASP de células humanas senescentes, incluyendo la secreción de citosinas proinflamatorias, factores y reguladores de crecimiento, metalo-proteínas y las formas solubles de moléculas de adhesión y receptores de superficie celular (Coppé *et al.*, 2010).

2.4 Modelos de ratones para estudiar la senescencia celular *in vivo*.

El enfoque para determinar la contribución de células senescentes a una condición fisiológica *in vivo* es la remoción farmacológica o genética (Di Micco *et al.*, 2020). Una característica prominente de las células senescentes es su resistencia a apoptosis mediada por vías de supervivencia. En función de lo anterior, se han desarrollado compuestos farmacológicos, llamados senolíticos, que inducen selectivamente muerte celular en

células senescentes. Debido a su eficacia para eliminar las células senescentes *in vivo*, se están desarrollando nuevas estrategias terapéuticas para removerlas que se enfocan a potenciar el sistema inmune contra las células senescentes o a través del bloqueo de los factores que regulan la secreción de fenotipo secretorio (Ovadya & Krizhanovsky, 2018).

Los modelos transgénicos para eliminar células senescentes *in vivo* se basan en la muerte celular inducida por transgenes expresados bajo el control de los principales reguladores del freno del ciclo celular de la senescencia: p16^{INK4A} (Baker *et al.*, 2011; Demaria *et al.*, 2014), p19^{ARF} (Hashimoto *et al.*, 2016) y p21^{WIP1/CIP1} (Wang *et al.*, 2021).

Los ratones INK-ATTAC expresan una proteína de fusión (FKBP-Casp8) compuesta de la caspasa 8 y un fragmento de la proteína de unión a FK506. Cuando se administra AP20187, se induce la dimerización de FKBP-Casp8 para activar la vía de apoptosis. Este transgén se expresa bajo el control del promotor endógeno *Cdkn2a*, por lo que las células que expresen p16^{INK4A} pueden ser eliminados *in vivo* (Baker *et al.*, 2011). El segundo modelo, *p16-3MR*, el promotor endógeno *Cdkn2a* controla la expresión de las proteínas reporteras mRFP y luciferasa así como el gen de la timidina cinasa del virus de herpes simplex 1, el cual es letal en la presencia del fármaco ganciclovir al inducir muerte celular por apoptosis (Demaria *et al.*, 2014). Estos dos modelos han permitido entender el papel de las células senescentes p16^{INK4A} positivas en el envejecimiento y en enfermedades relacionadas a la edad, como aterosclerosis, osteoartritis, fibrosis pulmonar, enfermedad de Parkinson, entre otros (Di Micco *et al.*, 2020).

Se ha creado el modelo *p19-DTR* para entender el papel de las células que expresan p19^{ARF} en el envejecimiento y las enfermedades asociadas a la edad. En este modelo el gen *Cdkn2a* controla la expresión del receptor toxina de la difteria, lo que induce apoptosis mediante el bloqueo de la traducción de proteínas. Este estudio demostró que las células senescentes p19^{ARF} positivas contribuyen en el declive funcional del pulmón que se asocia al envejecimiento (Hashimoto *et al.*, 2016).

Recientemente se ha desarrollado el modelo transgénico *p21-Cre* que contiene el promotor *CDKN2A* controlando la expresión de la recombinasa Cre inducible (Wang *et al.*, 2021). Cruzando genéticamente el ratón *p21-Cre* con ratones que expresan la toxina de la difteria (*p21-Cre/+; LUC/DTA*), se han eliminado las células que expresan p21^{WAF1/CIP1} *in vivo*. Este modelo ha permitido explorar poblaciones senescentes que dependen de p21^{WAF1/CIP1} (Wang *et al.*, 2021).

Se han creado nuevos modelos transgénicos que tienen insertadas la recombinasa Cre y proteínas reporteras (ej. dTomato, luciferasa) en el gen *Ink4* endógeno (Grosse *et al.*, 2020; Omori *et al.*, 2020) para

identificar las células p16^{INK4A} y para poder eliminarlas adecuadamente sin interferir con la transcripción del gen *Cdkn2a*. Debido a que no todas las células que expresan p16^{INK4A} son células senescentes (ej. macrófagos activados tienen alta expresión de p16^{INK4A}), y no todas las células senescentes expresan p16^{INK4A}, este supresor tumoral puede no ser específico para todas las células senescentes *in vivo*. Esta limitación también se observa en los modelos dependientes de p21^{WIP1/CIP1} y p19^{ARF}. Por lo tanto, el campo de la senescencia necesita nuevos modelos animales que sean útiles para estudiar poblaciones senescentes no caracterizadas (Gasek *et al.*, 2021).

3. Peroxisomas.

Los peroxisomas son organelos que se encuentran en todas las células eucariotas. En mamíferos, estos organelos se caracterizan morfológicamente por una densa matriz proteica delimitada por una sola membrana y bioquímicamente por un conjunto específico de proteínas que producen y degradan H₂O₂. Estos organelos participan principalmente en el metabolismo de lípidos, pero también llevan a cabo el catabolismo de aminoácidos, oxidación de poliaminas, degradación de glioxilato, entre otros procesos. En función de su papel como centros metabólicos importantes, son muy abundantes en células del hígado, intestino, cerebro y tejido adiposo (Lodhi & Semenkovich, 2014).

Brevemente se describirán algunos aspectos del metabolismo peroxisomal, su biogénesis y mecanismos de importación a la matriz del peroxisoma. Cabe señalar que se describen los procesos en mamíferos, específicamente en humanos y ratones.

3.1 Metabolismo de lípidos en el peroxisoma.

El peroxisoma de mamíferos es un importante centro metabólico de lípidos, involucrándose en la β-oxidación de cadena muy larga, α-oxidación de ácidos grasos de cadena ramificada, síntesis de fosfolípidos de éter, ácidos biliares y colesterol (Lodhi & Semenkovich, 2014).

La β-oxidación de ácidos grasos se lleva a cabo en dos compartimientos celulares: la mitocondria y el peroxisoma. En la mitocondria se oxidan ácidos grasos de cadena corta (<C8), mediana (C8-C12) y larga (C14-C20) (Adeva-Andany *et al.*, 2019). Inicialmente se pensó que, cuando la mitocondria excedía su capacidad de oxidación en condiciones de alta demanda de energía, la oxidación peroxisomal de ácidos grasos de cadena larga complementaba esta demanda de actividad metabólica. Sin embargo, como la mitocondria no puede activar ácidos grasos de cadena muy larga (>C20), el peroxisoma se encarga exclusivamente de la oxidación inicial de estos ácidos grasos, los cuales al acortarse son transportados hacia la mitocondria para su oxidación completa (Adeva-Andany *et al.*, 2019; Reddy & Hashimoto, 2001). Es así como la mitocondria y el peroxisoma están conectados metabólicamente a través del transporte de lípidos e intermediarios metabólicos, aunque también intercambian otros metabolitos. Además, la β-oxidación peroxisomal metaboliza ácidos di-carboxílicos

provenientes de la ω -oxidación que inicia en el retículo endoplásmico (Wanders *et al.*, 2011). La β -oxidación también está involucrada en la vía de síntesis de ácidos biliares (Van Veldhoven & Baes, 2013). La α -oxidación de ácidos grasos de cadena ramificada se lleva a cabo exclusivamente en el peroxisoma (Jansen & Wanders, 2006). En este compartimiento también se llevan a cabo los dos primeros pasos de la síntesis de éter-lípidos, como plasmálogenos, los cuales posteriormente se transportan hacia el retículo endoplásmico para continuar su síntesis. Los peroxisomas llevan a cabo la síntesis de ácido docosahexanoico, el más abundante ácido ω -3 en cerebro y retina (Van Veldhoven & Baes, 2013)

3.2 Metabolismo redox del peroxisoma.

Debido al gran número de reacciones metabólicas que llevan a cabo, los peroxisomas son importantes centros generadores de ROS. Por ejemplo, en el hígado los peroxisomas consumen cerca del 20% de O_2 y producen el 35% de peróxido de hidrógeno celular. Las oxidasas dependientes de flavin mononucleótidos y dinucleotido, involucradas en el metabolismo de ácidos grasos, aminoácidos y poliaminas, son importante generadoras de este ROS peroxisomal. Debido a que el peroxisoma tiene un gran número de proteínas con grupos hemo, el H_2O_2 puede reaccionar con los iones Fe^{2+} y formar el radical HO^\cdot (Lismont *et al.*, 2015; 2019).

Para contener con la sobreproducción de peróxido, el peroxisoma presenta dos enzimas antioxidantes: catalasa y peroxiredoxina. La catalasa degrada H_2O_2 sin el uso de equivalentes de reducción y degrada H_2O_2 en concentraciones milimolares. La PRDX5 es una peroxidasa que reduce peróxidos de lípido, degrada H_2O_2 a concentración micromolar en presencia de oxidoreductasas (ej. tioredoxina) y tiene una amplia localización celular, como el peroxisoma, citosol, núcleo y la mitocondria (Lismont *et al.*, 2019; Fransen *et al.*, 2012).

Se ha propuesto que los peroxisomas pueden funcionar como fuentes de ROS por su actividad productora de H_2O_2 (Lismont *et al.*, 2015). Debido a su actividad antioxidante, estos compartimientos podrían captar el H_2O_2 del citosol. Para que el H_2O_2 u otros ROS peroxisomales influyan directamente en la señalización redox celular, los ROS deben permear hacia el citoplasma. Lo mismo es necesario para la entrada de H_2O_2 desde el citosol. Por el gran momento dipolar del H_2O_2 , la difusión simple a través de membranas biológicas es reducida (Lismont *et al.*, 2019). En células HeLa y HepG2 se han identificado acuaporinas específicas que permiten la difusión de H_2O_2 a través de la membrana celular, denominadas peroxiporinas. Aunque en el peroxisoma no se han encontrado este tipo de proteínas, no se descarta que otros canales aún no identificados permitan la difusión de H_2O_2 entre el organelo y el citosol (Lismont *et al.*, 2019).

Al medir el estado oxidativo celular usando un sensor redox (roGFP2) en fibroblastos de humano y MEF, los peroxisomas tienen un estado redox ligeramente más oxidante que el citosol, pero menor que la mitocondria (Ivashchenko *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Si se genera estrés oxidativo en el citosol y la mitocondria no se

afecta el estado redox peroxisomal. No obstante, la alteración redox en el peroxisomal repercute en el estado redox mitocondrial y citosólico (Ivashchenko *et al.*, 2011). Por otra parte, se esperaría que las células carentes de catalasa tuvieran mayor estrés oxidativo en el citosol como resultado de la fuga de H₂O₂ desde el peroxisoma debido a la acumulación de este ROS por la deficiencia de catalasa. Sin embargo, no hay diferencias en el estado redox citosólico y peroxisomal entre células silvestres y carentes de catalasa, pero sí incrementa en la mitocondria (Ivashchenko *et al.*, 2011). Aunque el mecanismo de esto no es conocido, una explicación propuesta es que el peroxisoma es un regulador cascada arriba del estado oxidativo mitocondrial y celular (Ivashchenko *et al.*, 2011).

Un mecanismo alternativo por el que los peroxisomas participan en la señalización redox puede depender de la peroxidación de lípidos, los cuales pueden actuar como segundos mensajeros en diferentes procesos celulares y peroxisomal y, por lo tanto, influir indirectamente en la señalización redox celular (Lismont *et al.*, 2015). Al excitar con luz verde la proteína fluorescente KR (del inglés *KillerRed*) se produce O₂⁻ y por lo tanto estrés oxidativo. Una variante peroxisomal de KR (po-KR) ha permitido encontrar que el radical superóxido induce la peroxidación de lípidos (LOO^{*}) en el peroxisoma. Estos lípidos oxidados peroxisomales pueden activar una vía de muerte celular que depende de la mitocondria, la cual es iniciada por la producción de H₂O₂ mitocondrial. Además, cuando se altera el metabolismo peroxisomal (ej. al evitar la síntesis de fosfolípidos de éter) las células son más sensibles a la activación de esta vía de muerte celular (Wang *et al.*, 2013). Por lo tanto, esto confirma que la señalización redox entre la mitocondria y el peroxisoma es un complejo proceso que no involucra simplemente la difusión de ROS desde el peroxisoma a la mitocondria. Este estudio (Wang *et al.*, 2013) también confirma otros estudios pioneros que propusieron que el peroxisoma es un regulador redox cascada arriba de la mitocondria en esta vía de señalización particular (Ivashchenko *et al.*, 2011; Koepke *et al.*, 2008; Walton & Pizzitelli, 2012).

3.3 Importación de proteínas de la matriz peroxisomal.

Debido a que el peroxisoma no contiene su propio material genético las proteínas de la matriz peroxisomal deben sintetizarse necesariamente en el citosol y ser transportadas post-traduccionalmente hacia este organelo. Las proteínas contienen señales codificadas por su secuencia de aminoácidos que son reconocidas por los sistemas de importación peroxisomal. El mecanismo y las proteínas de importación son conservadas desde levaduras hasta humanos, aunque se presentan elementos adicionales que son específicos de cada organismo. De forma general este proceso se puede dividir en: reconocimiento en el citosol de la proteína de matriz peroxisomal por su receptor; unión entre el complejo receptor-proteína cargo y el complejo de acoplamiento sobre la membrana peroxisomal; formación de poro transitorio que permite importar las proteínas hacia la matriz; ubiquitinación y

exportación del receptor al citosol para que esté listo para un nuevo ciclo de translocación (Fig.1) (Platta *et al.*, 2016).

En mamíferos hay tres sistemas de importación clasificados por la presencia o ausencia de la secuencia de localización peroxisomal (PTS): los sistemas PTS1, PTS2 y el sistema independiente de PTS (no-PTS) (Platta *et al.*, 2016). El componente en común de los sistemas PTS es el receptor Pex5. El gen *Pex5* codifica para dos transcritos resultados de splicing diferencial: Pex5S y Pex5L. El primero participa exclusivamente en la importación PTS1, mientras que el Pex5L, que contiene una corta secuencia adicional en la región N-terminal, interviene en la importación de PTS1 y PTS2 (Braverman *et al.*, 1998).

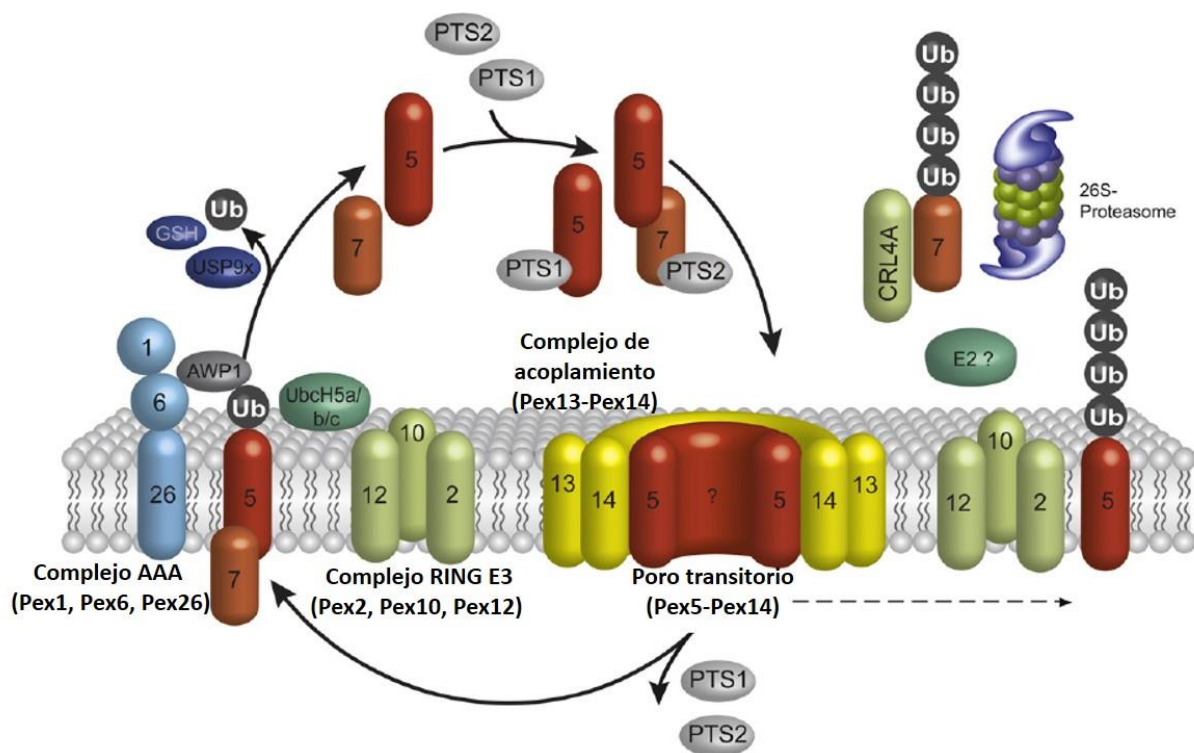


Fig.1 | Importación de proteínas de matriz peroxisomal de mamíferos. Las proteínas PTS1 son reconocidas en el citosol por el receptor Pex5, mientras que las PTS2 se reconocen por receptor Pex7 y el correceptor Pex5. El complejo receptor-carga PTS se une al complejo de acoplamiento (Pex13-Pex4) en la membrana peroxisomal. Se forma un poro transitorio (Pex5-Pex14) que permite la translocación de la proteína PTS a la matriz. El receptor Pex5 se mono-ubiquitina por el complejo RING de ligasas de ubiquitina E3 (Pex2, Pex10, Pex12) y enzimas de conjugación de ubiquitina E2 UbcH5a/b/c. Como un mecanismo de control de calidad, los receptores también se puede poli-ubiquitinar para degradarse por el proteasoma. El receptor mono-ubiquitinado es liberado de la membrana por el complejo AAA (Pex1, Pex6, Pex26) a través del reconocimiento por Awp1. En el citosol, se des-ubiquitina no-enzimáticamente por glutatión o por hidroxilasas de ubiquitina (ej. Usp9x) para iniciar otro ciclo de importación (Modificado de Platta *et al.*, 2016).

Inicialmente, la secuencia PTS1 se definió por los aminoácidos serina, lisina, leucina (SKL). Con el análisis de un mayor número de proteínas se ha observado que la señal PTS1 es universal en los eucariontes, pero la secuencia es específica de cada especie, permitiendo la definición del tripéptido consenso constituido por: residuo pequeño no cargado en la primera posición (serina/alanina/cisteína), seguido de un residuo cargado

positivamente (lisina/arginina/histidina) y un residuo leucina (L). Debido a que la secuencia PTS1 se localiza en el extremo C-terminal, las proteínas de la matriz pueden ser sintetizadas, obtener su conformación, unirse a sus grupos prostéticos y, para aquellas que se encuentran en un estado oligomérico, ensamblarse en oligómeros en el citosol antes de ser reconocidas por Pex5 e importarse hacia la matriz. Este proceso de importación en estado nativo podría constituir un mecanismo de control de calidad que permite el transporte de proteínas maduras y enzimáticamente activas, a la vez que evita mecanismos adicionales de transferencia de cofactores o componentes de ensamblaje dentro del peroxisoma (Brocard & Harting, 2006). Como es de esperarse, las proteínas que son monómeros en su estado nativo pueden importarse como monómeros. Sin embargo, las proteínas homo-oligoméricas (ej. catalasa) pueden transportarse en su conformación cuaternaria (modelo de importación oligomérico), aunque también podrían hacerlo como monómeros y posteriormente ensamblarse completamente dentro del peroxisoma (modelo de importación monomérico) (Dias *et al.*, 2016). No hay un consenso del tipo de importación predominante para proteínas con estructura cuaternaria.

La peroxina Pex5 es un receptor soluble que reconoce a su proteína cargo PTS1 en el citosol. El complejo Pex5-proteína cargo se une al complejo de acoplamiento (compuesto por las proteínas Pex14, Pex13) en la membrana peroxisomal. Por un mecanismo altamente complejo que involucra la inserción de Pex5 en la membrana, se lleva a cabo la formación de un poro transitorio de translocación, constituido principalmente por Pex5 y Pex14, que es altamente dinámico y permite la importación de proteínas en conformación terciaria y en estado oligomérico. Una vez que la proteína PTS1 se transloca hacia la matriz, el poro se desensambla debido a que el receptor regresa al citosol para empezar otro ciclo de importación (Emmanouilidis *et al.*, 2016; Rucktäschel *et al.*, 2011).

La exportación de Pex5 involucra la mono-ubiquitinación en un residuo de cisteína (Cys11) altamente conservado que dirige el reciclaje. El receptor también se puede poli-ubiquitinar en residuos de lisina para promover su degradación por el proteasoma (Platta *et al.*, 2014; 2016). El complejo RING de ligasas de ubiquitina E3 (constituido por las proteínas Pex2, Pex10, Pex12) y enzimas de conjugación de ubiquitina E2 (UbcH5a/b/c) llevan a cabo la mono-ubiquitinación. Esta modificación es reconocida por la proteína Awp1, que actúa como un adaptador entre Pex5-Ub y el complejo de ATPasa tipo AAA (compuesto por Pex1, Pex6, Pex26). La liberación de los receptores mono-ubiquitinados es la principal función del complejo AAA. Finalmente, la ubiquitina es removida por diferentes hidrolasas de ubiquitina y el receptor Pex5 puede someterse a otro ciclo de importación (Platta *et al.*, 2014; 2016).

La regulación de la importación peroxisomal está bajo el control del estado oxidativo celular y el principal componente sensible a redox es el receptor Pex5 (Platta *et al.*, 2016). El estado de oxidación del residuo

conservado Cys11 controla la actividad del receptor en respuesta a cambios en el estado redox del citosol en fibroblastos humanos (primarios e inmortalizados) (Apanasets *et al.*, 2014). Bajo condiciones oxidantes, el residuo Cys11 no se puede mono-ubiquitinar y el receptor Pex5 es retenido en la maquinaria de translocación. Interesantemente, Pex5 se acumula sobre la membrana peroxisomal de fibroblastos humanos senescentes, los cuales presentan estrés oxidativo (Legakis *et al.*, 2002). El control que ejerce el estrés oxidativo sobre la importación peroxisomal tiene gran importancia en determinar la localización de la principal enzima antioxidante peroxisomal, la catalasa (Walton *et al.*, 2017).

4. Catalasa

Las catalasas, o hidroperoxidasas, son enzimas que degradan peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno. Estas enzimas se agrupan con base en su estructura, secuencia y mecanismo de catálisis en tres grandes clases evolutivas. La primera clase son las catalasas mono-funcionales que contienen un grupo hemo b (protoporfirina IX) y NADPH, forman tetrámeros enzimáticamente activos y son la clase más ampliamente distribuida en eucariontes y procariontes. En este grupo se encuentran las catalasas de mamíferos. Además, tienen dos mecanismos de degradación de H₂O₂: catalítica y peroxidativa, aunque el primero es el fisiológicamente importante. La segunda clase son catalasas-peroxidasas que contienen un grupo hemo b y degradan H₂O₂ a través de los dos mecanismos mencionados, pero llevan a cabo principalmente la actividad peroxidativa en la que substratos orgánicos son los aceptores de electrones. Las enzimas de esta clase se encuentran en procariontes y en eucariontes, principalmente en hongos. La tercera clase son las catalasas que contienen manganeso en su sitio activo y se encuentran solamente en bacterias (Chelinaki *et al.*, 2004; Zamocky & Koller, 1999).

Los mamíferos poseen solamente un gen de catalasa mono-funcional (*Cat*), el cual está compuesto de 12 intrones y 13 exones. En humanos el gen *CAT* se localiza en el cromosoma 11 y codifica para un polipéptido de 526 aminoácidos y peso molecular de 60 kDa (Quan *et al.*, 1986; Glorieux & Calderon, 2017). Su promotor no cuenta con el elemento caja TATA que dirija la transcripción, sino que contiene tres cajas GC y tres cajas CCAAT, que caracterizan a promotores de proteínas peroxisomales (Quan *et al.*, 1986; Nakashima *et al.*, 1989). Este tipo de promotor identifica a los genes que son expresados constitutivamente.

La catalasa humana es un homo-tetrámero que pertenece al grupo de catalasa mono-funcionales (1.11.1.6). Cada subunidad (60 kDa) posee como cofactor y grupo prostético una molécula de NADPH y un grupo hemo b, respectivamente. El polipéptido contiene cuatro dominios: brazo N-terminal, barril-β, asa de conexión y dominio hélice (Fig. 2). El brazo N-terminal de una subunidad se asocia con el asa de conexión de otra subunidad para permitir la formación de un dímero. El dominio barril-β, constituido de ocho hojas β antiparalelas (β1-8), forma el núcleo hidrofóbico de la enzima y el canal a través del cual el sustrato entra al hemo catalítico y también

permite la unión entre subunidades en el homo-tetrámero. El sitio de unión al grupo hemo es formado por residuos de los dominios barril- β , asa de conexión y brazo N-terminal, lo que produce que el hemo se encuentra completamente inmerso en la proteína. El dominio hélice está compuesta de ocho hélices α , el cual junto con el dominio β -barril, participa en la unión de NADPH (Putman *et al.*, 2000; Glorieux & Calderon, 2017).

El tetrámero se ensambla a través de complejas interacciones que no son compatibles con un modelo que postula que las cuatro subunidades interactúan en un estado conformacional pre-doblado. Además, la unión de los cofactores complica el proceso de ensamblaje. El proceso de ensamblaje más probable sigue la vía: holo-monómeros, holo-dímeros y holo-tetrámeros (Zamocky & Koller, 1999). La conformación en la que se importa la catalasa a su localización subcelular, el peroxisoma, es aún materia de debate, como se verá más adelante.

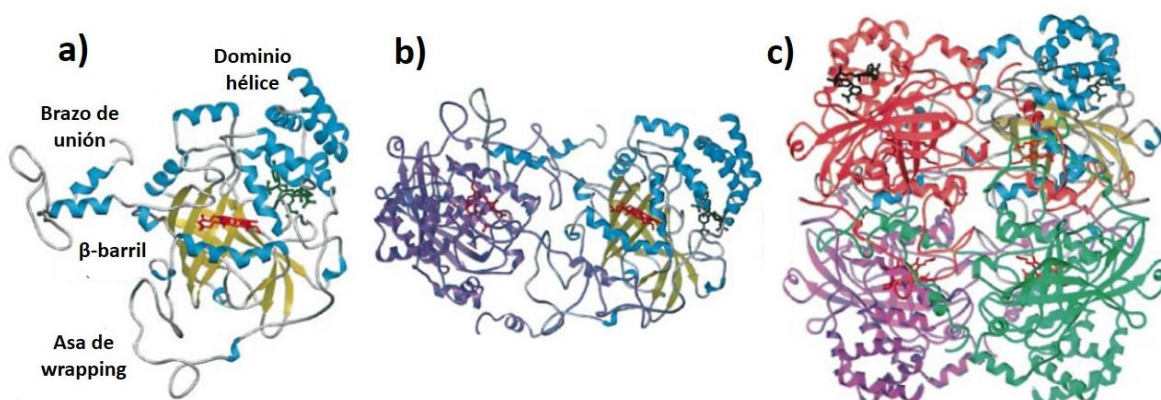


Fig. 2 | Estructura de catalasa humana. a) subunidad de catalasa humana donde se observan los cuatro dominios: brazo N-terminal, β -barril, asa de conexión y dominio hélice. El hemo del sitio activo (rojo) se encuentra rodeado por los dominios barril- β (amarillo), α -hélices (azul) y asas, y queda inmerso al interior del tetrámero. El NADPH se observa en verde. b) dímero con una subunidad en morado y en azul. c) tetrámero donde se observa la protección del sitio activo dentro de la proteína, por lo que se sugiere que la formación de tetrámero es esencial para su función (Modificado de Putman *et al.*, 2000).

La actividad catalítica es un mecanismo de dos etapas de la conversión de dos moléculas de H_2O_2 en dos moléculas de H_2O y una de O_2 (Fig. 3). En la primera etapa, una molécula de H_2O_2 oxida el hierro hemo (Porfirina- Fe^{III}) de la proteína en el estado basal (Ferri-catalasa). En el proceso de oxidación, dos equivalentes de oxidación son removidos, uno de Fe^{III} y otro del anillo de porfirina, por lo que se forma un intermediario constituido por un grupo oxiferril ($Fe^{IV}=O$) y un radical catión porfirina (Porfirina \bullet^+), llamado Compuesto I (CpdI). En esta etapa se libera una molécula de H_2O . En la siguiente etapa, una segunda molécula de H_2O_2 reacciona con Cpd I, se libera H_2O y O_2 y el grupo hemo regresa a su estado de oxidación (Porfirina- Fe^{III}). Alternativamente, el CpdI puede reaccionar con donadores de electrones y reducirse para formar un intermediario llamado Compuesto II (CpdII), que carece del radical catión porfirina pero conserva el grupo oxiferril (Porfirina- $Fe^{IV}=O$). Este intermediario puede reaccionar con otro donador de electrones y regresar al estado basal (Porfirina- Fe^{III}). El NADPH previene la formación del CpdII, al reducir el CpdI a su estado Porfirina- Fe^{III} que se produce en bajas concentraciones de

peróxido (Putman *et al.*, 2000). Las catalasas también pueden actuar como peroxidasas al tener actividad peroxidativa. Sin embargo, la importancia de esta función durante los procesos fisiológicos parece ser menor (Goyal & Basak, 2012).

En lo que respecta a su localización sub-celular, la catalasa se localiza en el peroxisoma, aunque bajo ciertas condiciones (e. j. estrés oxidativo, senescencia) se localiza en citosol (Legakis *et al.*, 2002; Walton *et al.*, 2017; Dubreuil *et al.*, 2020). Los tejidos que presentan la mayor actividad de catalasa son el hígado y, en menor medida, el riñón y el cerebro (Sani *et al.*, 2006).

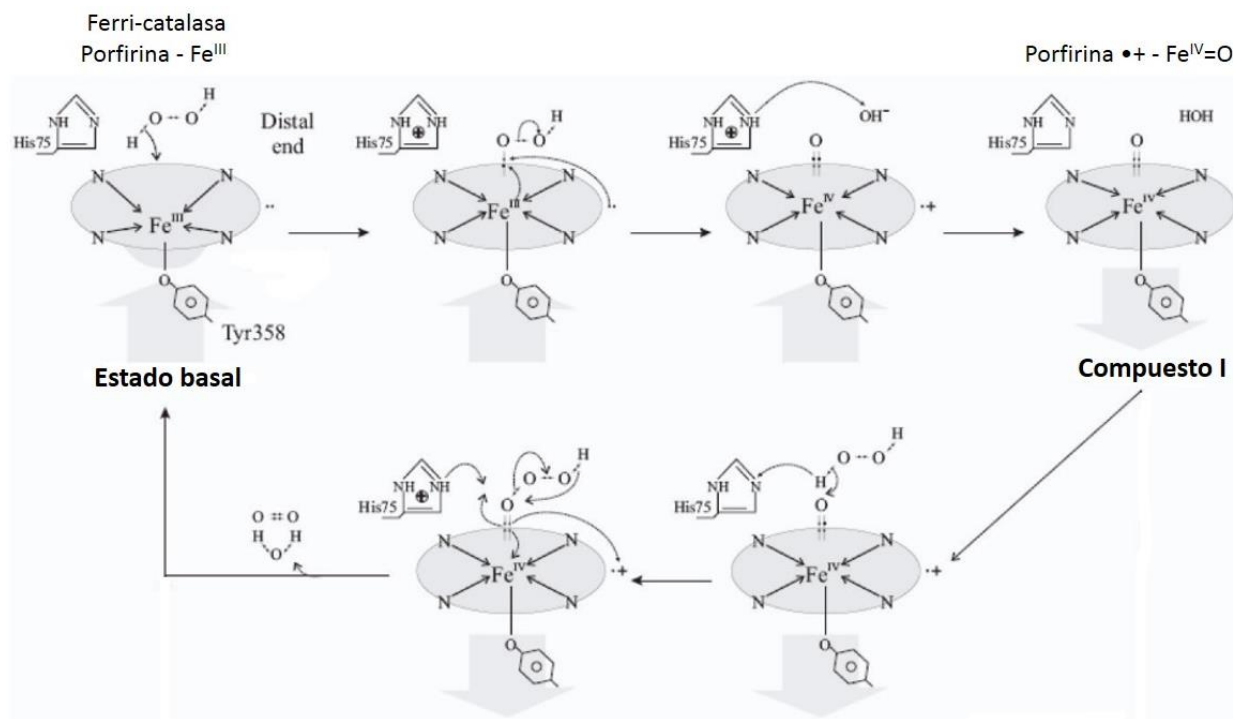


Fig. 3 | Mecanismo de degradación catalítica de H₂O₂ de la catalasa. El enzima en estado basal, Ferri-catalasa, tiene una porfirina con Fe^{III}. En la primera etapa, una molécula de H₂O₂ oxida el hierro del grupo hemo, se libera H₂O y se produce un intermediario llamado Compuesto I (Fe^{IV}=O - Porfirina •+). Otra molécula de peróxido ataca el CpdI, el cual vuelve al estado basal, se libera agua y O₂ (Modificado de Goyal & Basak, 2012).

4.1 Importación peroxisomal de la catalasa.

La catalasa humana, así como la de otros mamíferos como el ratón, tiene una señal de importación peroxisomal PTS1 no canónica constituida por el tetra-péptido Lisina-Alanina-Asparagina-Leucina (KANL) y es reconocida por el receptor Pex5 (Purdue & Lazarow, 1996). Esta secuencia, que difiere de la secuencia PTS1 SKL, provoca que la catalasa tenga menor eficiencia de reconocimiento por Pex5, lo que se traduce en una menor eficiencia de importación hacia la matriz peroxisomal (Koepke *et al.*, 2007; Maynard *et al.*, 2004). Se cree que, por tener menor afinidad por el receptor y menor importación hacia el peroxisoma, la secuencia KANL de la catalasa es importante para regular el estado de conformación en el que se transloca la enzima y para distribuir la actividad antioxidante

entre el citosol y el peroxisoma bajo diferentes condiciones, principalmente en estrés oxidativo (Apanasets *et al.*, 2014).

Al localizarse la secuencia PTS1 en el extremo carboxilo terminal, se tiene la hipótesis de que su localización es un mecanismo que se ha seleccionado para facilitar la importación de las proteínas peroxisomales en su conformación nativa (Brocard & Harting, 2006). No obstante, hay evidencia, aún no definitiva, de que la catalasa se puede translocar en dos estados: monómero (Freitas *et al.*, 2011) y tetrámero (Otera & Fujii, 2012). Debido a que la catalasa adquiere una estructura cuaternaria compleja con varios grupos prostéticos y cofactores, la cual se adquiere secuencialmente por una vía altamente compleja (apomonómeros + hemo → holo-monómeros → dímeros → homotetrámero; Zamocky & Koller, 1999), se cree que la secuencia KANL disminuye su eficiencia de importación para permitir que los monómeros adquieran su conformación nativa y se oligomericen en el citosol. Esto se respalda por la evidencia de que la catalasa es reconocida por Pex5 en su conformación cuaternaria y, por lo tanto, se importa al peroxisoma como un tetrámero completamente funcional (Otera & Fujii, 2012). En contraste a lo anterior, otra evidencia ha demostrado que Pex5 se une con mayor afinidad a la subunidad monomérica que al oligómero tetramérico (Freitas *et al.*, 2011). De hecho, se ha demostrado que la unión del receptor bloquea la formación de la estructura cuaternaria. Esto se respalda por el hecho de que Pex5 actúa como una chaperona que se une a monómeros para evitar interacciones no específicas o prematuras en el citosol (Dias *et al.*, 2016). Así, el reconocimiento y unión de Pex5 y la oligomerización de la catalasa son eventos mutuamente excluyentes (Freitas *et al.*, 2011). Estas dos hipótesis de importación, como monómero y como tetrámero, de la catalasa podrían no ser excluyentes entre sí, sino que podría ser que la translocación de catalasa monomérica sea biológicamente relevante en condiciones celulares normales y sin ningún tipo de estrés, pero bajo condiciones en las que la concentración de Pex5 disminuya (ej. al asociarse a la membrana peroxisomal en condiciones de estrés oxidativo), la vía de translocación del tetrámero es necesaria para mantener su localización peroxisomal. Además, la importación de monómeros y tetrámeros podría llevarse a cabo simultáneamente por dos mecanismos diferentes que dependen de Pex5.

Como se ha señalado, la importación peroxisomal puede ser regulada bajo diferentes condiciones, siendo el estrés oxidativo el principal regulador. En condiciones oxidantes, la translocación peroxisomal de proteínas PTS1 SKL disminuye de manera general, pero la distribución de la catalasa es aún más afectada, localizándose principalmente en el citosol. Esto se debe a que Pex5 se retiene en la membrana peroxisomal al evitarse la ubiquitinación de la Cys11, una modificación necesaria para su liberación (Apanasets *et al.*, 2014). La enzima es enzimáticamente activa en el citosol y protege contra la oxidación inducida por un tratamiento con H₂O₂ (Dubreuil *et al.*, 2020; Walton *et al.*, 2017). Otro estudio ha demostrado cómo se produce esta regulación de la

importación de la catalasa en condiciones de estrés oxidativo. Se ha encontrado que en células Fao de hepatoma de rata, la fosforilación de Pex14 disminuye selectivamente la importación peroxisomal de la catalasa a la vez que mantiene intacto el importe de proteínas PTS1. La modificación post-traducciona de Pex14 afecta la unión de Pex13 y Pex5, por lo que se propone que afecta la formación del poro transitorio de importación. La fosforilación de Pex14 es inducida por estrés oxidativo y parece ser mediada por la vía ERK (Okumoto *et al.*, 2020). Por lo tanto, la importación regulada de la catalasa y la regulación redox de Pex5 y Pex14 constituyen un mecanismo protector, conservado evolutivamente en organismos que solo tienen una forma de catalasa, para disminuir el estrés oxidativo celular al retener la catalasa en el citosol (Walton *et al.*, 2017).

4.2 Alteraciones metabólicas relacionadas a la deficiencia de catalasa

La acatalasemia es una rara enfermedad genética en la que la actividad de la catalasa disminuye o es nula de manera diferencial en los tejidos. A pesar de la importante función de la catalasa, los humanos con acatalasemia solo presentan manifestaciones clínicas durante la infancia, llamada enfermedad de Takahara, que se caracteriza por gangrena, ulceraciones y atrofia en la cavidad bucal; el 15% de los individuos con acatalasemia no manifiestan la enfermedad (Takahara *et al.*, 1960). La acatalasemia es una condición homocigota causada por mutaciones que alteran la estructura de la enzima o el proceso de *splicing* del pre-mRNA que disminuyen la actividad enzimática o favorecen la degradación de su mRNA, respectivamente (Crawford *et al.*, 1988; Wen *et al.*, 1990). Los individuos que son heterocigotos para el gen mutado, condición llamada hipocatalasemia, tienen reducida a la mitad la actividad enzimática respecto a los individuos normales (Takahara *et al.*, 1960).

Se han desarrollado modelos de ratón que tienen disminuida la actividad enzimática o eliminado su gen (*Cat*) y se han utilizado como modelos para estudiar el estrés oxidativo. En ratones con hipocatalasemia el fenotipo se manifiesta como una disminución en la actividad en diferentes tejidos, poseyendo desde el 1% en eritrocitos al 80% de la actividad normal en hígado. El análisis molecular de los ratones demostró que la hipocatalasemia se produce por mutaciones que probablemente disminuyen la estabilidad y estructura tridimensional de la catalasa (Shaffer & Preston, 1990). En un modelo murino que tiene eliminado el gen de la catalasa (*Cat*^{-/-}), los ratones se desarrollan normalmente y no presentan alteraciones fenotípicas evidentes durante los primeros meses de vida (Ho *et al.*, 2004; Pérez-Estrada *et al.*, 2019). No obstante, tienen alteraciones metabólicas que se manifiestan diferencialmente en los tejidos (principalmente en el hígado) a lo largo del envejecimiento (Pérez-Estrada *et al.*, 2019) y al someterse a regímenes de alimentación (e. j. ayuno y dieta alta en grasa) (Heit *et al.*, 2017; Pérez-Estrada *et al.*, 2019; Piao *et al.*, 2017). Se ha sugerido que el metabolismo sistémico alterado no se debe a un aumento en el estrés oxidativo debido a la pérdida de esta importante enzima antioxidante, sino que se origina por la alteración del metabolismo peroxisomal de lípidos provocada por la deficiencia de catalasa en el peroxisoma. Esto ha permitido formular la hipótesis que la catalasa peroxisomal

contribuye a controlar el metabolismo de lípidos al influir en los niveles de H_2O_2 y la señalización de ROS en la matriz del peroxisoma (Pérez-Estrada *et al.*, 2019). Esta formulación explicaría, en parte, que la catalasa presenta una señal PTS1 no canónica para permitir su localización y función en diferentes compartimentos celulares: en el citosol para controlar el estrés oxidativo, en el peroxisoma para controlar el metabolismo de lípidos.

La evidencia que contribuye a sustentar la hipótesis de que la catalasa peroxisomal regula el metabolismo de lípidos al controlar el estado redox del peroxisoma proviene de estudios donde la catalasa no se localiza en el peroxisoma (Burdette *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1997). Fibroblastos derivados de pacientes que comparten características clínicas con el síndrome de adrenoleucodistrofia y el síndrome de Zellweger, pero que difieren en algunos aspectos, presentan la catalasa silvestre (KANL) en el citosol (Singh *et al.*, 1997). Aunque las células presentan peroxisomas con morfología normal y la translocación de proteínas de matriz peroxisomal no es alterada (proteínas PTS1 y PTS2), los peroxisomas deficientes de la catalasa presentan alteraciones en el metabolismo de lípidos: β -oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga, α -oxidación de ácido fitánico y biosíntesis de plasmalógenos (Sheikh *et al.*, 1998). Cuando estas células con catalasa citosólica se complementan con la enzima modificada que permite su importación a la matriz peroxisomal (catalasa con la secuencia PTS1 SKL o la señal PTS2), las funciones metabólicas del peroxisoma se restauran (Sheikh *et al.*, 1998).

Antecedentes

El metabolismo de lípidos y la homeostasis redox peroxisomal en la senescencia celular.

Se ha propuesto que alteraciones en la homeostasis redox peroxisomal y el metabolismo peroxisomal podrían regular la senescencia de células humanas. Además, la evidencia señala que el principal componente regulador es la enzima antioxidante catalasa. Los estudios que sustentan esta hipótesis provienen de células humanas senescentes, células hipocatalasémicas y en ensayos que inhiben químicamente la actividad de la catalasa (Giordano & Terlecky, 2012; Tirotenko & Terlecky, 2011).

Los fibroblastos humanos senescentes presentan un aumento en el número y tamaño de peroxisomas, mayor oxidación de proteínas de la matriz peroxisomal y disminución de la eficiencia de importación de proteínas PTS1; a estas observaciones en conjunto se les denominó “senescencia peroxisomal” (Legakis *et al.*, 2002). Si bien las proteínas con señal PTS1 canónica disminuyen su importación en el envejecimiento, la translocación de la catalasa disminuye más severamente (Legakis *et al.*, 2002; Koepke *et al.*, 2008). Debido a que las células humanas senescentes tienen niveles altos de ROS y estrés oxidativo general (ej. en citosol, peroxisoma y mitocondria; Legakis *et al.*, 2002; Ivashchenko *et al.*, 2011) y a que el receptor Pex5 es regulado por el estrés oxidativo del citosol (Apanasets *et al.*, 2014), la catalasa tiene un efecto antioxidante importante para contrarrestar el daño oxidativo en el citosol (Walton *et al.*, 2017).

Al alterarse el balance entre la generación y degradación de ROS en células humanas deficientes de catalasa, se esperaría que fueran propensas a desarrollar un fenotipo senescente inducido por estrés oxidativo. Sin embargo, los fibroblastos humanos hipocatalasémicos (que presentan entre 2-30% de actividad enzimática respecto a los silvestres) no presentan alteraciones en la tasa de crecimiento celular bajo condiciones normales respecto a fibroblastos silvestres (Lewis, 1985; Sadamoto, 1966). No obstante, las células mutantes disminuyen su sobrevivencia y la tasa de crecimiento al someterlas a un tratamiento exógeno de H₂O₂ (Lewis, 1985; Sadamoto, 1966). Esto sugiere que la actividad residual de la catalasa tiene un papel importante en disminuir los niveles fisiológicos H₂O₂ peroxisomales bajo condiciones normales, pero al producirse estrés oxidativo la deficiencia de catalasa no puede contrarrestar el aumento de H₂O₂, lo que conduce a alteraciones en su capacidad proliferativa. En un estudio más reciente (Wood *et al.*, 2006), los fibroblastos provenientes de un paciente hipocatalasémico que tienen actividad residual de catalasa (25% de actividad enzimática respecto a células normales) presentan senescencia peroxisomal, altos niveles de H₂O₂, daño oxidativo en proteínas y DNA, así metabolismo peroxisomal disminuido respecto a las células silvestres. También presentan menor tasa de crecimiento, pero no tienen un aumento en los niveles de β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-gal), por lo que senescen de manera similar a células silvestres (Wood *et al.*, 2006).

En fibroblastos humanos, al inhibir químicamente la actividad enzimática (disminución de 60% de la actividad normal) de la catalasa con 3-amino-triazol (3-AT), un inhibidor irreversible que se une covalentemente al centro activo de la enzima, se produce un aumento en el peróxido de hidrógeno y de ROS en general, lo que se asocia con un aumento en la carbonilación de proteínas (Koepke *et al.*, 2008). Cuando a estas células de pocas divisiones celulares se les inhibe la actividad de catalasa, no hay efecto sobre el crecimiento. Sin embargo, al tratar células de mayores duplicaciones celulares con el inhibidor 3-AT disminuye drásticamente el crecimiento celular y provoca un aumento dramático en el número de peroxisomas, los cuales tienen menor capacidad de importación y daño oxidativo en las proteínas de matriz. Además, la inhibición con 3-AT produce mayor daño al DNA y secreción la metaloproteína MMP2, un componente del fenotipo secretorio asociado a senescencia (Koepke *et al.*, 2008). La disminución en la actividad antioxidante peroxisomal también alteró la función mitocondrial, manifestándose en la despolarización de membrana, acumulación de daño oxidativo y disminución de actividades enzimáticas (Koepke *et al.*, 2008; Walton & Pizzitelli, 2012).

Otro método para alterar el balance entre la degradación y producción de ROS en el peroxisoma sin alterar la actividad antioxidante de la catalasa ha sido aumentar artificialmente la producción de ROS peroxisomal. Como se ha señalado anteriormente, la producción de estrés oxidativo en el peroxisoma por la proteína rojo fluorescente KillerRed (KR-PTS1) induce una vía de muerte celular dependiente del estado redox mitocondrial (Ivashchenko *et al.*, 2010). Esto ha revelado que el estado redox del peroxisoma regula la homeostasis redox celular a través de un mecanismo que involucra la homeostasis redox mitocondrial. Si este control redox influye en la senescencia celular no es conocido.

Estos estudios y otros realizados en levaduras han permitido proponer un modelo por el cual los procesos peroxisomales regulan la senescencia celular en células de mamíferos y la esperanza de vida cronológica y replicativa de levaduras. Las células de mamíferos de pocas divisiones celulares y las levaduras de edades tempranas importan eficientemente la catalasa, lo que permite a las células minimizar el daño oxidativo y mantener los niveles adecuados de ROS para la señalización redox. Además, esto favorece la importación adecuada de proteínas peroxisomales involucradas en reacciones metabólicas, por lo que el metabolismo no se afecta. El metabolismo y la homeostasis redox peroxisomales permiten la comunicación adecuada con la mitocondria. Conforme las células senescen o las levaduras envejecen, la importación de proteínas peroxisomales se altera, disminuye drásticamente la translocación de la catalasa y otras proteínas involucradas en el metabolismo (ej. transportadores y enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga) ocasionando un aumento de ROS y alteraciones metabólicas (ej. disminución de la β -oxidación peroxisomal, disminución de transporte de metabolitos fuera del peroxisoma y hacia la mitocondria) que

contribuyen a reforzar el estado senescente en células de mamíferos y el envejecimiento celular cronológico y replicativo en levaduras. Estas alteraciones peroxisomales también repercuten la comunicación con la mitocondria alterando su homeostasis (Terlecky *et al.*, 2006; Titorenko & Terlecky, 2011). No obstante, hay demasiadas interrogantes como: ¿cuáles son las señales que inducen la disminución de la importación peroxisomal?, ¿cómo se mantiene la comunicación entre el peroxisoma y la mitocondria?, ¿cómo se traducen las alteraciones mitocondriales y peroxisomales en señales que inducen un programa senescente? Si la senescencia inducida por alteraciones peroxisomales ocurre, cabe preguntarse si este programa senescente se produce *in vivo* y qué tipo celular senesce por este programa senescente.

Regulación de la senescencia celular por la catalasa peroxisomal o citosólica

Como la pérdida de catalasa produce alteraciones en la capacidad proliferativa y parece inducir un fenotipo senescente, se esperaría que al restaurar su actividad antioxidante estas alteraciones se contrarresten. Debido a su localización citosólica y peroxisomal, hay información contradictoria respecto a cuál localización sub-celular tiene efecto sobre la senescencia celular.

Hay evidencia que apunta que la catalasa silvestre (Cat-KANL) y la isoforma artificial peroxisomal (Cat^P-SKL) reducen el estrés oxidativo en células humanas hipocatalasémicas. Al tener mayor reconocimiento por el receptor Pex5 y por lo tanto mayor eficiencia de importación (Koepke *et al.*, 2007), la sobre-expresión de la Cat^P-SKL disminuye más drásticamente las concentraciones de ROS intracelular que al sobreexpresar la catalasa silvestre Cat-KANL silvestre en células hipocatalasémicas. Aunque en este estudio no se analizaron los cambios producidos en la capacidad proliferativa (Wood *et al.*, 2006). En otro estudio, la sobre-expresión independiente de las isoformas silvestre Cat-KANL y peroxisomal Cat^P-SKL en fibroblastos humanos cerca de su límite de duplicaciones celulares bajó los niveles de ROS y el número de células positivas para SA-β-gal, pero el efecto protector de la Cat^P-SKL fue mayor que la enzima silvestre Cat-KANL. Esto sugiere que la catalasa peroxisomal tiene efectos más importantes en la capacidad proliferativa y la senescencia celular que la enzima en el citosol. Cabe señalar que la sobreexpresión de Cat^P-SKL restauró la importación peroxisomal de catalasa endógena. Otro cambio importante que produjo la Cat^P-SKL fue la restauración del potencial de membrana mitocondrial, que en células senescentes se despolariza (Koepke *et al.*, 2007), lo que señala aún más la influencia del estado redox peroxisomal en la homeostasis mitocondrial en células senescentes. Por lo tanto, esto indica que la catalasa, al disminuir el estrés oxidativo en el peroxisoma y citosol, contrarresta la senescencia en células humanas.

En contraste con lo anterior, se ha demostrado que la catalasa peroxisomal (Cat^P-SKL) no tiene un efecto protector contra el daño oxidativo. La sobre-expresión de la catalasa sin secuencia PTS1 (Cat^C-ΔKANL), que se localiza en el citosol, protege contra muerte celular inducida por un tratamiento con H₂O₂ exógeno en células

HeLa, pero la Cat^P-SKL no lo hace (Dubreuil *et al.*, 2020). Esta isoforma peroxisomal Cat^P-SKL tampoco protege contra estrés oxidativo inducido por exposición a H₂O₂ en fibroblastos embrionarios de ratón transformados, pero la isoforma citosólica sí lo hace (Walton *et al.*, 2017).

Así, estos resultados contradictorios sugieren dos escenarios: 1) la catalasa citosólica podría evitar la senescencia celular a través de un mecanismo antioxidante que disminuye el estrés oxidativo en el citosol, lo cual concuerda con la regulación redox de la importación de la catalasa (Apanasets *et al.*, 2014; Dubreuil *et al.*, 2020; Walton *et al.*, 2017; Okumoto *et al.*, 2020); 2) la catalasa peroxisomal evita la senescencia celular (Koepke *et al.*, 2007) al actuar en un mecanismo alternativo independiente del daño oxidativo, pero que es posible especular que el mecanismo podría involucrar el metabolismo peroxisomal (Sheikh *et al.*, 1998) o evitar la despolarización de la mitocondria (Koepke *et al.*, 2007).

Las células de ratón como un modelo para estudiar el papel del peroxisoma en la senescencia celular. El peroxisoma parece contribuir a la senescencia celular a través de mecanismos que involucran la homeostasis redox. Sin embargo, los estudios mencionados anteriormente se centran en el uso de células humanas, las cuales son menos sensibles a estrés oxidativo en general (Parrinello *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2013), por lo que este mecanismo de control redox podría confundirse con aquellos mecanismos que se activan por el acortamiento de telómeros, que es un inductor importante de la senescencia replicativa en células humanas.

El modelo murino parece ser mejor modelo experimental para estudiar este mecanismo porque el estrés oxidativo es el principal inductor de senescencia en células de ratón (Parrinello *et al.*, 2003). Los fibroblastos embrionarios de ratón (inmortalizados con antígeno largo T del virus SV40 para facilitar la medición con el sensor redox roGFP2 descrito anteriormente) mutantes para catalasa (Cat^{-/-}) tienen un estado oxidativo mitocondrial más oxidado, pero mantienen inalterado su estado oxidativo peroxisomal y citosólico (Ivashchenko *et al.*, 2010). Además, la deficiencia de catalasa aumenta significativamente los niveles generales de H₂O₂ en MEF Cat^{-/-} (Shin *et al.*, 2020). A pesar del potencial de los MEF para dilucidar cómo la ausencia de catalasa regula la homeostasis redox del peroxisoma y, por lo tanto, como este organelo contribuye a mantener el estado redox celular, no se han realizado estudios para entender estos mecanismos. Finalmente, además de lo reportado por Koepke *et al.* (2007), no hay más estudios para comprender detalladamente cómo el adecuado funcionamiento del peroxisoma, en general, y la sobre-expresión de catalasa, en particular, evitan la senescencia celular en células de mamífero.

La regulación redox de la importación de matriz peroxisomal por Pex5 y la baja eficiencia de reconocimiento y traslocación de la señal PTS1 no canónica (KANL) provocan que la catalasa silvestre se localice en el peroxisoma y el citosol. Debido a lo anterior, la sobre-expresión de la enzima silvestre Cat-KANL no

permitiría discernir cuál compartimiento celular, el peroxisoma o el citosol, tiene un papel en la regulación de la senescencia celular. Se ha observado que la catalasa sin la secuencia PTS1 (Cat^c-ΔKANL) forma homo-tetrámeros, se localiza en el citosol y puede proteger a las células frente a estrés oxidativo (Dubreuil *et al.*, 2020; Hernández-García *et al.*, 2008; Otera & Fujiki, 2011; Walton *et al.*, 2017). Esta isoforma citosólica Cat^c-ΔKANL podría ser utilizada para demostrar que la actividad antioxidante en el citosol disminuye la aparición del fenotipo senescente inducido por estrés oxidativo en fibroblastos de ratón deficientes en catalasa. Por otra parte, la isoforma artificial Cat^p-SKL, al tener la señal PTS1 con mayor afinidad al receptor Pex5 y translocación hacia la matriz peroxisomal (Koepke *et al.*, 2007), permitiría estudiar el mecanismo por el cual la homeostasis redox del peroxisoma regula la senescencia. La evidencia indica que este mecanismo depende del metabolismo adecuado de lípidos en el peroxisoma, el cual es afectado por la homeostasis de H₂O₂ y la catalasa en la matriz peroxisomal.

Por último, el campo de la senescencia necesita nuevos modelos animales que sean útiles para estudiar poblaciones senescentes no caracterizadas (Gasek *et al.*, 2021). Si existe un programa senescente inducido por alteraciones peroxisomales *in vitro* lo interesante sería conocer su existencia en los tejidos. La determinación de la función génica requiere al menos dos análisis complementarios: pérdida y ganancia de función. Para estudiar la pérdida de función, la primera aproximación sería identificar si existe un aumento en el número de células senescentes en los tejidos del ratón carente de catalasa Cat^{-/-}. A este respecto, sólo se ha analizado el número de células positivas para la β-galactosidasa asociada a senescencia y los marcadores en p21^{WIP/CIP1} y p16^{INK4A} en el hígado (Pérez-Estrada *et al.*, 2019), aunque no se ha encontrado un aumento de células senescentes en los ratones mutantes Cat^{-/-} que en los silvestres. Sin embargo, no se han analizado otros tejidos en los que el peroxisoma es un centro metabólico importante (ej. intestino, cerebro y tejido adiposo) y que por lo tanto alteraciones en su funcionamiento podrían ocasionar un fenotipo senescente *in vivo*. Además, también sería interesante analizar los cambios en el número de células senescentes bajo condiciones que inducen su acumulación (ej. dieta alta en grasas).

Por otra parte, para la ganancia de la función génica, el principal enfoque es la sobre-expresión de transgenes en modelos de ratón modificados genéticamente en un patrón espacial y temporal. Tradicionalmente la estrategia para generar modelos transgénicos consiste en implantar células troncales embrionarias (ESC, del inglés *embryonic stem cell*) modificadas genéticamente en embriones en etapa de pre-implantación (E3.5) y la transferencia a ratonas pseudopreñadas para su desarrollo. Los ratones quiméricos desarrollados poseen células derivadas de ESC modificadas y del embrión huésped (Heyer *et al.*, 2010). Para establecer el modelo genéticamente modificado se realizan cruza genéticas y expansión de la colonia de ratones (Kumar *et al.*, 2009). Se podrían crear ratones transgénicos que sobre-expresen las isoformas de catalasa en el fondo Cat^{-/-} para tener

un nuevo modelo para evaluar cómo la expresión de catalasa exclusivamente citosólica (Cat^c-ΔKANL) o peroxisomal Cat^p-SKL afecta la acumulación de células senescentes en los tejidos a lo largo del envejecimiento o en condiciones estresantes.

Hipótesis

La disminución de los niveles de H_2O_2 por la catalasa promueven la proliferación celular de fibroblastos embrionarios de ratón.

Objetivo general

Evaluar los efectos de la catalasa sobre la proliferación celular de fibroblastos embrionarios de ratón.

Objetivos particulares

- Medir las duplicaciones poblacionales y la tasa de proliferación de fibroblastos embrionarios de ratón silvestres $Cat^{+/+}$ y mutantes $Cat^{-/-}$.
- Crear los vectores de expresión inducible de catalasa peroxisomal (PB-Cat^p) y catalasa citosólica (PB-Cat^c).
- Evaluar los cambios en las duplicaciones poblacionales y la tasa de proliferación de fibroblastos embrionarios de ratón transfectados con las isoformas de catalasa.
- Derivar células troncales embriónicas (ESC) mutantes para la catalasa $Cat^{-/-}$ y transfectarlas establemente con las isoformas de catalasa Cat^p -SKL y Cat^c - Δ KANL.

Materiales y métodos.

1. Medios y procedimientos generales de cultivo celular.
 - a) Medios y materiales para cultivos celulares de mamíferos.

Dublecco's Modified Eagle Medium (DMEM), pH 6.9

Disolver el sobre de DMEM en 900 ml de agua milliQ para cultivo celular. Adicionar 3.7 g de bicarbonato de sodio y ajustar a pH 6.9 con HCl. Aforar a 1000 ml y esterilizar por filtración con membrana de 22 μ m.

Medio M10 para fibroblastos

10% suero bovino fetal (SBF), 1 mM glutamina, 50 U/ml penicilina, 40 μ g/ml estreptomicina, 1x aminoácidos no esenciales, 1 mM piruvato de sodio y 0.1 mM β -mercaptoetanol. Aforar con DMEM.

Medio M15 para células troncales embriónicas

15% suero fetal bovino, 1 mM glutamina, 100 μ g/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomicina, 1x aminoácidos no esenciales, 1 mM piruvato de sodio y 0.1 mM β -mercaptoetanol. Aforar con DMEM.

Medio de congelación

Preparar en fresco antes de congelar: 60% DMEM, 20% DMSO (dimetil sulfóxido grado cultivo celular), 20% FBS. Agregar a la suspensión celular a congelar en relación 1:1.

Gelatina 0.1%

Pesar los gramos suficientes para obtener una solución de 0.1% (w/v) de gelatina grado cultivo celular. Calentar la solución hasta disolver completamente la gelatina. Esterilizar por filtración con membrana de 22 μ m.

PBS

Pesar 8 g NaCl (137 mM), 200 mg KCl (2.7 mM), 1.44 g Na_2HPO_4 (0.01 M) y 240 mg KH_2PO_4 (1.4 mM). Agregar 1000 ml de agua milliQ y esterilizar por filtración con membrana de 22 μ m.

Verseno

EDTA 0.02% disuelto en PBS. Esterilizar por filtración con membrana de 22 μ m.

Tripsina

Preparar tripsina a 0.0125% o 0.025% en verseno. La concentración depende del cultivo celular y de la actividad de la tripsina; para MEF se puede usar a 0.0125%, para células HepG2 puede utilizarse a 0.025%. Precalear a 37° C antes de usarse. Para caja de 100 cm, 6 cm y 35 mm de diámetro se utiliza 1, 0.5, 0.3 ml de tripsina, respectivamente.

- b) Métodos generales para cultivo celular de mamíferos

Los procedimientos para el sub-cultivo celular, la descongelación de células, el recubrimiento de cajas con gelatina y la inactivación mitótica de fibroblastos, se llevaron a cabo de acuerdo con Guerrero-Flores (2018). La extracción de fibroblastos primarios y la electroporación se realizaron siguiendo a Sánchez-Cáñez (2020).

Sub-cultivo celular

Aspirar el medio de cultivo celular, añadir PBS y remover. Agregar tripsina hasta cubrir la caja e incubar a 37°C por < 5 minutos. Para evitar lisis por sobreexposición con tripsina, se puede golpear ligeramente la caja para ayudar a despegar las células. Inactivar tripsina con medio que contenga suero fetal bovino. Colocar la solución celular en un tubo tipo Falcon de 15 cm y centrifugar a 200 xg (rotor O-G26/1 14.8 cm, centrifuga Thermo Scientific IEC CL10) por cinco minutos. Aspirar el medio sobrenadante evitando dañar el botón celular. Agregar un volumen definido de medio para re-suspender el botón celular. Tomar 10 µl del medio celular y mezclar con 10 µl de azul de tripano, colocar 10 µl de esta mezcla en cámara de Neubauer para hacer el conteo celular. Agregar medio necesario para la caja de cultivo a utilizar, re-suspender y sembrar homogéneamente. Anotar número de células, número de pase, línea celular y fecha. Si las células se congelan, agregar un volumen de medio de congelación por un volumen de células en viales de congelación, marcado con número de pase y de células, nombre de línea celular y fecha. Mezclar por inversión y almacenar a -60°C por dos días. Posteriormente pasar a nitrógeno líquido para almacenamiento prolongado.

Descongelar células

Colocar el vial de congelación en baño de agua a 37°C. Agregar la suspensión celular a un tubo tipo Falcon de 15 cm con 4-5 ml de medio M10 y centrifugar a 200 xg (rotor O-G26/1 14.8 cm, centrifuga Thermo Scientific IEC CL10) por 5 minutos. Quitar sobrenadante, re-suspender el botón celular, contar el número de células y sembrar.

Recubrimiento de cajas con gelatina (0.1%)

Cubrir completamente la superficie de la caja utilizada con gelatina (0.1%). Incubar por dos horas a temperatura ambiente. Remover gelatina y dejar secar 15 minutos la caja para ser utilizada inmediatamente, o almacenar para su uso posterior.

Extracción de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF).

Sacrificar a una ratona preñada de 13.5 días de gestación y remover úteros con embriones. Colocar los embriones en una caja estéril con PBS frío. En condiciones asépticas y sobre hielo, separar cada embrión de la placenta y saco vitelino. Eliminar patas, cola, encéfalo y órganos internos. Lavar los cadáveres con PBS para disminuir la posible contaminación. Triturar finamente el tejido con una navaja. Recolectar el tejido de cuatro embriones en una jeringa de 5 ml con 3 ml de medio M10. Pasar el tejido a través de la aguja y colocarlo en una caja de 10 cm tratada previamente con gelatina (0.1%). Adicionar 10 ml de medio M10 y homogeneizar la suspensión de tejido. Cuando el cultivo llegue a sub-confluencia (alrededor de 48 h) congelar las células.

Electroporación de MEF

Mezclar 100 µl de la solución de electroporación comercial BTXpress y el volumen calculado de los plásmidos. Se utiliza 1 µg del vector de transposasa por 4 µg de transposón. Tripsinizar células a electroporar, inactivar tripsina y centrifugar a 200 xg (rotor O-G26/1 14.8 cm, centrifuga Thermo Scientific IEC CL10) por 5 min. Retirar el sobrenadante y re-suspender en 3 ml de PBS. Contar el número de células; por cada electroporación se necesitan 5×10^5 células. Transferir 5×10^5 células en tubos de 1.5 ml, y centrifugar a 500 xg (rotor RT-151 82 mm, centrifuga Digen21) por 5 min. Aspirar el sobrenadante y colocar el botón celular en hielo. Procurar que el botón no se encuentre en hielo por más de 30 min. Re-suspender el botón celular con la solución de electroporación BTXpress y los plásmidos. Transferir la suspensión en celda de electroporación BTX (2 mm) y dar un pulso de 170 V y 20 ms (ElectroSquarePorator™ ECM830). Agregar 200 µl de medio M15, recuperar la suspensión y transferirla a

tubo de 1.5 ml. Centrifugar a 1300 xg (rotor RT-151 82 mm, centrifuga Digicen21) por 45 s. Lavar la celda de electroporación con 400 µl de medio M15 para recuperar células residuales y colocar la suspensión en la caja de 35 mm de diámetro. Aspirar sobrenadante de tubos centrifugados, añadir 500 µl de medio M25 y separar el botón del fondo del tubo. No re-suspender completamente el botón sino incubar 20 min en incubadora a 37 °C y 5% CO₂. Re-suspender completamente y pasar la suspensión celular en una caja de 35 mm de diámetro, que contiene las células residuales. Aforar con medio M15. Después de 24 horas de transfección cambiar el medio para eliminar células muertas. A las 48 horas de la transfección, evaluar la eficiencia de electroporación.

Inactivación mitótica de MEF o generación de células alimentadoras (feeders).

Sembrar MEF en una caja de cultivo y esperar hasta que lleguen a sub-confluencia. Agregar 100 µl de Mitomicina C por cada 5 ml de medio. Incubar entre 2-4 horas a 37° C. Remover medio, lavar dos veces con PBS y sub-cultivar en cajas cubiertas con gelatina o congelar para su uso posterior. Para sub-cultivar se siembran 35,000-40,000 por pozo en placa de 96 pozos, 2x10⁵-3x10⁵ en una caja de 35 mm, 5x10⁵-7x10⁵ en una caja de 6 cm, 1.5x10⁶-2x10⁶ en una caja de 10 cm.

Ensayos de proliferación celular de fibroblastos embrionarios de ratón.

Con el número de MEF registrado en cada pase se determinó el número de veces que una población celular plaqueada se duplicó antes de ser sub-cultivada, es decir, las duplicaciones poblacionales (DP) (Rubio *et al.*, 2002) utilizando la siguiente ecuación: $PD = \log_2 (N_t/N_0)$. Donde N_t es número de células en tiempo t y N_0 es el número de células iniciales. Para determinar el número de veces que la población poblacional original (en el inicio del cultivo) se había dividido en cada cierto tiempo, se calculó las PD acumulativas: $PD_{final} = PD_{t1} + PD_{t2}$. Donde PD_{t1} al tiempo 1 y PD_{t2} al tiempo 2. Las duplicaciones finales fueron graficadas contra el número de días de cultivo.

También se obtuvo el número de divisiones celulares por unidad de tiempo (f) (Mojica, 2018) y se graficaron contra el número de días de cultivo, como sigue: $f = \log_2 (N_t/N_0) / t$. Donde: N_t es número de células en tiempo t , N_0 es el número de células iniciales y t es el tiempo en días

2. Procedimientos para clonación molecular.

Tabla 1. Oligonucleótidos y plásmidos utilizados para clonación molecular.

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')	Longitud (bases)	Isoforma de catalasa	Sitio de restricción
Cat-forward	AGTCtctagaGCCACCATGGCTGACAGCCGGGATCC	36	Cat ^p y Cat ^c -ΔKANL	XbaI (en minúsculas)
SKL-reverse	GACTtctagaTCACAGTTTCGACTCCCTTGCCGCCAAGTGAG	42	Cat ^p -SKL	XbaI (en minúsculas)
ARE-reverse	GACTtctagaTCACTCCCTTGCCGCCAAGT	30	Cat ^c -ΔKANL	XbaI (en minúsculas)
Vector		Longitud (bases)		Marcador de selección
PKS+		2961		Penicilina, Lac-Z
PB-Booster		7119		Penicilina

a) Métodos para clonación molecular

La clonación por PCR y el uso de enzimas de restricción se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos recomendadas por el fabricante. La transformación química de bacterias y la extracción de plásmido se realizó de acuerdo con Sambrook (2001).

PCR de punto final

Realizar el PCR en campana de extracción, utilizando guantes y materiales exclusivos para PCR (ver Tabla 2). Tomar una muestra del producto de PCR y correr en un gel de agarosa 1% para corroborar la amplificación de la secuencia de interés.

Tabla 2. PCR para clonación de isoformas de catalasa

Cat ^c -KANL		Cat ^p -SKL	
pCat ^c (10 ng): 1 µl		pCat ^c (10 ng): 1 µl	
Cat-forward (10 µM): 1.25 µl		Cat-forward (10 µM): 1.25 µl	
ARE-reverse (10 µM): 1.25 µl		SKL-reverse (10 µM): 1.25 µl	
dNTPs (10 mM): 0.5 µl		dNTPs (10 mM): 0.5 µl	
Kapa Buffer 5x : 5 µl		Kapa Buffer 5x : 5 µl	
5 U/µl Kapa Taq HotStart: 0.1 µl		5 U/µl Kapa Taq HotStart: 0.1 µl	
H ₂ O ₂ : 15.9 µl		H ₂ O ₂ : 15.9 µl	
Parámetros del PCR			
T1: 95° C, 4 min		T1: 95° C, 4 min	
T2: 95° C, 30 s 65° C, 30 s 72° C, 2 min	35 ciclos	T2: 95° C, 30 s 65° C, 30 s 72° C, 2 min	35 ciclos
T4: 72° C, 5 min		T4: 72° C, 5 min	

Los productos de PCR se digirieron con la enzima de restricción XbaI, se corrieron en gel de agarosa y se aislaron las bandas con el kit comercial. Los genes de la catalasa se ligaron al vector pBluescript II KS+ (PKS+) digerido con XbaI para generar los plásmidos PKS-Cat. Se seleccionaron las colonias blancas con el ensayo de X-gal (β -D-galactopiranosido; 40 µg por ml de medio LB), que indica la ligación del inserto Sambrook (2001). Se aislaron los vectores PKS-Cat y se realizaron análisis de restricción con las enzimas XbaI y EcoRI. Los vectores PKS-Cat^c y PKS-Cat^p se secuenciaron por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, del Instituto de Biotecnología, UNAM. Finalmente, los vectores se digirieron con las enzimas NotI y Sall y se aislaron los genes de la catalasa, los cuales se ligaron al vector pBooster digerido con NotI y XhoI. Así, se crearon los vectores de expresión inducible PB-Cat^c- y PB-Cat^p.

Transformación química de bacterias.

Descongelar células quimio-competentes a -60 °C y mantener en hielo por 10 min. Agregar plásmido a las células, mezclar adecuadamente e incubar en hielo por 30 min. Dar un choque térmico a 42° C por 60 s y colocar en hielo por 90 s. Transferir las células transformadas a medio de recuperación SOC (0.5 % extracto de levadura, 2% triptona, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgSO₄•7H₂O, 20 mM glucosa) e incubar a 37°C por 45 min. Sembrar células en una caja con antibiótico de selección.

Miniprep para aislamiento de plásmido.

Tomar una colonia de bacterias transformadas, inocular en medio LB con antibiótico de selección e incubar a 37° por 8 hrs. Tomar 300-500 µl del cultivo celular, colocar en un tubo de 1.5 ml y centrifugar a 1000 xg (rotor RT-151 82 mm, centrifuga Digicen21) por un minuto. Retirar sobrenadante, adicionar 100 µl de solución P1 (50 mM Tris pH 8, 10 mM Na₂EDTA) y homogeneizar el botón celular. Adicionar 200 µl de solución P2 (200 mM NaOH, SDS 1%) y mezclar 5 veces por inversión. Evitar que la reacción de lisis se lleve a cabo por más de 5 minutos. Adicionar 150 µl de solución P3 (3 M acetato de potasio, pH 5.5) y mezclar 5 veces por inversión. Colocar en hielo por 10 min. Centrifugar a 1200 xg (rotor RT-151 82 mm, centrifuga Digicen21) por 10 min. Recolectar el líquido sobrenadante y colocar en un nuevo tubo de 1.5 ml. Agregar 200 µl fenol y 200 µl cloroformo al sobrenadante y

mezclar por agitación. Evitar que se derrame el fenol. Centrifugar a 1200 xg (rotor RT-151 82 mm, centrifuga Digicen21) por 10 min a temperatura ambiente. Tomar la fase superior acuosa y colocar en un nuevo tubo de 1.5 ml. Evitar tomar la fase orgánica. Agregar 10 µl de NaCl (5 M) y 700 µl de etanol frío. Centrifugar a 1200 xg (rotor RT-151 82 mm, centrifuga Digicen21) por 10 min por 10 min a 4° C. Remover etanol y lavar el botón con 1 ml de etanol (70 %) y centrifugar a 1200 xg (rotor RT-151 82 mm, centrifuga Digicen21) por 10 min a temperatura ambiente. Retirar etanol y dejar secar por 10-20 min. Re-suspender el botón en 30-50 µl de agua estéril, cuantificar DNA y correr en gel de agarosa TAE 1x.

3. Evaluación funcional de vectores de catalasa.

Para probar la funcionalidad de los vectores de catalasa construidos, los vectores se transfectaron químicamente con polyetilenimina (PEI) a células HepG2 y se indujo la expresión de catalasa con doxiciclina. Finalmente, la actividad de las isoformas de catalasa se evaluó con un gel de actividad y la localización subcelular con inmunofluorescencia. La preparación de PEI se realizó de acuerdo con lo recomendado por el fabricante (Sigma). La transfección de células HepG2 se realizó según Yang *et al.* (2016). Los materiales y procedimientos para el gel de actividad de catalasa fueron tomados de Weydert & Cullen (2009). Los procedimientos para la inmunofluorescencia se tomaron de Guerrero-Flores (2018).

a) Materiales utilizados.

Medio M10 para células HepG2

10% suero bovino fetal (SBF), 1 mM glutamina, 100 µg/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 1% aminoácidos no esenciales, 1 mM piruvato de sodio y 0.1 mM β-mercaptoetanol. Aforar con DMEM.

PEI (polyethylenimine) (1 mg/ml)

El PEI se debe preparar fresco antes de cada serie de experimentos debido a que su almacén por largos períodos de tiempo provoca toxicidad en células. Pesar 10 mg de PEI y mezclar con 8 ml de agua milliQ. Con HCl bajar el pH (<2) de la solución y mezclar hasta disolver el PEI. Una vez que se haya disuelto el PEI, neutralizar con NaOH a pH 7. Aforar a 10 ml, esterilizar por filtración, alicuotar y almacenar a -20°C.

Amortiguador de pre-electroforesis para gel de actividad de catalasa: pesar 22.76 g Tris base, 0.38 g Na₂EDTA y agregar 800 ml de agua. Ajustar el pH 8.8 con HCl concentrado y aforar a 1000 ml.

Amortiguador de electroforesis para gel de actividad de catalasa: pesar 6.6 g Tris base, 0.68 g Na₂EDTA, 22.5 g glicina y agregar 800 ml de agua. Ajustar a 8.3 el pH con HCl concentrado y aforar a 1000 ml.

Amortiguador de fosfatos (PB, 0.05 M, pH 7.8): preparar soluciones stock 1M de KH₂PO₄ y 1M K₂HPO₄. Preparar 100 ml 0.05 M K₂HPO₄ y 20 ml de 0.05 M KH₂PO₄. Medir el pH de K₂HPO₄ y agregar KH₂PO₄ para ajustar el pH a 7.8.

Gel de actividad a 8% para catalasa.

Hacer gel de corrida al 8% por duplicado: 2.5 ml amortiguador Tris base (1.5 M, pH 8.8), 2.7 ml acrilamida (30%), 4.7 ml agua, 33.3 µl persulfato de amonio (APS) 10%, 6.7 µl tetrametiletilendiamina (TEMED). Agregar a placas de vidrio y adicionar agua o alcohol hasta que el gel de corrida esté cubierto. Esperar a que polimerice (20-30 min). Hacer gel de corrida al 8%: 3 ml agua, 1.25 ml amortiguador Tris base (0.5 M, pH 6.8), 0.65 ml acrilamida (30%), 25 µl APS (10%), 5 µl TEMED. Agregar sobre el gel de corrida, colocar peine de pozos y esperar que polimerice (20-30 min). Antes de colocar las muestras, el gel se corre a 40 mA por 1 h a 4° C para remover las

impurezas y eliminar partículas no polimerizadas. Posteriormente, se cargan las muestras y se corre a 40 mA por 4 h a 4° C.

H₂O₂ (0.003 %): Agregar 5 µl de H₂O₂ (30%) a 50 ml de agua milliQ. Mezclar y proteger de la luz.

Cloruro de hierro 1%: Pesar 100 mg de cloruro de hierro a 10 ml de agua milliQ y mezclar.

Ferricianuro de potasio 1%: Pesar 100 mg de ferrocianuro de potasio a 10 ml de agua milliQ y mezclar.

b) Evaluación de actividad de catalasa.

Transfección de células HepG2.

Se transfectaron células HepG2 con los vectores siguiendo los métodos de Yang *et al.* (2016), con las siguientes modificaciones. Cultivar las células con medio M10 y sembrar células un día antes de la transfección calculando que el cultivo se encuentre a 50% de confluencia. Para caja de 6 cm sembrar 4x10⁵ células HepG2. Remover el medio de cultivo, lavar con PBS y agregar 2 ml de medio para transfección con PEI. La cantidad de DNA para caja de 6 cm es 6.85 µg DNA. Mezclar el DNA con 50 µl de medio Optimem. Utilizar 2 µg de PEI por cada 1 µg DNA; para 6.85 µg DNA se emplea 13.7 µg de PEI. Mezclar con 50 µl medio Optimem. Mezclar las soluciones de DNA y PEI, agitar por 1 minuto con vortex y dejar reposar por 10 minutos. Mezclar las soluciones de DNA y PEI y mezclar por pipeteo. Adicionar por goteo el complejo PEI:DNA a la caja e incubar por 4 horas. Aspirar medio de transfección, lavar dos veces con PBS y adicionar medio DMEM. Cuantificar la eficiencia de transfección después de 48 horas del tratamiento. Para inducir la expresión del gen de catalasa adicionar 150 ng y 1.5 µg de doxiciclina por ml de medio durante 48 horas.

Preparación de muestras de cultivo celular para gel de actividad.

Remover medio y lavar el cultivo con PBS. Las muestras en las cajas de cultivo se pueden almacenar a -60 °C si no se procesan en ese momento. Adicionar al cultivo 50 µl de amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7.8) con inhibidor de proteasas 1x. Levantar las células con ayuda de micropipeta y colocar la suspensión celular en tubo de 0.5 ml. Las muestras se pueden almacenar a -70°C

Cuantificación de proteínas

Diluir reactivo de Bradford en proporción 1:5 con H₂O y utilizar 200 µl de reactivo diluido por muestra en placa de 96 pozos. Hacer curva estándar por duplicado con BSA 1µg/µl como sigue:

BSA 1µg/µl	H ₂ O	Bradford 1:5
0	10 µl	200 µl
1µl	9 µl	200 µl
2 µl	8 µl	200 µl
4 µl	6 µL	200 µl
8 µL	2 µL	200 µl

Agregar reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) a la muestra y medir la absorbancia a 595 nm (Microplate Reader, iMark, Bio-Rad). Calcular la concentración de proteínas de las muestras por duplicado obteniendo la ecuación de la recta.

Gel de actividad de catalasa

La medición de la actividad de la enzima catalasa se siguió de acuerdo con Weydert & Cullen (2009), como sigue: Hacer el gel de actividad 8% para catalasa. Colocar los geles en la cámara de electroforesis, cubrirlo con amortiguador de pre-electroforesis y correr a 40 mA por 1 h a 4°C. Preparar las muestras diluyendo 1:1 con amortiguador de carga y cargar las muestras a los pozos, procurando que no sobrepasen los 20 µl. Para muestras de cultivo celular cargar 50-100 µg de proteína por muestra. Correr las muestras en el amortiguador de electroforesis a 40 mA por 3 h en 4°C. Después de las 3 h, remover el amortiguador de electroforesis y colocar el gel de electroforesis. Correr el gel por 1 h a 40 mA en 4°C. Remover el gel de la cámara de electroforesis y lavar 3 veces con agua destilada por 10 min cada lavado. Incubar el gel con la solución H₂O₂ (0.003 %) por 10 min. Lavar el gel con agua destilada por menos de tres minutos para evitar que el H₂O₂ se lave por completo. Agregar cloruro de hierro (1%) y ferricianuro de potasio (1%) al mismo tiempo. Mezclar el gel con la tinción hasta que aparezcan bandas acromáticas y lavar con agua destilada. Las bandas se analizaron con el programa ImageJ.

c) Materiales para inmunofluorescencia.

PBT 0.1%: 0.1% Triton X-100 en PBS.

Solución de bloqueo: 10 % de suero de cabra, bovino fetal o burro en PBT 0.1%.

Anticuerpos primarios y secundarios: 2µg/ ml anti-PMP70 monoclonal (SAB4200181-200UL, Sigma-Aldrich; producido en conejo); 1 : 500 anti-catalasa policlonal (sc-50508, Santa Cruz Biotechnology, producido en conejo; donado por el Dr. Enrique Salas Vidal), Alexa Fluor 594 anti-conejo (1:1000).

d) Métodos para inmunofluorescencia.

Retirar medio de cultivo y lavar dos veces con PBS. Fijar con paraformaldehído (PFA) 4%, lo suficiente para cubrir la caja, e incubar 15 minutos a temperatura ambiente. Retirar el PFA y lavar 3 veces con PBS por 10 minutos. Mantener en PBS si se almacena por 4°C para análisis posteriores. Lavar tres veces por 10 min con PBT 0.1%. Incubar en solución de bloqueo por 10 minutos.

Incubar en solución de bloqueo con anticuerpo primario a 4°C por 12 horas. Lavar tres veces por 10 minutos con PBS. Incubar a temperatura ambiente entre 1:30-2:00 h con anticuerpo secundario diluido en PBS. Es importante que las muestras se encuentren protegidas de la luz para evitar la degradación del anticuerpo secundario. Lavar tres veces con PBS por 10 minutos. Incubar con DAPI 1:15000 entre 3-5 minutos. Para evitar "sangrado" por sobre exposición con DAPI, observar la tinción de los núcleos al microscopio de fluorescencia. Lavar tres veces con PBS. Analizar muestras en un microscopio Zeiss Axio Observer.Z1 usando la cámara AxioCammMR3, objetivo EC Plan-Neofluar 10x/0.30 y el software Axiovision LE. Los reflectores utilizados fueron: DAPI (Excitación G 365 nm; divisor óptico FT 395nm; emisión LP 420 nm), Rhodamine (Excitación BP 546/12 nm; divisor óptico FR 560 nm; emisión BP 575-640 nm) y Yellow Fluorescent Protein (Excitación BP 500/12 nm; divisor óptico 515 nm; emisión 535-30 nm).

4. Generación de clonas de células troncales embrionarias (ESC) *Cas*^{-/-} complementadas con isoformas de catalasa *Cat*^P-SKL y *Cat*^C-ΔKANL.

a) Métodos para generación de clonas de ESC.

La derivación de células troncales embrionarias fue llevada a cabo por el Laboratorio de Producción de Roedores Transgénicos. Las condiciones de cultivo y manipulación de ESC se realizó conforme a Mulas *et al.* (2019). El aislamiento de colonias de ESC fue realizado conforme a Mojica (2018). El aislamiento de DNA genómico se modificó de Tompers & Labosky (2014). Las secuencias de oligonucleótidos para genotipificación de sexo

genético se tomaron de Tunster (2017). La electroporación de ESC siguió los mismos parámetros que la electroporación de fibroblastos. Finalmente, el procedimiento para el cariotipo se llevó a cabo de acuerdo con el Laboratorio de Producción de Roedores Transgénicos.

Derivación de ESC Cas^{-/-} y selección de líneas.

Se obtuvieron embriones en etapa de pre-implantación (3.5 post-coitum) a partir de ratones mutantes homocigotos de catalasa Cat^{-/-}. Cada embrión se sembró por separado sobre células alimentadoras en una caja de 96 pozos con medio M15 suplementado con inhibidores 2i (CHIR99021, PD0325901) para derivar ESC. Una vez que las células troncales de cada embrión crecieron, se pasaron a caja de 24 pozos para permitir su expansión. Las células se genotipificaron (ver más adelante) y se seleccionaron solamente las células con genotipo XY (descrito más adelante).

Cultivo de ESC

Descongelar las células ESC y sembrar sobre células alimentadoras. Agregar 1µl de LIF por cada ml de medio M15. Cambiar diariamente el medio evitando que las células se encuentren en un medio acidificado. Dos días después de la siembra se empiezan a observar colonias de ESC. Esperar hasta que lleguen a sub-confluencia, antes que las colonias se junten entre sí, para sub-cultivar en una nueva caja con o sin células alimentadoras, o congelar.

Extracción de DNA genómico de células de mamífero

Lavar el cultivo celular con PBS. Si las células están en monocapa re-suspender las células en 1 ml de amortiguador de lisis (0.2 % Triton X-100, 200 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 20 mM EDTA, 100 mg/ml proteinasa K); si las células se encuentran en botón celular, se re-suspende en 0.5 ml de amortiguador de lisis. Incubar a 55 °C por 1.5 h. Agregar un volumen igual de isopropanol y 20 mM de NaCl. Colocar a -20° C por 12 h. Centrifugar a 1200 xg (rotor RT-151 82 mm, centrifuga Digicen21) por 25 minutos. Retirar sobrenadante, lavar el botón de DNA con etanol 70%, centrifugar y re-suspender el botón en 30-50 µl agua milliQ. Cuantificar la concentración de DNA y correr un gel de agarosa TAE 1x.

Genotipificación de sexo genético de líneas ESC.

Una estrategia para generar ratones transgénicos consiste en el trasplante de ESC modificadas genéticamente a embriones en etapa de blastocitos y el posterior desarrollo de los embriones en ratonas pseudo-preñadas. Las ESC contribuyen a los tejidos del embrión, incluyendo el linaje germinal. Cada ratón quimérico resultante (denominados fundadores) se puede cruzar con ratones silvestres para obtener ratones transgénicos (Kumar *et al.*, 2009). Un ratón quimérico macho se puede cruzar con varias hembras para aumentar la probabilidad de obtener ratones transgénicos con contribución a la línea germinal (en cambio, una hembra quimérica solo se puede cruzar pocas veces) (Kumar *et al.*, 2009). Con base a lo anterior, se seleccionaron las ESC derivadas de embriones XY para realizar los experimentos de clonación y complementación con catalasa, en caso de utilizar las ESC para generar ratones transgénicos a partir de ESC.

Las células de ESC derivadas de cada embrión se genotipificaron para el sexo genético por PCR, el cual se basa en la amplificación de los alelos Rbm31x (unido a X) y Rbm31y (unido a Y) (Tunster, 2017). La oligos utilizados (10 µM): forward CACCTTAAGAACAAGCCAATACA y reverse GGCTTGTCTGAAAACATTTGG. Mezcla de reacción para 15 µl: 1.5 µl buffer, 0.3 µl dNTP, 1 µl oligonucleótidos (2.5 mM), 0.6 µl DNA genómico, 0.06 µl Taq polimerasa, 11.54 µl H₂O.

- Parámetros de reacción:

T1: 94° C, 2 min	
T2: 94° C, 30 s 60° C, 30 s 72° C, 1 min	30 ciclos
T4: 72° C, 5 min	

Los productos de PCR generan un producto de 269 bp del cromosoma X y uno de 353 bp del cromosoma Y. Los machos generan dos bandas (268 y 353 bp) y las hembras una banda (269 bp) (Tunster, 2017).

Aislamiento de clones de ESC.

Sembrar ESC a baja densidad sobre células alimentadoras para obtener colonias lo suficientemente separadas. En una caja de 10 cm se pueden sembrar 500 células. Identificar las colonias compactas y con bordes bien definidos. Las colonias están listas para aislar cuando se puedan observar a simple vista. Preparar una placa de 96 pozos con células alimentadoras (30,000-40,000). En una placa de 96 pozos agregar 50 µl de tripsina en cada pozo por colonia. Lavar la caja de colonias con PBS y cubrir con PBS. El aislamiento se realiza mecánicamente fuera de la campana de cultivo, por lo que debe realizarse bajo condiciones asépticas. Con una punta de micropipeta hacer un contorno alrededor de la colonia, promoviendo que se desprege y tomar una colonia de ESC y transferir a pozo con tripsina. Una vez colectadas todas las colonias, incubar a 37° C por 10 minutos en incubadora. Agregar 50 µl de medio M15 y re-suspender las células en tripsina, subiendo y bajando 10 veces con micropipeta. Transferir las células a los pozos con células alimentadoras con medio M15 y LIF. Cambiar medio de los cultivos y transferir a placa de 24 pozos, después a caja de 35 mm.

Transfección de ESC con vectores de catalasa.

Mezclar 100 µl de la solución comercial de electroporación BTXpress y el volumen calculado para los plásmidos. Se utiliza 1 µg del vector de transposasa por 4 µg de vector de catalasa. Tripsinizar células, inactivar tripsina y centrifugar a 200 xg (rotor O-G26/1 14.8 cm, centrifuga Thermo Scientific IEC CL10) por 5 min. Retirar el sobrenadante y re-suspender en 3 ml de PBS. Contar el número de células; por cada electroporación se necesitan 5×10^5 células. Transferir 5×10^5 células en tubos de 1.5 ml, y centrifugar a 500 xg (rotor RT-151 82 mm, centrifuga Digicen21) por 5 min. Aspirar el sobrenadante y colocar el botón celular en hielo. Procurar que el botón no se encuentre en hielo por más de 30 min. Re-suspender el botón con la solución de electroporación y los plásmidos. Transferir la suspensión en celda de electroporación BTX de 2 mm y dar un pulso de 170 V y 20 ms (ElectroSquarePorator™ ECM830). Agregar 200 µl de medio M15, recuperar la suspensión y transferirla a tubo de 1.5 ml. Centrifugar a 1300 xg (rotor RT-151 82 mm, centrifuga Digicen21) por 45 s. Lavar la celda de electroporación con 400 µl de medio M15 para recuperar células residuales y colocar la suspensión en una caja de 35 mm de diámetro. Aspirar el sobrenadante de tubos centrifugados, añadir 500 µl de medio M25 y separar el botón del fondo del tubo. No re-suspender completamente el botón. Incubar 20 min en incubadora a 37°C. Re-suspender completamente y sembrar la suspensión celular de ESC sobre células alimentadoras en una caja de 35 mm de diámetro. Aforar con medio M15. Después de 24 horas de transfección cambiar el medio para eliminar células muertas. El aislamiento de sub-clonas transfectadas con las isoformas de catalasa Cat^P-SKL y Cat^C-ΔKANL se llevó a cabo como anteriormente se describió y la identificación de colonias transfectadas se basó en la expresión de la proteína fluorescente venus.

Materiales para cariotipo.

Solución hipotónica (KCl 0.56% w/v en agua). Colcemida (0.1µg/ml). Solución fijadora (3 volúmenes metanol: 1 volumen ácido acético glacial). Preparar antes de realizar el procedimiento para cariotipo. Laminillas para

spreads de cromosomas: lavar en acetona y después en agua destilada y dejar secar. Mantener las laminillas sumergidas en metanol (40 %) a 4 ° C.

Método para cariotipo.

Sembrar 1×10^6 células ESC en un plato gelatinizado de 60 mm y cultivar toda la noche. Incubar el cultivo con $2 \mu\text{l}$ de colcemida por 2 ml de medio durante 4 horas. Con mucho cuidado, retirar medio y lavar el cultivo con PBS para evitar que las células mitóticas, que están adheridas muy débilmente, se despeguen. Agregar 1 ml de tripsina-EDTA e incubar hasta que las células se despeguen. Inactivar la tripsina y dispersar las células por pipeteo hasta obtener una suspensión de células individuales. Centrifugar a 200 xg (rotor O-G26/1 14.8 cm, centrifuga Thermo Scientific IEC CL10) por 5 min a temperatura ambiente y remover el sobrenadante excepto 100 μl . Re-suspender las células en este volumen. Agregar 5 ml de solución hipotónica e incubar a temperatura ambiente por 6 min. Centrifugar a 200 xg (rotor O-G26/1 14.8 cm, centrifuga Thermo Scientific IEC CL10) 5 min y remover la solución hipotónica excepto 100 μl . Re-suspender el botón celular en este volumen hasta obtener una solución homogénea. Agregar 5 ml de solución fijadora e incubar 20 min a temperatura ambiente. Centrifugar 200 xg (rotor O-G26/1 14.8 cm, centrifuga Thermo Scientific IEC CL10) por 5 min, decantar el sobrenadante y re-suspender en 5 ml de solución fijadora e incubar por 5 min a T.A. Centrifugar a 200 xg (rotor O-G26/1 14.8 cm, centrifuga Thermo Scientific IEC CL10) por 5 min y re-suspender en 0.5 ml de solución fijadora. Sostener la laminilla a un ángulo de aproximadamente 45 ° y gotear de 1 a 3 gotas de la suspensión de células a una altura de aproximadamente 30 cm (hacer al menos 3 laminillas). Después de que las laminillas se sequen, lavarlas con PBS para remover los residuos de ácido y teñir con el colorante Giemsa. Lavar con agua de la llave para remover exceso de tinción. Observar con una magnificación de 63X o 100X y contar al menos 20 buenos *spreads* (cromosomas en un área restringida pero que no se encuentren encimados). Si al menos el 80% de los *spreads* son normales (40 cromosomas), la línea se considera óptima para utilizarla en experimentos.

5. Acumulación de lípidos en fibroblastos.

Con el objetivo de establecer un protocolo de acumulación de lípidos en MEF, se incubaron los fibroblastos con ácido palmítico a diferentes concentraciones y se evaluó la acumulación de gotas lipídicas. La preparación de ácido palmítico conjugado con albumina de suero fetal se realizó de acuerdo con Pike & Wu (2014). Las gotas lipídicas se tiñeron con rojo oleoso siguiendo las recomendaciones de Mehlem *et al* (2013).

Preparación de 1.5 mM de palmitato-BSA (6:1 radio molar).

El protocolo de Pike & Wu (2014) consiste en la preparación de soluciones de albumina y ácido palmítico, y su conjugación BSA-Ácido palmítico.

Preparación de solución de albúmina de suero bovino (BSA)

Preparar 300 ml de NaCl 150 mM. Agregar 3.06 g de BSA a 90 ml NaCl 150 mM. Colocar la solución de BSA en un baño de agua a 37°C y agitar constantemente. Mantener la temperatura entre 37-40°. Tomar 40 ml de BSA filtrado y diluirlos con 40 ml de NaCl 150 mM para obtener el stock de BSA control 0.17 mM. Esterilizar por filtración y almacenar a -20 °C. Mantener los 50 ml restantes de BSA a 37° en agitación para la conjugación con palmitato.

Preparación de solución de palmitato

Agregar 45.9 mg de palmitato de sodio a 44 ml de la solución de NaCl 150 mM mantenido a 37° C en agitación. Calentar a 70°C en agitación. La solución se tornará turbia entre los 50-60° C, pero se hará clara cerca de los 70°C. Toma alrededor de 60 minutos o más.

Conjugación de BSA-palmitato.

Cuando la solución de palmitato se homogenice, transferir 40 ml de la solución a 50 ml de la solución de BSA en agitación a 37°C. Se debe transferir en 5 ml para permitir una adecuada conjugación. Mantener en agitación a 37°C por una hora. Tomar la solución conjugada, ajustar el pH a 7.4 y aforarla 100 ml con NaCl 150 mM para tener una solución stock de 1.5 mM de palmitato-BSA. Esterilizar por filtración, alicuotar y almacenar a -20°C.

Incubación de fibroblastos con palmitato

Colocar cubreobjetos estériles en cajas de 6 cm y cubrirlos con gelatina (0.1%). Sembrar 300,000 fibroblastos en las cajas cubiertas con gelatina un día antes de empezar la incubación con el ácido graso. Los fibroblastos se incubaron por 24 h con ácido palmítico-BSA a las siguientes concentraciones: 250 μ M, 500 μ M y 1 mM. Palmitato-BSA se diluyó con medio M10. A final de las 24 h se fijaron con PFA 4% para la tinción de rojo oleoso.

Tinción con rojo oleoso

Agregar 2.5 g de rojo oleoso a 400 ml de alcohol isopropílico (99% v/v). Mezclar esta solución stock y mantener a temperatura ambiente. Agregar 1.5 volúmenes de la solución stock de rojo oleoso a 1 volumen de agua destilada. Filtrar la solución por un filtro de 45 μ m para remover precipitado. Esta solución de trabajo se debe preparar antes de trabajar con ella. Para el caso de fibroblastos fijados en cubreobjetos, incubar con la solución rojo oleoso por 60 minutos. Lavar la muestra con agua destilada. Observar en el microscopio para observar si la tinción y lavado son suficientes. Observar los cubreobjetos en microscopio a 100x.

Resultados

1. Fibroblastos embrionarios de ratones silvestres $Cat^{+/+}$ y mutantes $Cat^{-/-}$ no presentan diferencias en la proliferación celular.

Los MEF $Cat^{+/+}$ se derivaron de acuerdo con el protocolo establecido. En cada experimento las células se descongelaron en cajas de 57 cm² (10 cm de diámetro) para permitir que se recuperaran del descongelamiento. Una vez que empezaron a proliferar, las células se sub-cultivaron en cajas de 21 cm² (6 cm de diámetro) para realizar los ensayos de la proliferación celular (Fig. 4), como se describe más adelante. Por lo tanto, los MEF silvestres empezaron el cultivo en el pase 2 (P2). Por otra parte, los fibroblastos mutantes $Cat^{-/-}$ mostraron sensibilidad a la congelación debido a que, cuando se descongelaron, se observó una gran acumulación de desechos celulares y las células que sobrevivían en el cultivo tenían una lenta recuperación de su capacidad proliferativa (ver más adelante). Por tal motivo, se utilizaron células $Cat^{-/-}$ provenientes directamente del cultivo primario (pase 1) y se sembraron en cajas de 21 cm² para los estudios de la proliferación y la senescencia celular (Fig. 4).

La densidad de células primarias en un cultivo afecta el número de duplicaciones poblacionales que se alcanzan: a menor densidad, mayor número de duplicaciones; a mayor densidad se obtienen menos duplicaciones (Hayflick, 1965). Con base en lo anterior, y para evaluar la capacidad proliferativa de MEF silvestres y mutantes para la catalasa, se utilizaron las siguientes condiciones de cultivo (Fig. 4):

1. Se cultivaron 500,000 fibroblastos en una caja de 21 cm² (23,800 células/cm²), se incubaron hasta sub-confluencia (70-80% confluencia) y se realizó el sub-cultivo celular. Se contó el número de células obtenido en cada pase y se sub-cultivaron 500,000 en una nueva caja de 21 cm² cm. Esto se llevó a cabo hasta que dejaron de dividirse y mostraron un fenotipo alargado y aplanado.
2. Se cultivaron 900,000 fibroblastos en tres cajas de 21 cm² (300,000 células en cada caja; 13,900 células/cm²), se incubaron hasta sub-confluencia (70-80% confluencia) y se realizó el sub-cultivo. En cada pase se mezclaron las poblaciones celulares de las tres cajas de cultivo, se contó el número de células obtenido y se sub-cultivaron 900,000 fibroblastos en tres nuevas cajas de 21 cm². Conforme las células dejaron de dividirse y el número de células obtenido en cada pase fue menor de 900,000, se sembraron solo 600,000 en dos cajas de 21 cm² y se sub-cultivaron. Cuando se obtuvieron menos de 600,000 células, se sembraron sólo 300,000 en una caja de 21 cm². Esto se llevó a cabo hasta que dejaron de dividirse y mostraron un fenotipo alargado y aplanado.
3. Se cultivaron 1,000,000 fibroblastos en dos cajas de 21 cm² (500,000 en cada caja; 23,800 células/cm²), se incubaron hasta sub-confluencia (70-80% confluencia) y se realizó el sub-cultivo. En cada pase se

mezclaron las poblaciones celulares derivadas de las ambas cajas de cultivo, se contó el número de células obtenido y se sub-cultivaron 1,000,000 fibroblastos en dos nuevas cajas de 21 cm². Conforme las células dejaron de dividirse y el número de células obtenido fue menor de 1,000,000, se sembraron solo 500,000 en una sola caja de 21 cm². Esto se llevó a cabo hasta que dejaron de dividirse y mostraron un fenotipo alargado y aplanado.

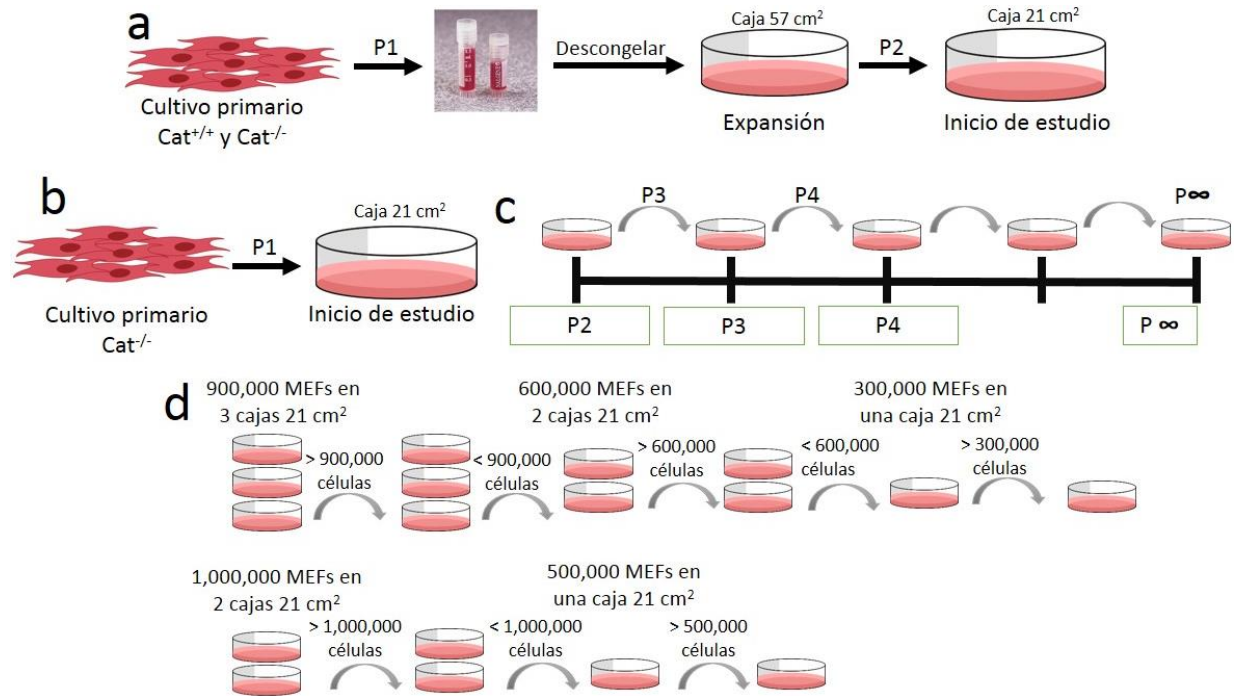


Fig. 4 | Estrategia experimental para el cultivo de MEF silvestres $Cat^{+/+}$ y mutantes $Cat^{-/-}$ de catalasa. a) Los fibroblastos $Cat^{+/+}$ y $Cat^{-/-}$ se congelaron siguiendo el protocolo de extracción. Se descongelaron en una caja de 57 cm² para permitir que se recuperaran del descongelamiento y se sembraron en cajas de 21 cm² (pase 2) para los experimentos de proliferación celular. b) Las células $Cat^{-/-}$ mostraron sensibilidad cuando se descongelaban, por lo que en algunos experimentos se utilizaron células del cultivo primario, partiendo del pase 1 (P1). Debido a las diferencias en la extracción de MEF, el pase 1 (P1) se designa al sub-cultivo cuando se levantaron las células del cultivo primario. c) Cuando los cultivos alcanzaron 70-80% de confluencia, las células se sub-cultivaron hasta que dejaron de dividirse y adquirían un fenotipo alargado y aplanado, o cuando mostraban características de immortalización. d) Se utilizaron tres condiciones: 500,000 células en una caja de 21 cm², 900,000 en tres cajas de 21 cm² y 1,000,000 células en dos cajas de 21 cm². En la condición de 900,000 en tres cajas de 6 cm, cuando el número de células fue menor a 900,000, solo se sub-cultivaron 600,000 en dos cajas; al obtener menos de 600,000 solo se sembraron 300,000 en una caja. En el caso del cultivo de un millón de células en dos cajas de 6 cm, cuando el número de células obtenidas fue menor a 1,000,000, solo se sub-cultivaron 500,000 en una caja de 6 cm.

Con el número de células registrado en cada pase se determinó el número de veces que una población celular plaqueada se duplicó antes de ser sub-cultivada, es decir, las duplicaciones poblacionales (DP) (Rubio *et al.*, 2002). Para determinar el número de veces que la poblacional original (en el inicio del cultivo) se había dividido en cada cierto tiempo, se calculó las PD acumulativas (Ver Materiales y Métodos). También se obtuvo el número de divisiones celulares por unidad de tiempo (*f*) (Mojica, 2018). Las duplicaciones poblacionales acumulativas y el número de divisiones celulares fueron graficadas contra el número de días de cultivo.

Como se ha comentado, los MEF mutantes $Cat^{-/-}$ mostraron sensibilidad a la congelación al seguir el protocolo de extracción que incluye la criopreservación. Para estudiar los efectos de la congelación sobre la capacidad proliferativa, las células $Cat^{-/-}$ se descongelaron en una caja de 57 cm^2 y los fibroblastos que sobrevivieron se cultivaron en cajas de 21 cm^2 . Se realizaron dos experimentos en el que las células se sub-cultivaron hasta que dejaron de proliferar: uno de 500,000 células en una caja de 21 cm^2 ; en el segundo se sembraron 300,000 células en una caja de 21 cm^2 .

En ambos cultivos de células $Cat^{-/-}$, los MEF que sobrevivieron a la descongelación tuvieron una baja tasa de duplicación ($f < 0.2$; Fig. 5) y pocas duplicaciones poblacionales (<3 duplicaciones) durante los primeros 10 pases (ver curva de proliferación en Fig. I y Fig. II en Apéndice 1). En algunos pases el número de células que se obtuvieron durante el sub-cultivo fue menor a las sembradas, lo que se refleja en tasas de duplicación negativas. Esto se relaciona con una gran acumulación de desechos celulares y una morfología alargada y aplanada durante los primeros pases que presentaron las células, que difiere del fenotipo de un fibroblasto proliferativo (Ver morfología en Fig. III y Fig. IV en Apéndice 1). Mientras que las células del cultivo de 300,000 MEF $Cat^{-/-}$ dejaron de proliferar en el pase 10, en el cultivo de 500,000 $Cat^{-/-}$ las células empezaron a proliferar constantemente ($f > 0.25$) y adquirieron nuevamente una morfología proliferativa. El sub-cultivo celular se realizó hasta que se superaron las 27 duplicaciones poblacionales ($f > 1$) a los 76 días, lo que sugiere que se originó una población de células inmortales con capacidad proliferativa ilimitada, un evento común en los MEF (Parrinello *et al.*, 2003; Torado & Green, 1963; Kodama *et al.*, 2001). Por lo tanto, el cultivo se detuvo en el P26.

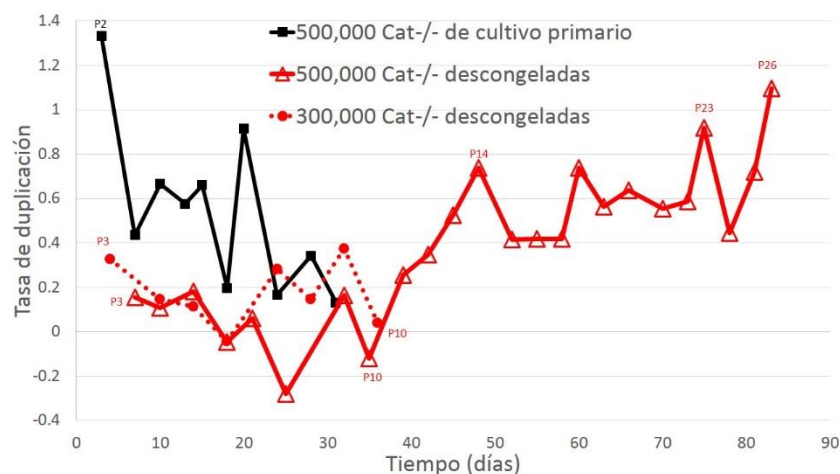


Fig. 5 | Los fibroblastos $Cat^{-/-}$ descongelaados tienen menor tasa de duplicación. Los MEF mutantes descongelaados sembrados a densidad de 300,000 y 500,000 células tuvieron una baja tasa de duplicación ($f < 0.2$) durante los primeros pases (P3-P10) respecto al cultivo de 500,000 MEF $Cat^{-/-}$ derivados de cultivo primario. Se observa la curva de 500,000 fibroblastos $Cat^{-/-}$ derivados de cultivo primario como comparación (ver más adelante).

En conclusión, los MEF $Cat^{-/-}$ son sensibles a la criopreservación y las células que sobreviven a la descongelación tienen capacidad proliferativa disminuida y adquieren una morfología aplanada durante los primeros pases, un indicativo de senescencia celular. En función de lo anterior, los fibroblastos mutantes $Cat^{-/-}$ utilizados en los siguientes experimentos de proliferación no se congelaron, sino que se utilizaron células del cultivo primario (Fig. 4).

En lo que respecta al cultivo de 500,000 fibroblastos en una caja de 21 cm² (23, 800 células/cm²), los MEF $Cat^{+/+}$ silvestres proliferaron menos que sus contrapartes mutantes $Cat^{-/-}$ hasta los 15 días de cultivo ($f = 0.28$ $Cat^{+/+}$ vs $f = 0.66$ $Cat^{-/-}$), lo que provocó que las células mutantes alcanzaran mayor número de duplicaciones poblacionales acumulativas (ver Fig. 6). Posteriormente, la tasa de duplicación disminuyó considerablemente y fue igual entre los dos cultivos celulares ($f = 0.13$) a los 31 días. Esta disminución en la capacidad proliferativa se relacionó con una gran acumulación de desechos celulares y la aparición de células aplanadas y alargadas que cubrieron completamente la superficie de cultivo (Ver Fig. 7 y 8).

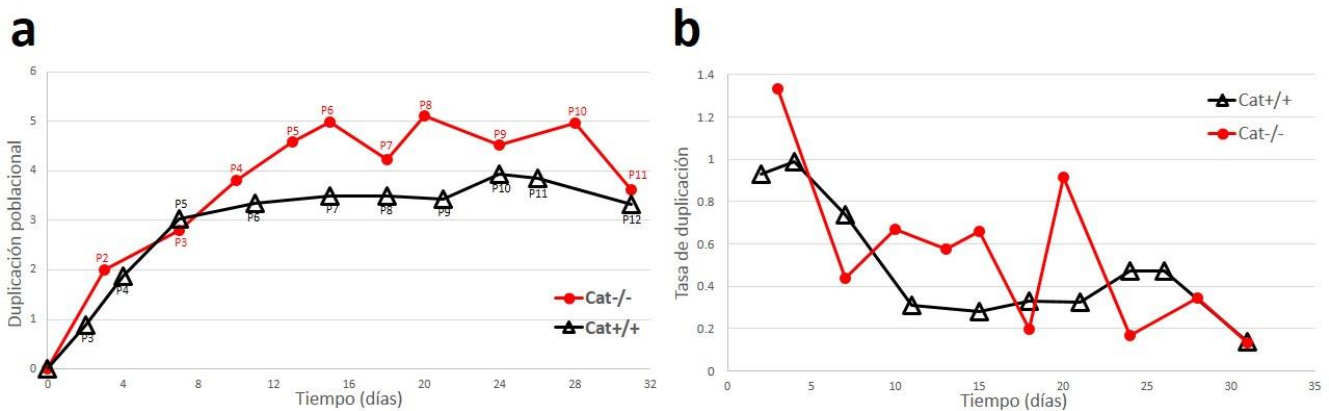


Fig. 6 | Los fibroblastos mutantes $Cat^{-/-}$ tuvieron una aparentemente mayor proliferación celular que los silvestres $Cat^{+/+}$ en el cultivo de 500,000 células. Curvas de proliferación celular que muestran las a) duplicaciones poblacionales y b) la tasa de duplicación a lo largo del tiempo (días de cultivo). Los fibroblastos silvestres se congelaron siguiendo el protocolo correspondiente, por lo que su cultivo empezó en el P2 y el siguiente pase del experimento corresponde al P3. Los MEF mutantes no se congelaron por lo que empieza su cultivo en el pase 1 y el siguiente pase es el P2.

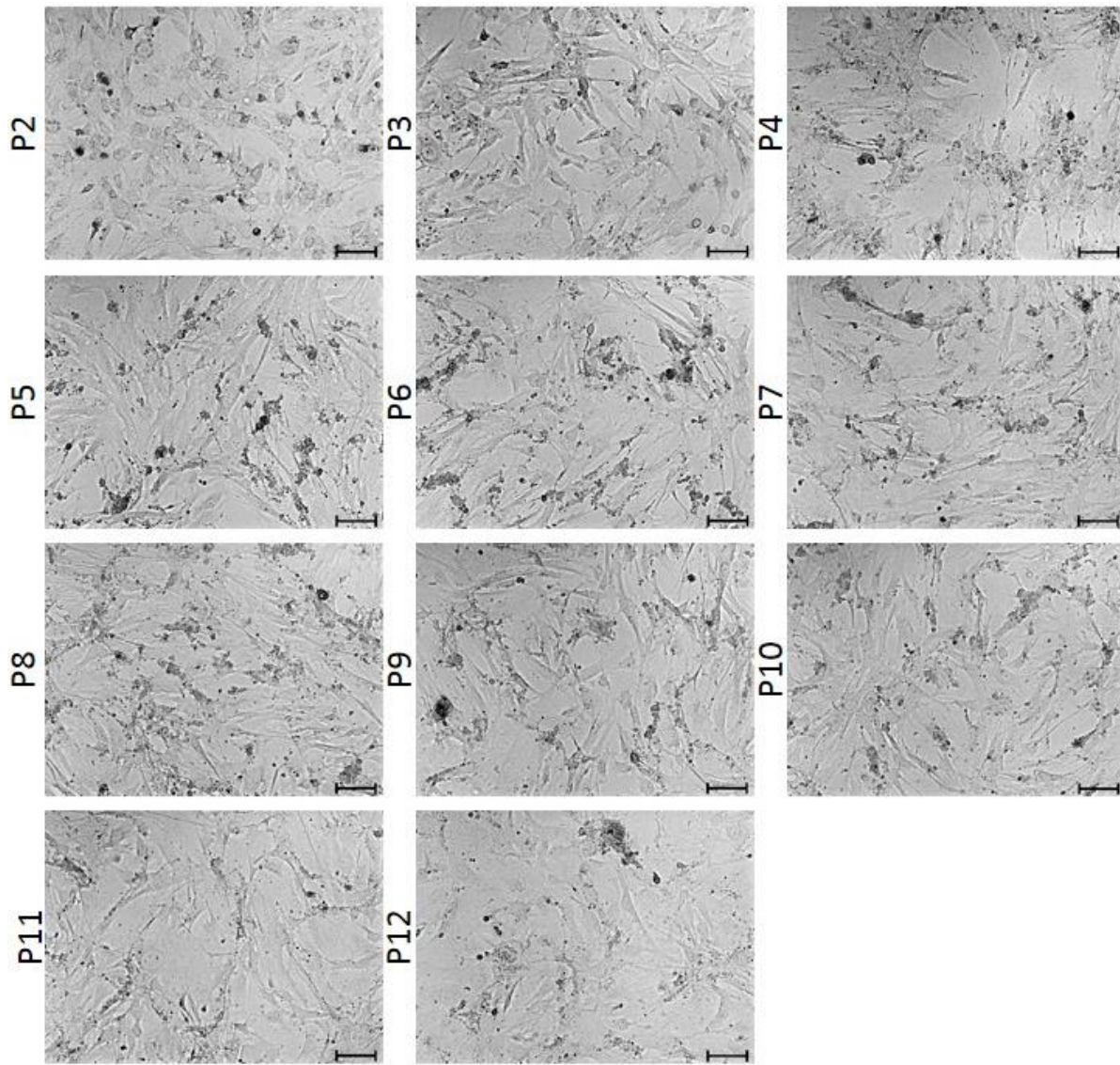


Fig. 7 | Morfología celular de los fibroblastos silvestres $Cat^{+/+}$ en el cultivo de 500,000 células en una caja de 21 cm^2 . Los fibroblastos tuvieron una morfología típica de una MEF proliferativo durante los primeros pases (P2-P5), pero tuvieron una baja capacidad proliferativa (ver Fig. 6). A partir del P6 se observó la acumulación de desechos celulares y la disminución en el número de células. Las células adquirieron una morfología aplanada y alargada. Las células se criopreservaron, se descongelaron en una caja de 57 cm^2 y posteriormente se sembraron 500,000 fibroblastos en una caja de 21 cm^2 (P2). La escala corresponde a 100 μm .

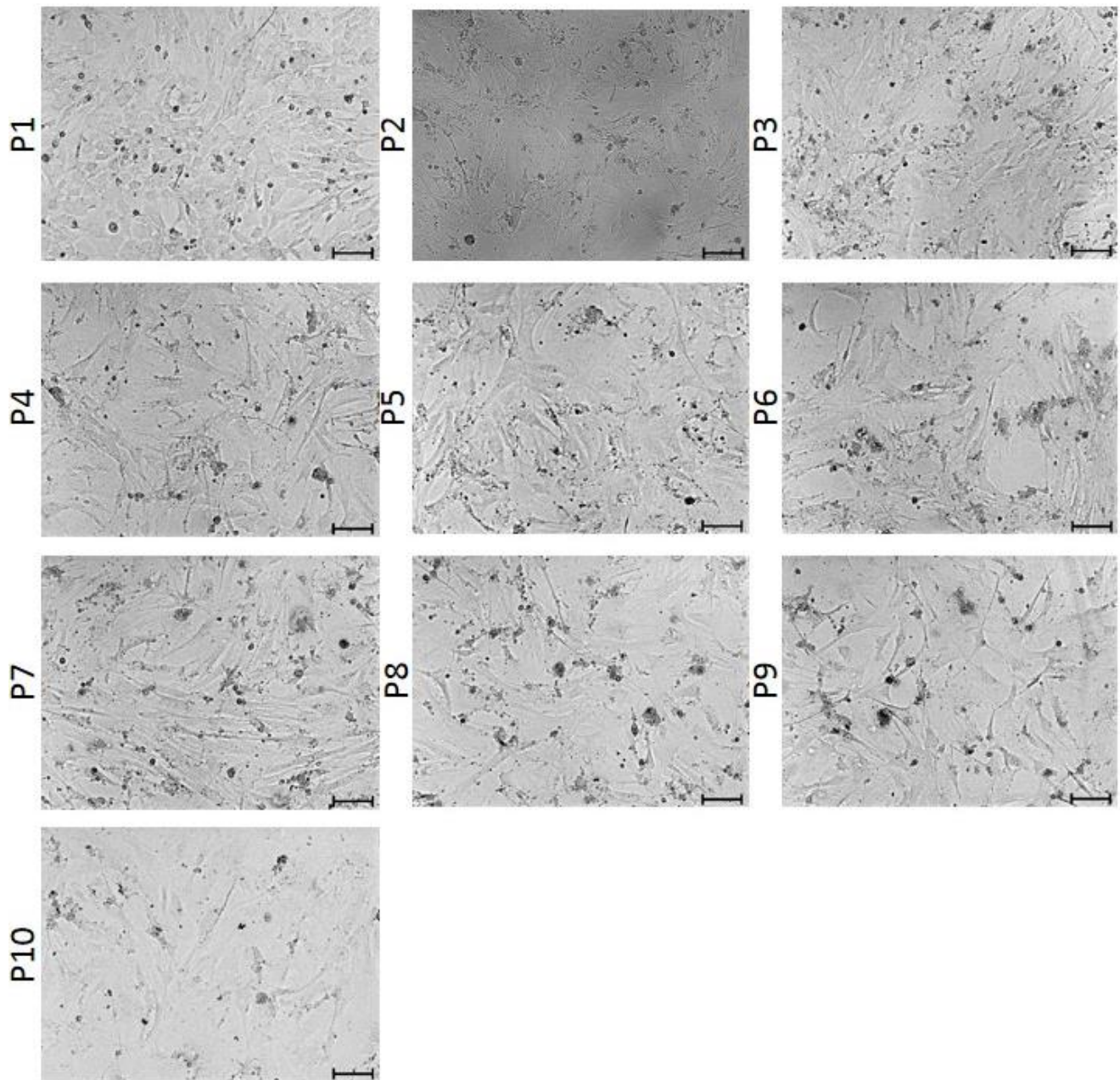


Fig. 8 | Morfología celular de los fibroblastos mutantes $Cat^{-/-}$ en el cultivo de 500,000 células en una caja de 21 cm^2 . Las células tuvieron una morfología típica de una MEF proliferativo durante los primeros pases (P1-P6), lo cual se relaciona con su capacidad proliferativa normal, aunque baja (ver Fig. 6). Desde el P7 al P9 se observa la acumulación de desechos celulares y la aparición de células aplanadas y alargadas. En el pase 10 (P10) la mayoría de las células presentaban una morfología aplanada y alargada. El P11 se realizó, pero las células no se sub-cultivaron sino que el cultivo se detuvo. Los fibroblastos no se congelaron por lo que, a partir del cultivo primario, se transfirieron 500,000 en una caja de 21 cm^2 (P1). La escala corresponde a 100 μm .

Por otra parte, los MEF silvestres y mutantes en el cultivo de 1,000,000 células en dos cajas de 21 cm² (500,000 en cada caja; 23,800 células/cm²) no presentan un patrón claro de proliferación (Fig. 9). Las células de ambos genotipos tuvieron una baja tasa de duplicación ($f < 0.4$) por lo menos hasta los 35 días de cultivo, pero los fibroblastos mutantes alcanzaron un mayor número de duplicaciones poblacionales en este período de tiempo (1.5 DP Cat^{+/+} vs 3.4 DP Cat^{-/-}). Para el caso de los MEF Cat^{-/-} la duplicación se mantuvo baja hasta el final del sub-cultivo (48 días) cuando las células tuvieron una morfología alargada y aplanada (Fig. 11). Interesantemente, en los pases 14 y 15 un gran número de células en el cultivo mostraron estructuras de diferentes tamaños en el citoplasma (ver magnificaciones en Fig. V en Apéndice 1). No fue posible determinar su naturaleza, se les denominó “estructuras vesiculares”. En cambio, posteriormente a los 35 días la población celular Cat^{+/+} estuvo constituida por células con una morfología proliferativa similar a los fibroblastos de pases tempranos (Fig. 10). Esto coincidió con el aumento significativo en la tasa de duplicación ($f > 0.8$) que se mantuvo hasta el final del experimento, lo que indica que las células probablemente se inmortalizaron de manera similar a lo que sucedió a los MEF Cat^{-/-} descongelados anteriormente descritos.

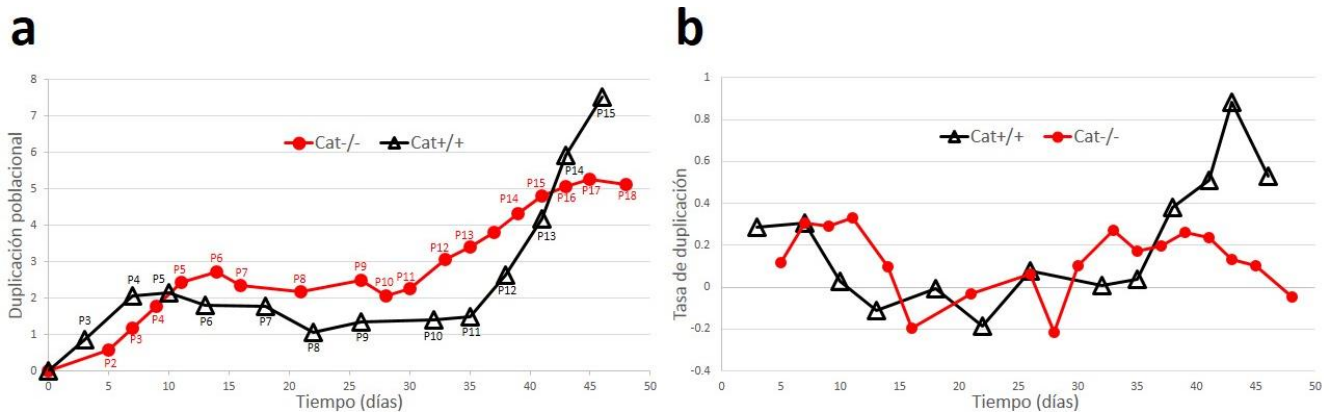


Fig. 9 | La proliferación de 1,000,000 fibroblastos silvestres Cat^{+/+} y mutantes Cat^{-/-} en dos cajas de 21 cm² no muestra diferencias. Curvas de proliferación celular que muestran las a) duplicaciones poblacionales y b) la tasa de duplicación a lo largo del tiempo (días de cultivo). Se sembraron 1,000,000 células en dos cajas de 21 cm² (500,000 células/caja) y se sub-cultivaron hasta que dejaron de proliferar y adquirieron un fenotipo alargado y aplanado. Los fibroblastos silvestres se congelaron siguiendo el protocolo correspondiente, por lo que su cultivo empezó en el P2 y el siguiente pase del experimento corresponde al P3. Los MEF mutantes no se congelaron por lo que empieza su cultivo en el pase 1 y el siguiente pase es el P2.

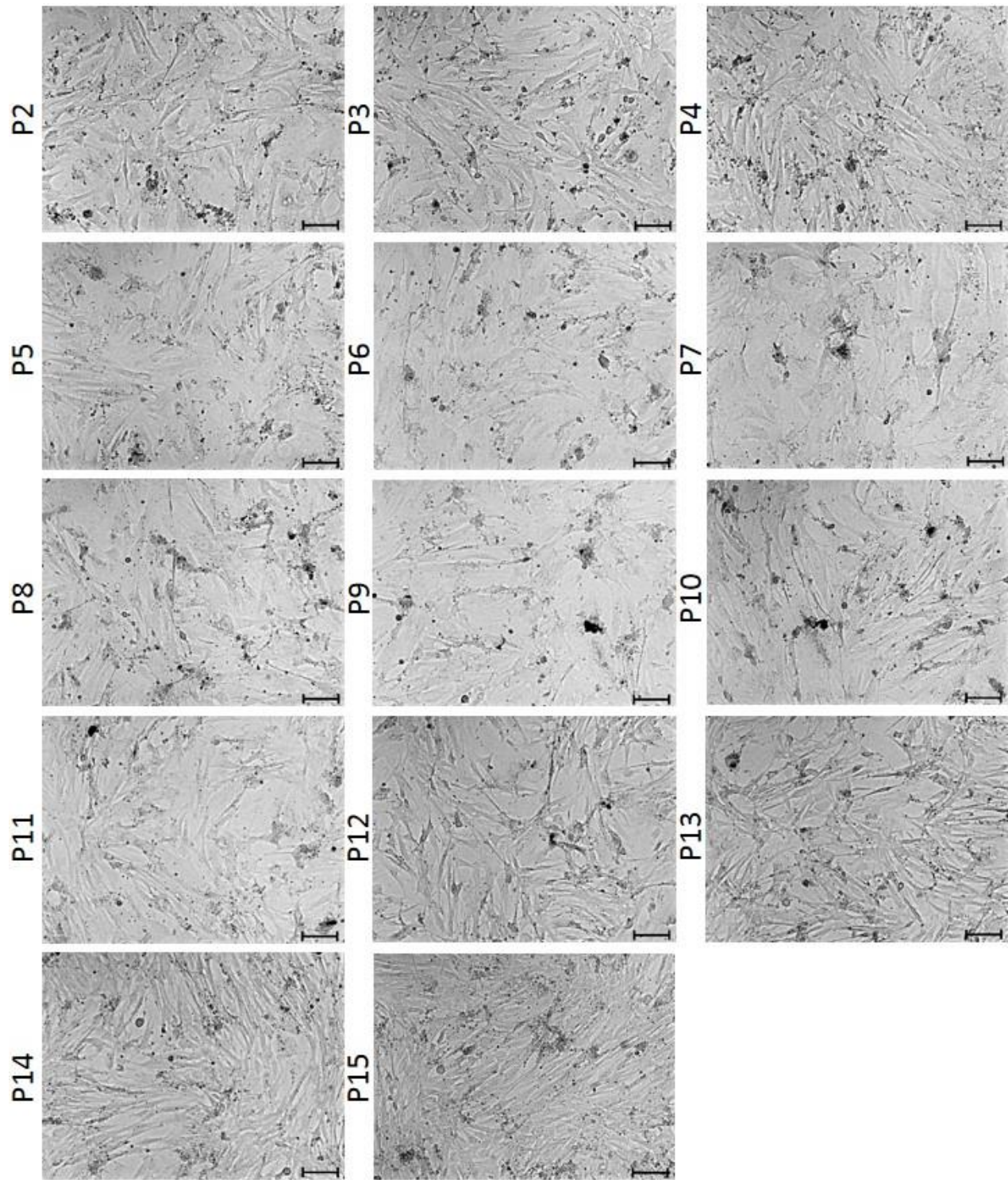


Fig. 10| Morfología celular de los fibroblastos silvestres $Cat^{+/+}$ en el cultivo de 1,000,000 células en dos cajas de 21 cm^2 . Las células tuvieron una morfología típica de una MEF proliferativo hasta el pase 5 (P5), pero posteriormente empezaron a adquirir una morfología aplanada y alargada (P6-P11). Después de 35 días de cultivo, en el P11 la población celular adquirió una morfología normal de célula proliferativa, lo cual se coincidió con el aumento en la proliferación en el P12. Las células se criopreservaron, se descongelaron en una caja de 57 cm^2 y posteriormente se sembraron 1,000,000 fibroblastos silvestres en dos cajas de 21 cm^2 (P2). La escala corresponde a 100 μm .

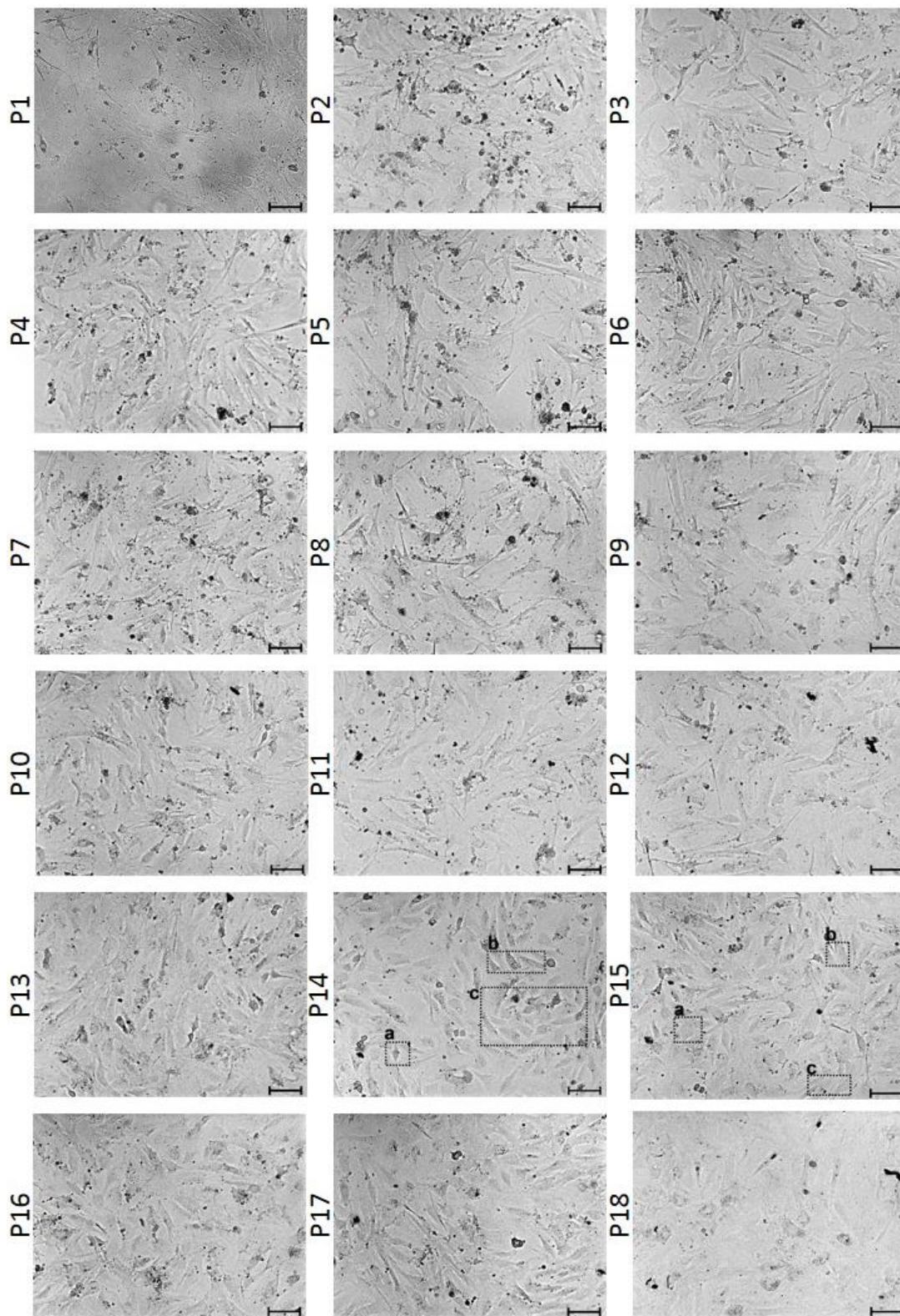


Fig. 11 | Morfología celular de los fibroblastos mutantes $Cat^{-/-}$ en el cultivo de 1,000,000 células en dos cajas de 21 cm^2 . Los fibroblastos tuvieron una morfología típica de una MEF proliferativo en los primeros pases (P2-P6). A partir del P7 se observó una gran acumulación de desechos celulares y las células empezaron a adquirir una morfología aplanada y alargada. Sin embargo, los fibroblastos proliferaron entre los P12-P17. En el pase 18 las células adquirieron completamente una morfología aplanada y alargada, cubriendo completamente la superficie de cultivo, por lo que el pase 19 se realizó, pero las células no se sub-cultivaron. Interesantemente, en los pases 14 y 15 las células presentaron “estructuras vesiculares” en el citoplasma (ver magnificaciones en Fig. V en Apéndice 1). Estas células no se congelaron, por lo que a partir del cultivo primario se transfirieron 1,000,000 células en dos cajas de 21 cm^2 (P1) y se sub-cultivaron hasta que dejaron de dividirse. La escala corresponde a 100 μm .

Finalmente, en el cultivo de 900,000 fibroblastos en tres cajas de 21 cm² (300,000 en cada caja; 13,900 células/cm²), las células silvestres Cat^{+/+} y mutante Cat^{-/-} tuvieron una baja capacidad proliferativa ($f < 0.5$) hasta el final del ensayo. No obstante, los fibroblastos mutantes superaron las 10 duplicaciones poblacionales, pero los silvestres solo alcanzaron 6 duplicaciones (Fig. 12). El cultivo de Cat^{+/+} en el P14 se mantuvo por 7 días (tasa de duplicación = 0), período durante el cual la mayoría de las células adoptaron un fenotipo alargado y aplanado, cubriendo completamente el área de la caja, por lo que en el P15 no se sembraron las células (Fig. 13). En el cultivo de células Cat^{-/-} durante el pase 12 se observó un gran número de células presentaron “estructuras vesiculares” en el citoplasma (Fig. 14; ver magnificaciones en Fig. VI en Apéndice 1), similarmente a las observadas en los fibroblastos mutantes Cat^{-/-} anteriormente mencionados. En resumen, el ensayo de proliferación de 900,000 células en tres cajas de 21 cm² confirma que no hay diferencias en la capacidad proliferativa entre ambos genotipos de fibroblastos (Fig. 12).

En conclusión, los resultados de los tres diferentes ensayos de proliferación a diferentes densidades celulares sugieren que no hay diferencias entre los fibroblastos silvestres Cat^{+/+} y mutantes Cat^{-/-} respecto a su capacidad proliferativa e inmortalización. No obstante, hay una ligera tendencia de las células mutantes Cat^{-/-} a tener mayor capacidad proliferativa.

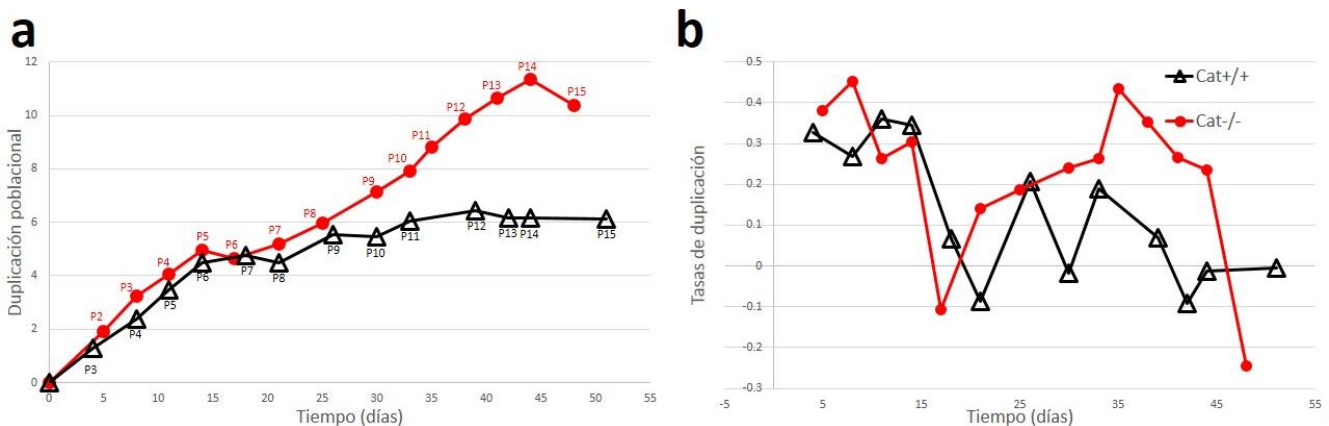


Fig. 12 | La proliferación de 900,000 fibroblastos silvestres Cat^{+/+} y mutantes Cat^{-/-} en tres cajas de 21 cm² no muestra diferencias. Curvas de proliferación celular que muestran las **a)** duplicaciones poblacionales y **b)** la tasa de duplicación a lo largo del tiempo (días de cultivo). Se sembraron 900,000 células en tres cajas de 21 cm² (300,000 células/caja) y se sub-cultivaron hasta que dejaron de proliferar y adquirieron un fenotipo alargado y aplanado. Los fibroblastos silvestres se congelaron siguiendo el protocolo de obtención, por lo que su cultivo empezó en el P2 y el siguiente pase del experimento corresponde al P3. Los MEF mutantes no se congelaron por lo que empieza su cultivo en el pase 1 y el siguiente pase es el P2.

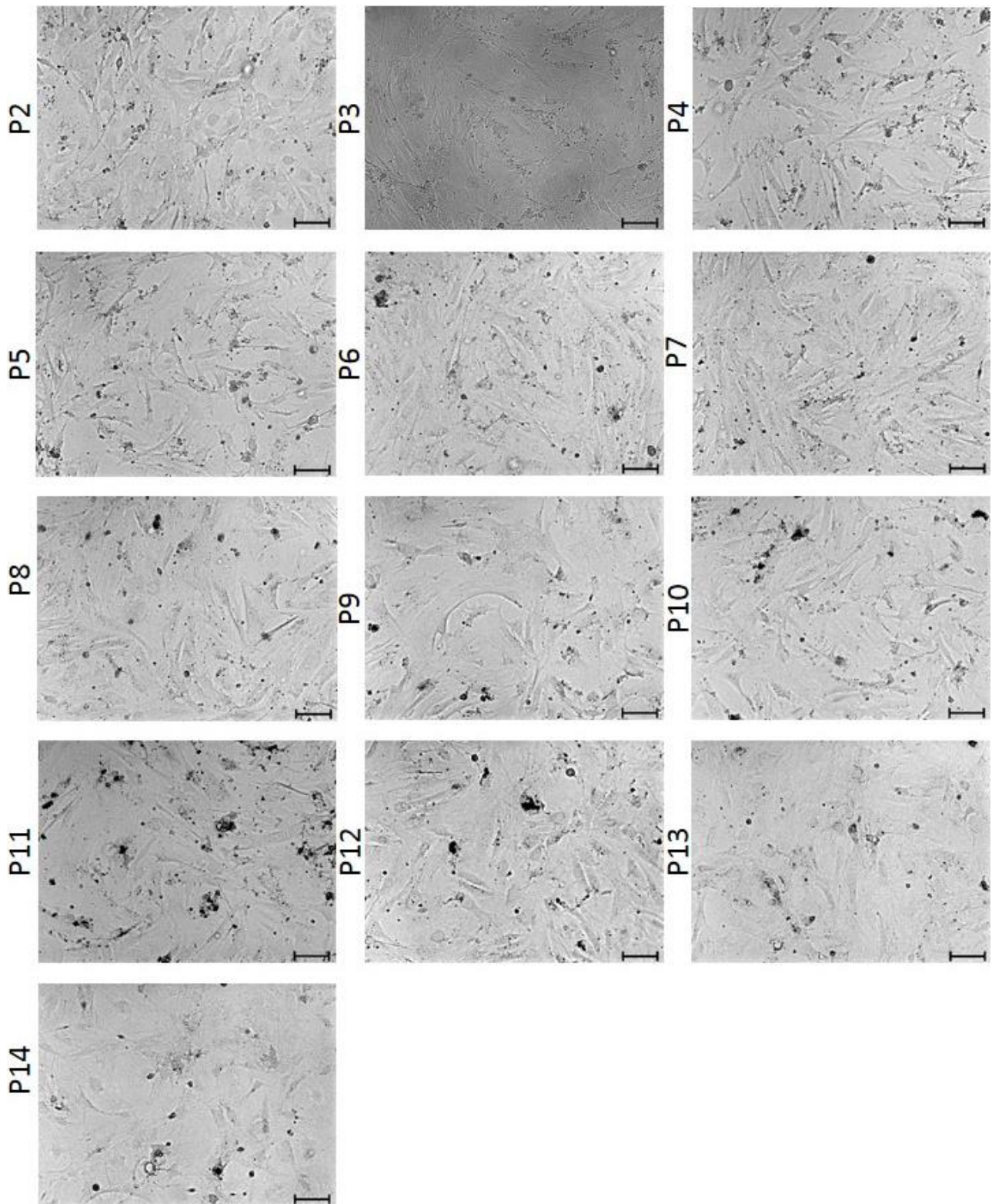


Fig. 13 | Morfología celular de los fibroblastos silvestres $Cat^{+/+}$ en el cultivo de 900,000 células en tres cajas de 21 cm^2 . Los fibroblastos mantienen un fenotipo normal proliferativo en los primeros pases (P2-P6). En el P7 las células empiezan a adquirir la morfología alargada y aplanada. En el P14 se observa que la mayoría de las células son alargadas y aplanadas que cubren completamente la superficie celular. Las células se congelaron, se descongelaron en una caja de 57 cm^2 para expansión y se sembraron en 9000,000 fibroblastos silvestres en tres cajas de 21 cm^2 (P2). La escala corresponde a 100 μm .

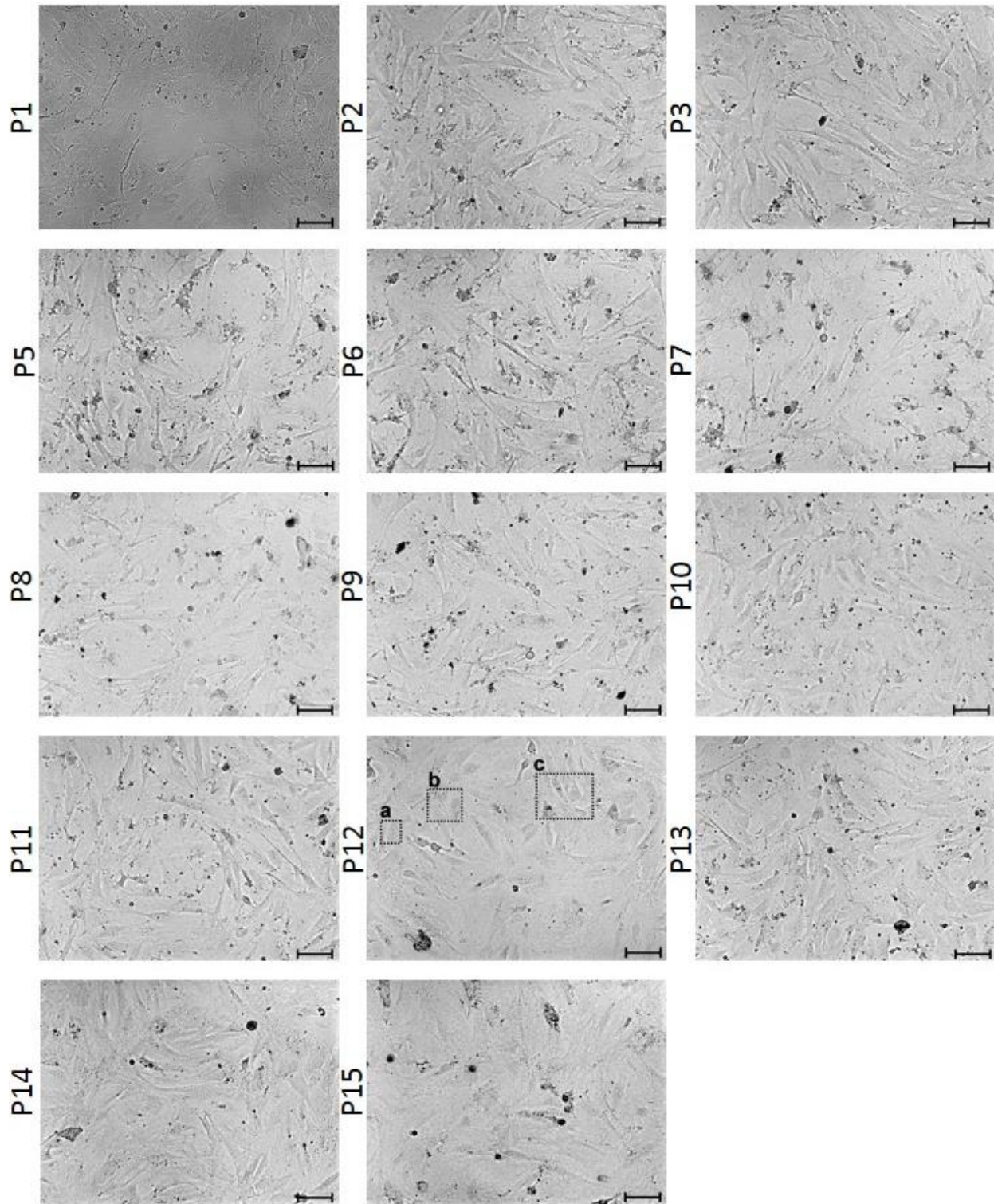


Fig. 14 | Morfología celular de los fibroblastos mutantes $Cat^{-/-}$ en el cultivo de 900,000 células en tres cajas de 21 cm^2 . Los fibroblastos presentaron una morfología normal proliferativa entre los primeros 5 pases. En los pases P5-P7 se observa la acumulación de desechos celulares. A partir del P8 se observó la aparición gradual de células aplanadas y alargadas. En el P15 estas células cubrieron completamente la superficie de cultivo, por lo que el cultivo se desechó. Interesantemente, las células en el P12 mostraron estructuras vesiculares en el citoplasma (Ver magnificaciones en Fig. VI en Apéndice 1). Estas células no se congelaron, por lo que a partir del cultivo primario se transfirieron 900,000 células en dos cajas de 21 cm^2 (P1) y se sub-cultivaron hasta que dejaron de dividirse. La escala corresponde a 100 μm .

2. Las isoformas de catalasa peroxisomal (Cat^p -SKL) y citosólica (Cat^c - Δ KANL) mostraron actividad y se localizaron en el peroxisoma y citosol, respectivamente.

El gen de humano de la catalasa se obtuvo del vector pCat^c-Neo previamente construido en el laboratorio (Hernández-García *et al.*, 2008). Este gen tiene sustituida la secuencia que codifica para la señal PTS1 no canónica (lisina, alanina, asparagina y leucina; KANL) por un codón de paro, por lo que codifica para la enzima con localización citosólica (denominada Cat^c- Δ KANL). Por PCR se clonó el gen *Cat^c* y se ligó al vector pBluescript II KS+ (PKS+) para generar el vector PKS-Cat^c (ver Fig. VII en Apéndice 2). Al gen *Cat^c* se le añadió por PCR la secuencia de nucleótidos que codifica para la señal PST1 canónica y se creó el gen *Cat^p*, el cual se ligó al vector PKS+ para generar el vector PKS-Cat^p. Este gen codifica para la isoforma artificial de catalasa peroxisomal con los aminoácidos serina, leucina y lisina (SKL) en el extremo carboxilo terminal (denominada Cat^p-SKL).

Por un análisis de restricción con la enzima EcoRI (Fig. 15) se corroboró la ligación de los genes de catalasa en los vectores PKS-Cat. Los vectores PKS-Cat^c y PKS-Cat^p se secuenciaron por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, del Instituto de Biotecnología, UNAM. Las secuencias del cromatograma se alinearon con el gen de la catalasa humana. Se demostró que: 1) los genes clonados no presentaron alteraciones en la secuencia de nucleótidos; 2) la isoforma Cat^c- Δ KANL citosólica no presenta la secuencia que codifica para PTS1 no canónica; 3) la isoforma Cat^p-SKL peroxisomal tiene la secuencia para los aminoácidos SKL (Fig. 16).

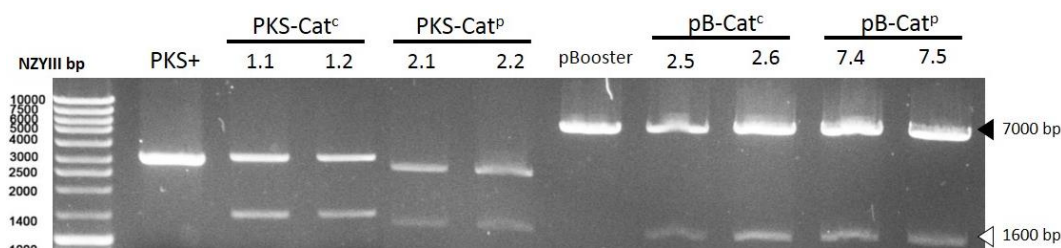


Fig. 15 | Análisis de restricción de vectores con las isoformas de catalasa. Los vectores PKS-Cat^c, PKS-Cat^p, PB-Cat^c y PB-Cat^p se cortaron con la enzima EcoRI y se observó una banda de \approx 1400 bp correspondiente al gen de la catalasa. Las bandas de \approx 3000 bp de los vectores PKS-Cat^c y PKS-Cat^p corresponden al vector PKS+ (\approx 3 kbp). Las bandas de \approx 7000 bp de pB-Cat^c y pB-Cat^p corresponden al vector pBooster (\approx 7100 bp). El número de clona aislada se observa en la parte superior.

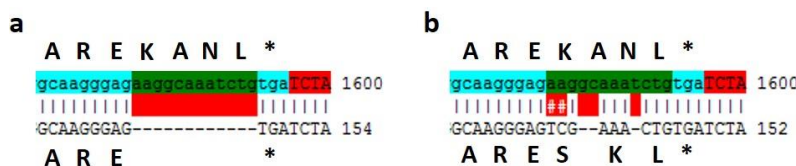


Fig. 16 | Alineamiento de las isoformas de catalasa con el gen de catalasa humana. El gen humano de la catalasa (NM_001752.4, NCBI) se alineó con la secuencia obtenida de los genes *Cat^c* (a) y *Cat^p* (b). La isoforma citosólica (Cat^c- Δ KANL) contiene las secuencias que codifican para los aminoácidos alanina, arginina y glutamato (ARE) y un codón de paro que sustituye a la secuencia KANL de la catalasa silvestre. La isoforma peroxisomal Cat^p-SKL tiene la secuencia de aminoácidos SKL de la señal PTS1 canónica. La secuencia del gen humano de la catalasa se representa por las letras minúsculas superiores y la secuenciación de los genes *Cat^c* y *Cat^p* se representa en letras mayúsculas inferiores. En verde se señala la secuencia que codifica para KANL. La secuenciación corresponde a las clonas 1.1 PKS-Cat^c y 2.1 PKS-Cat^p y fueron utilizadas para la generación de los vectores de expresión inducible pBooster.

Posteriormente, los genes *Cat^c* y *Cat^p* de los vectores PKS-Cat se sub-clonaron al vector pBooster para crear los vectores de expresión inducible PB-Cat^c y PB-Cat^p, respectivamente (Fig. 15). Brevemente, el vector de expresión inducible pBooster (ver mapa en Fig. VIII en Apéndice 2) es un transposón piggyBack constituido por: a) secuencias 5'LTR y 3'LTR que dirigen la inserción al genoma por parte de la transposasa; b) secuencias de la proteína fluorescente Venus y el transactivador reverso de tetraciclina (rtTA); c) promotor de la fosfoglicerato cinasa (PGK) que controla la expresión constitutiva de Venus-IRES-rtTA como un mRNA bicistrónico; d) el promotor mínimo de respuesta a tetraciclina (TRE) que permite la expresión del gen de interés cuando se une el rtTA. En este sistema de expresión Tet-On, al agregar doxiciclina (Dox) se forma el complejo rtTA-Dox que se une al promotor TRE y permite la expresión del gen de interés (Martínez-Sarmiento, 2016).

Los transposones de catalasa tienen las secuencias 3'LTR-TRE-Cat-PGK-Venus-IRES-rtTA-poli(A)-5'LTR. En condiciones basales, se expresa constitutivamente la proteína reportera Venus y el transactivador rtTA por el control del promotor PGK. En respuesta a doxiciclina, el transactivador se une al promotor TRE para inducir la expresión de un transcrito largo que contiene las secuencias Cat-PGK-Venus-IRES-rtTA-poli(A). Esta construcción permite la traducción de la catalasa y rtTA, generando un bucle de retroalimentación positiva que aumenta la expresión de rtTA y, por lo tanto, la expresión de la catalasa es mayor. Además, disminuye concomitantemente la traducción de la proteína fluorescente venus debido a que no se puede traducir la secuencia Venus por la carencia de un elemento IRES, sino solamente la catalasa y el rtTA.

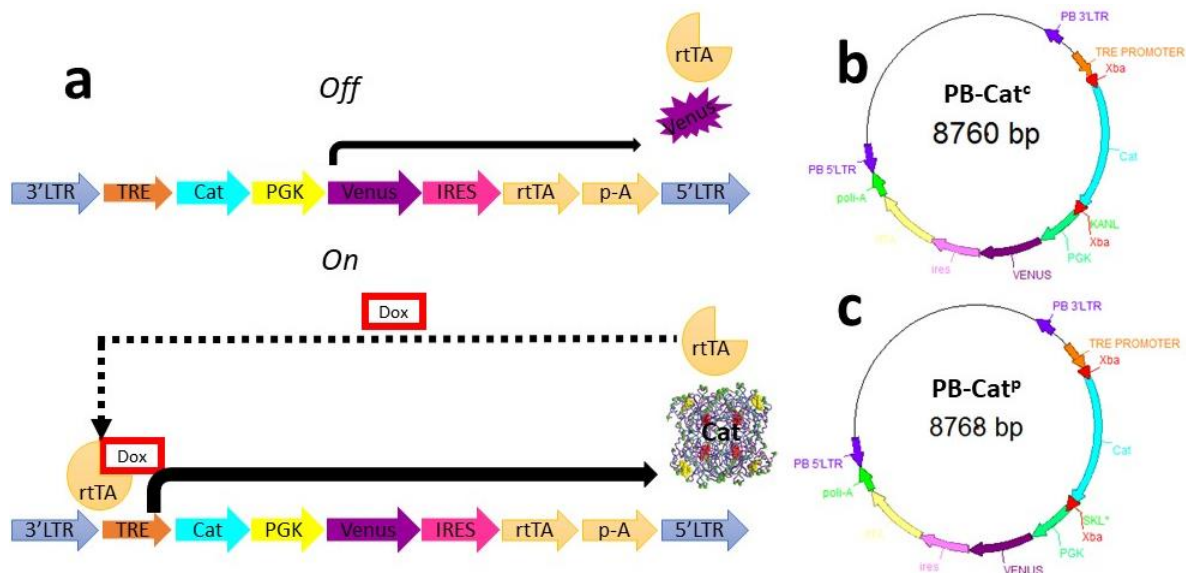


Fig. 17 | Vectores de expresión inducible PB-Cat^c y PB-Cat^p. a) El transposón pBooster es un sistema de expresión inducible Tet-On que expresa constitutivamente la proteína reportera Venus y el transactivador rtTA. Al adicionar Dox se forma el complejo rtTA-Dox que se une al promotor TRE para inducir la expresión del gen de la catalasa y del rtTA y, en consecuencia, disminuir la traducción de Venus. b) Vector PB-Cat^c que contiene el gen de la catalasa citosólica Cat-ΔKANL. c) Vector PB-Cat^p que contiene el gen de la catalasa peroxisomal Cat^p-SKL.

Los resultados previos de nuestro laboratorio indican que la ausencia de catalasa altera el metabolismo de lípidos en el hígado (Pérez-Estrada *et al.*, 2019). Con el objetivo de establecer un modelo *in vitro* para estudiar este mecanismo de regulación de la catalasa en el hígado, se intentó generar clonas de células HepG2 (células de carcinoma de hígado) con expresión de Cat^c-ΔKANL y Cat^p-SKL, una línea celular ampliamente utilizada para estudiar la acumulación de lípidos y que asemeja lo que sucede en los hepatocitos (Izdebska *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2014).

Para evaluar que se induce la expresión de las isoformas de catalasa en la línea HepG2, las células fueron transfectadas químicamente con los vectores PB-Cat^c y PB-Cat^p y se indujo la expresión con 150 ng y 1.5 μg Dox/por ml de medio durante 24 horas. Para comprobar que las enzimas tenían actividad, se realizó un ensayo de actividad enzimática (Weydert & Cullen, 2009). Se observó que las células HepG2 muestran una alta actividad de catalasa, lo cual es correspondiente a su origen hepático (Fig. 18). La actividad con 150 ng/ml Dox fue mayor que las células no inducidas. Al inducir la expresión de las isoformas con 1.5 μg/ml de Dox, la actividad de la catalasa aumentó significativamente (Fig. 18). Si se tienen en cuenta que la eficiencia de transfección fue baja (5.4% para la Cat^p-SKL= 5.4% y 14.16% para Cat^c-ΔKANL), cualitativamente el aumento en la actividad de catalasa es muy alta con ambas concentraciones de doxiciclina.

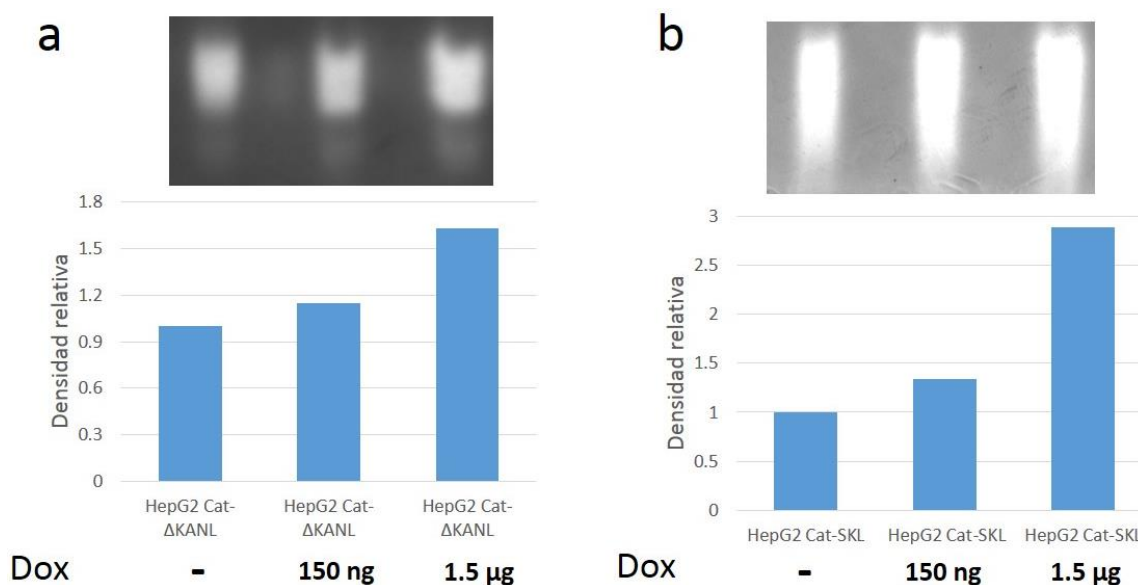


Fig. 18 | Actividad enzimática de catalasa citosólica y peroxisomal. Sin inducción con doxiciclina, las células HepG2 muestran gran actividad enzimática. La actividad de ambas isoformas fue mayor con 1.5 μg Dox por ml de medio. La Cat^p-SKL (b) tuvo mayor actividad que la Cat^c-ARE (b) en ambas concentraciones de Dox. Células HepG2 se transfectaron con los transposones PB-Cat^c y PB-Cat^p, se indujo la expresión con Dox y se realizaron geles de actividad. La transfección con Cat^c-ΔKANL tuvo una eficiencia 14.16%; la eficiencia de la Cat^p-SKL fue 5.4%. En todas las muestras se cargaron 50 μg de proteína.

La isoforma Cat^c-ΔKANL no tiene secuencia PTS1 por lo que se esperaría que se localizara en el citosol, mientras que la enzima Cat^p-SKL debería localizarse en el peroxisoma. Para corroborar que estas modificaciones

se tradujeron en una diferencia en la localización celular, se hicieron inmunofluorescencias contra la catalasa y PMP70, un marcador peroxisomal, en las células HepG2 disponibles. Las células HepG2 que expresan la catalasa- Δ KANL mostraron un patrón de localización citosólica (Fig. 19) y la señal de PMP70 se localizó en peroxisomas (Fig. 20). Esto corrobora que la enzima Cat^c - Δ KANL no se importa al peroxisoma debido a la escisión de la secuencia PTS1, sino que se localiza en el citosol según lo reportado por Hernández-García *et al.* (2008). Debido a la poca disponibilidad de anticuerpo anti-catalasa (donado generosamente por el Dr. Enrique Salas Vidal), no se pudo realizar una inmunocitoquímica contra la Cat^p -SKL en células HepG2. Si bien se pudo corroborar la localización subcelular de la catalasa citosólica y la actividad enzimática de ambas isoformas, no se pudo establecer líneas clonales de células HepG2 que tuvieran la expresión de las catalasas a pesar de haber realizado varios intentos (datos no mostrados).

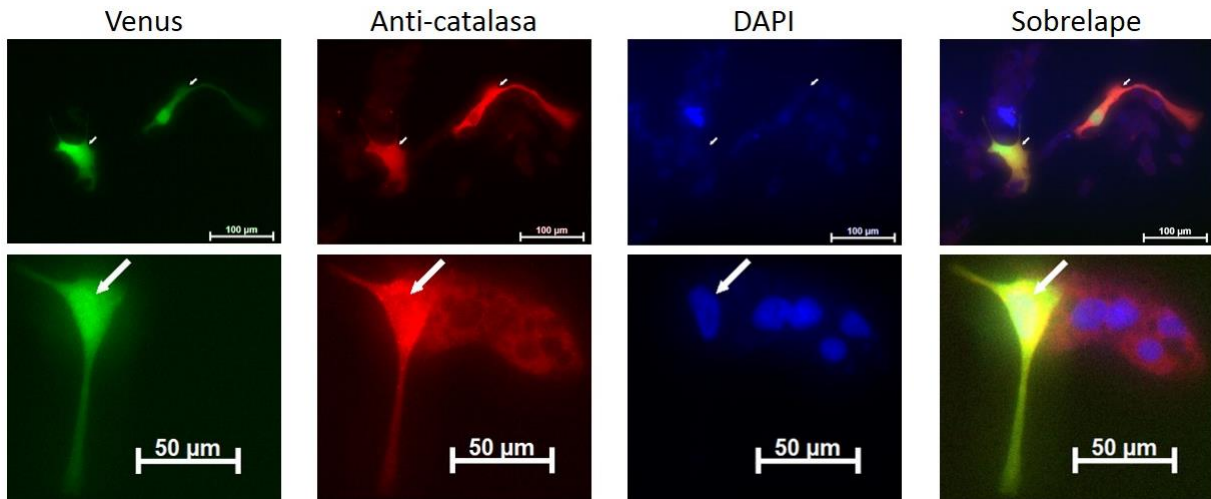


Fig. 19 | Localización citosólica de la catalasa Cat^c - Δ KANL en células HepG2. Se observa que las células Venus⁺ tuvieron mayor señal de catalasa en el citosol que las no transfectadas (no fluorescentes para la proteína reportera venus), las cuales mostraron inmunolocalización en estructuras puntuadas. Las células fueron tratadas con 1.5 μ g Dox por ml de medio durante 24 hr.

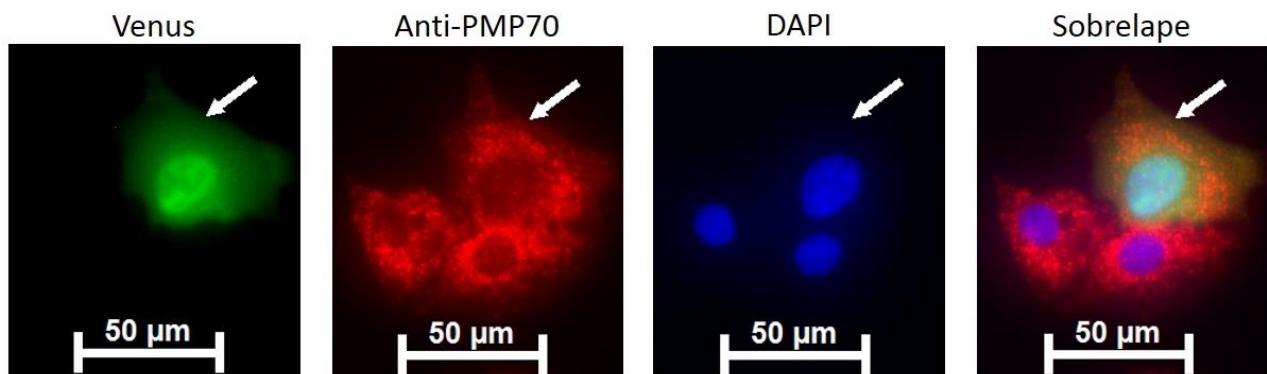


Fig. 20 | Localización peroxisomal de PMP70 en células HepG2 que expresa la isoforma citosólica Cat^c - Δ KANL. Se observa que la señal de PMP70 se localiza en pequeños puntos que corresponden a peroxisomas. Aparentemente no hay diferencia en el número y tamaño de peroxisomas entre células transfectadas y no transfectadas (no fluorescentes para la proteína reportera venus). Las células fueron tratadas con 1.5 μ g Dox por ml de medio durante 24 hr.

Debido a que un objetivo es probar si la expresión de catalasa afecta la proliferación de fibroblastos embrionarios de ratón, era necesario evaluar la localización celular de las isoformas en estas células. Por lo tanto, la expresión de la catalasa también se realizó en fibroblastos silvestres $Cat^{+/+}$. Como se ha comentado, no se pudieron realizar inmunofluorescencias contra la catalasa, pero se realizaron contra PMP70. No se observaron diferencias en el patrón o intensidad de la señal PMP70 entre las células que expresaron la isoforma citosólica Cat^c - Δ KANL y las células no transfectadas (no fluorescentes para la proteína reportera venus) (Fig. 21).

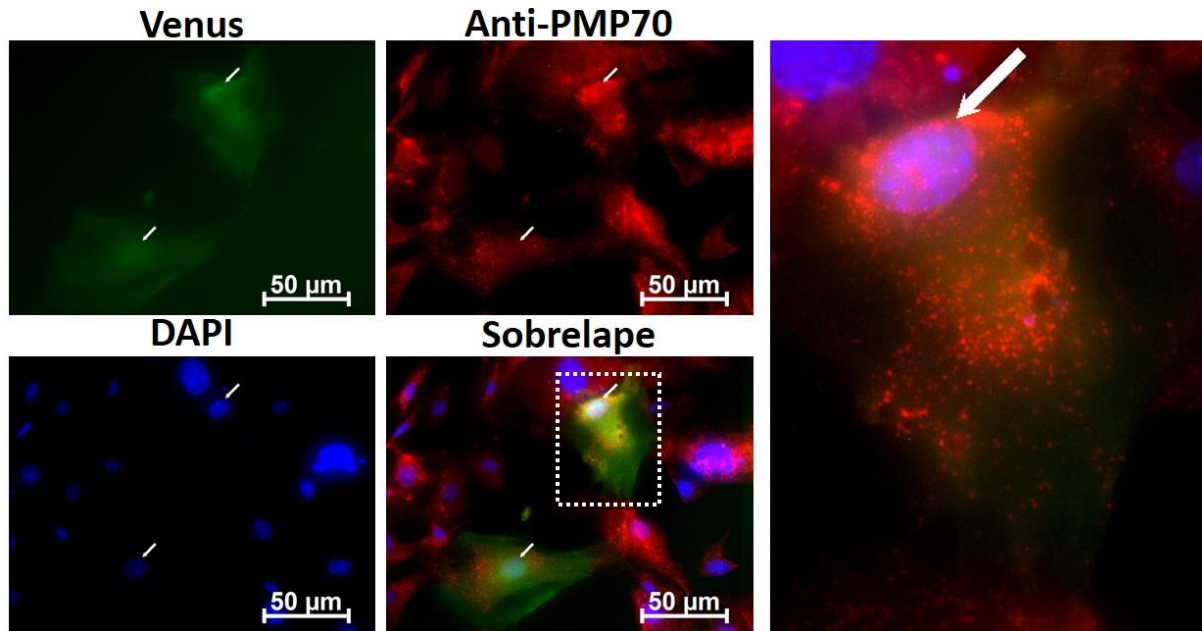


Fig. 21 | Localización peroxisomal de PMP70 en fibroblastos silvestres $Cat^{+/+}$ transfectados con catalasa citosólica Cat^c - Δ KANL. Los MEF que expresaron catalasa citosólica (fluorescentes para venus) no presentaron diferencias en el número y tamaño de peroxisomas (identificados con PMP70) respecto a las células sin la proteína fluorescente venus. La expresión de catalasa se indujo con 1.5 μ g Dox por ml de medio. Los fibroblastos son del pase 5 (P5). Las flechas blancas señalan las células fluorescentes Venus⁺. El cuadro puntuado corresponde a la magnificación.

Interesantemente, los MEF $Cat^{+/+}$ que expresaron la Cat^p -SKL peroxisomal mostraron mayor intensidad de señal PMP70 (Fig. 22) respecto a las células no transfectadas negativas para venus, lo cual es resultado de un aumento en el número y tamaño de peroxisomas. En función de que esta isoforma parece tener efectos celulares debido a su secuencia SKL, esta isoforma parece ser reconocida e importada a la matriz peroxisomal por el sistema PTS1. Otros estudios que modificaron la catalasa con la secuencia SKL han observado su inmunolocalización en los peroxisomas en fibroblastos humanos y células HeLa (Dubreuil *et al.*, 2020; Koepke *et al.*, 2007). Por lo tanto, aunque no se pudo identificar la localización sub-celular de la catalasa peroxisomal, se continuó trabajando con la construcción PB- Cat^p para realizar los experimentos de proliferación.

En conclusión, los transposones PB- Cat^c y PB- Cat^p expresan las isoformas Cat^c - Δ KANL y Cat^p -SKL, respectivamente, cuando se induce su expresión con doxiciclina (150 ng/ml y 1.5 μ g/ml) en células HepG2 y MEF.

Ambas proteínas muestran actividad con la inducción con doxiciclina. La catalasa- Δ KANL se localiza en el citosol, mientras que la catalasa-SKL se localiza en el peroxisoma. Ésta última isoforma parece inducir un aumento en el número y tamaño de los peroxisomas de acuerdo con lo observado por el aumento en la señal de PMP70.

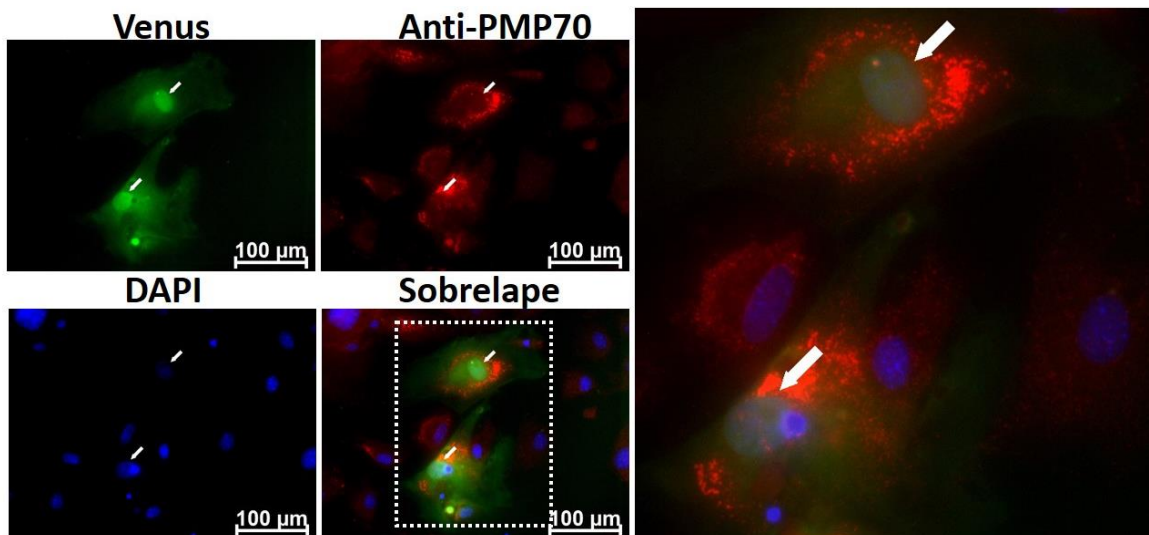


Fig. 22 | Localización peroxisomal de PMP70 en fibroblastos $Cat^{+/+}$ transfectados con catalasa peroxisomal Cat^P -SKL. Los MEF que expresan venus tuvieron mayor intensidad de la señal de PMP70, lo cual se debe a un aumento en el tamaño y número de peroxisomas, que las células que no expresan la proteína venus. La expresión de catalasa se indujo con 1.5 μ g Dox por ml de medio. Las células son del pase 5 (P5). Las flechas blancas señalan las células Venus⁺. El cuadro puntuado corresponde a la magnificación.

3. La sobreexpresión de catalasa aumenta la proliferación de MEF silvestres $Cat^{+/+}$.

Para evaluar el efecto de la expresión de catalasa sobre la capacidad proliferativa de células primarias, se electroporaron fibroblastos silvestres $Cat^{+/+}$ con los vectores PB-Cat^c o PB-Cat^p y el vector que contiene la transposasa (PB-CAG-Hyper) para transfectar establemente los transposones. Cuando las células se recuperaron y empezaron a proliferar (en una caja de 9 cm²; P2), se sembraron 500,000 fibroblastos en cajas de 21 cm² (P3) y se sub-cultivaron hasta que dejaron de proliferar y adquirieron una morfología aplanada o alargada (Fig. 23).

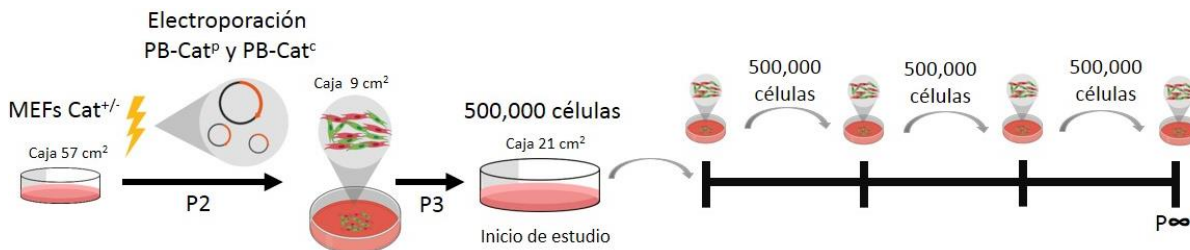


Fig. 23 | Estrategia experimental para la sobreexpresión de catalasa peroxisomal Cat^P -SKL y citosólica Cat^c - Δ KANL en fibroblastos silvestres $Cat^{+/+}$. Los MEF silvestres se descongelaron en una caja de 10 para permitir su proliferación, se electroporaron con los vectores de catalasa PB-Cat^c y PB-Cat^p y se sembraron en una caja de 9 cm² (P2) para permitir su recuperación, según el protocolo de electroporación. La eficiencia de electroporación de PB-Cat^c y PB-Cat^p fue 25% y 13%, respectivamente. Para empezar el estudio de proliferación celular, se sembraron 500,000 (P3) en una caja de 21 cm² y se incubaron hasta sub-confluencia (70-80% confluencia) para

realizar el pase celular. Esto se llevó a cabo hasta que las células dejaron de dividirse y mostraron un fenotipo alargado y aplanado. La expresión de catalasa se indujo con 1.5 µg de doxiciclina por ml de medio durante todo el tiempo de cultivo.

Para el caso de las células con la expresión de Cat^c-ΔKANL, la tasa de proliferación fue constante ($f > 0.5$) hasta los 40 días de cultivo, lo que se vio reflejado en las duplicaciones poblacionales (>10 duplicaciones poblacionales). Si bien posteriormente disminuyó su capacidad proliferativa ($f=0.3$), las células con morfología alargada y aplanada fueron escasas en este mismo período de tiempo (Fig. 25). Este fenómeno posiblemente se debe a que las células no transfectadas se volvieron senescentes, por lo que el cultivo quedó constituido por fibroblastos que expresaron la catalasa citosólica. Posteriormente, la mayoría de las células presentaban una morfología normal, típica de un fibroblasto en proliferación, la cual se relaciona con el aumento de su capacidad proliferativa ($f= 0.6$) (ver detalladamente en Fig. IX en Apéndice 3). Al día 60 de cultivo, las células nuevamente empezaron a adquirir una morfología alargada y aplanada, pero se mantuvieron proliferando lentamente hasta el pase 24 ($f= 0.2$). Al al día 73 la población celular estaba completamente constituido por células que presentaban una morfología aplanada y alargada, típica de fibroblastos senescentes (Fig. 24). Interesantemente, al tiempo que disminuyó la proliferación, surgió un gran número de células que contenían “estructuras vesiculares” en el citoplasma (ver magnificaciones en Fig. XI de Apéndice 3), También se encontraron células con dichas estructuras en pases anteriores (P13, P14, y P15) pero fueron escasas (ver magnificaciones en Fig. XI en Apéndice 3).

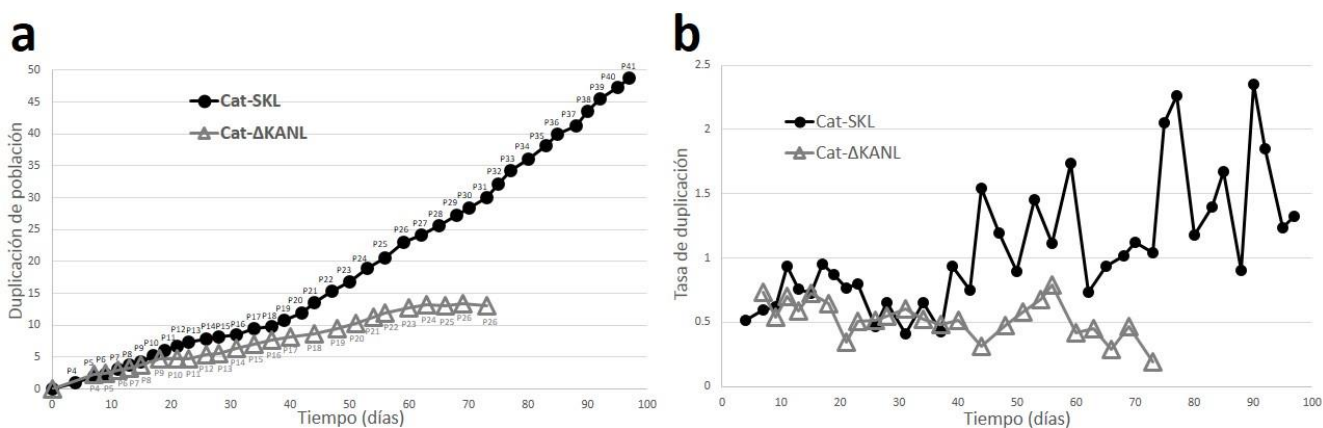


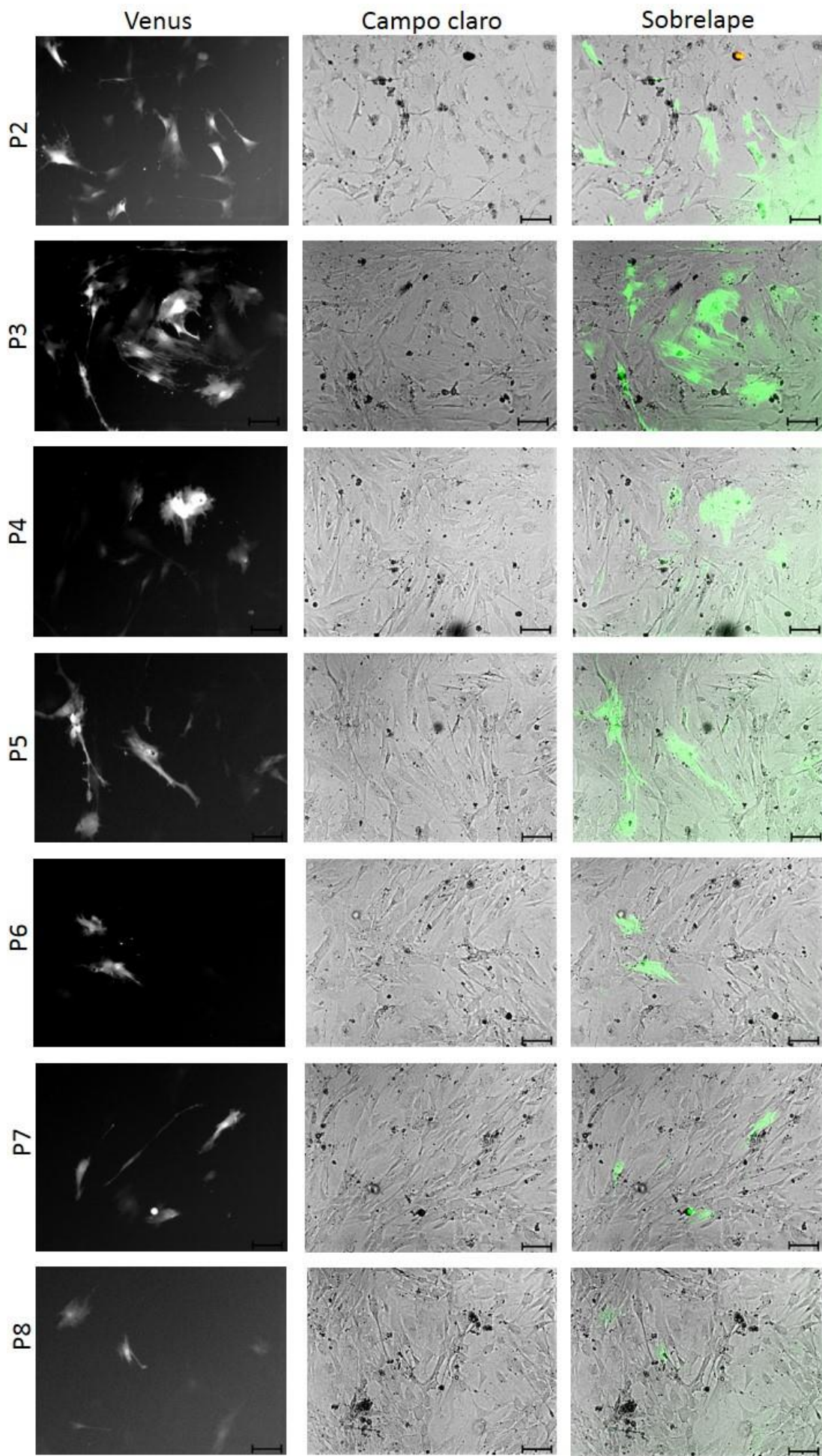
Fig. 24 | Sobreexpresión de la isoforma de catalasa peroxisomal Cat^p-SKL y citosólica Cat^c-ΔKANL promueve la proliferación celular de silvestres Cat^{+/+}. Las células transfectadas con la catalasa-ΔKANL alcanzaron las 13 duplicaciones poblacionales a los 73 días de cultivo. Su proliferación fue constante a lo largo del experimento con una tasa de duplicación > 0.5 hasta el pase 22. Las células que expresaron catalasa-SKL proliferaron constantemente a lo largo de todo el experimento, por lo que probablemente se immortalizaron. El cultivo se detuvo en el pase 41 (97 días de cultivo; $f= 1.3$) y superó las 48 duplicaciones poblacionales. Los fibroblastos Cat^p se dividieron más rápidamente que los Cat^c. Se sembraron 500,000 células en una caja de 21 cm² y se sub-cultivaron.

Las células que expresaron Cat^p-SKL tuvieron una tasa de duplicación ligeramente mayor ($f = 0.5-0.95$) que las células que expresaron la isoforma citosólica de catalasa a los 37 días de cultivo, lo cual se ve reflejado en un aumento en las duplicaciones poblacionales (9.79 duplicaciones Cat^p-SKL vs 7.58 duplicaciones Cat^c-

Δ KANL). Posteriormente, aumentó su tasa de duplicación ($f > 0.9$) por lo que en cada pase el número de células incrementaba por más de dos duplicaciones poblacionales (ver detalladamente en Fig. X de Apéndice 3). Lo anterior se relaciona con su morfología celular de fibroblasto proliferativo sin evidencias de células alargadas y aplanadas (Ver Fig. 26). Posiblemente, las células no transfectadas senescieron gradualmente a lo largo del subcultivo y la alta capacidad de proliferación de las células transfectadas evitó observarlas. En función de que las células probablemente se inmortalizaron, como es común en MEF, se decidió congelar las células al día 95 y posteriormente se descongelaron. Las células descongeladas mostraron un fenotipo normal y capacidad proliferativa similar a los pases anteriores ($f = 1.32$), lo cual puede confirmar que adquirieron potencial replicativo ilimitado. Interesantemente, en los pases 15, 25 y 30 también se presentaron células con “estructuras vesiculares” pero fueron escasas (ver magnificaciones en Fig. XII en Apéndice 3).

En resultados previos de nuestro laboratorio indican que la ausencia de catalasa altera el metabolismo de lípidos en el hígado (Pérez-Estrada *et al.*, 2019). Con los objetivos de estudiar las alteraciones metabólicas que producen la pérdida o sobreexpresión de catalasa y para tener un modelo experimental *in vitro*, se estableció un protocolo para medir la acumulación de lípidos en fibroblastos. Debido a la disponibilidad de fibroblastos transfectados con la isoforma de catalasa peroxisomal Cat^P-SKL, el protocolo se estableció sobre estas células. Los MEF fueron incubados con ácido palmítico conjugado con BSA (250 μ M, 500 μ M y 1 mM) por 24 hr y se hizo una tinción con rojo oleoso. Las células acumularon una gran cantidad de grasas con 1 mM de ácido palmítico, la acumulación fue menor con 500 μ M y no hubo diferencias evidentes con 250 μ M y en comparación al control (ver Fig. XIII en Apéndice 3). Estos resultados, aunque interesantes deben considerarse exploratorios.

En conclusión, la expresión de ambas isoformas de catalasa aumentó la capacidad proliferativa de los fibroblastos Cat^{+/+} (Fig. 21). Las células Cat^{+/+} que expresaron las isoformas de catalasa tuvieron mayor capacidad proliferativa ($f > 0.5$) y más número de duplicaciones poblacionales (>10 duplicaciones) que las células Cat^{+/+} y Cat^{-/-} cultivadas en las condiciones anteriores. El cultivo con la expresión de catalasa citosólica proliferó hasta alcanzar 13.4 duplicaciones poblacionales al P26 (69 días), mientras que el cultivo que expresó la isoforma peroxisomal se detuvo a las 48.7 duplicaciones poblacionales al P41 (97 días). Por el momento la comparación es contra las células Cat^{+/+} sin transfectar (ver Fig. XI y XII en Apéndice 3) pero será más correcto usar como control los mismos fibroblastos transfectados, pero sin inducir la expresión de las isoformas de catalasa porque puede que los sitios de integración del transposón en el genoma afecten genes que regulen la proliferación celular y por lo tanto el efecto observado puede no deberse a la sobre-expresión de la catalasa, sino a la alteración de otras vías que promueven la proliferación.



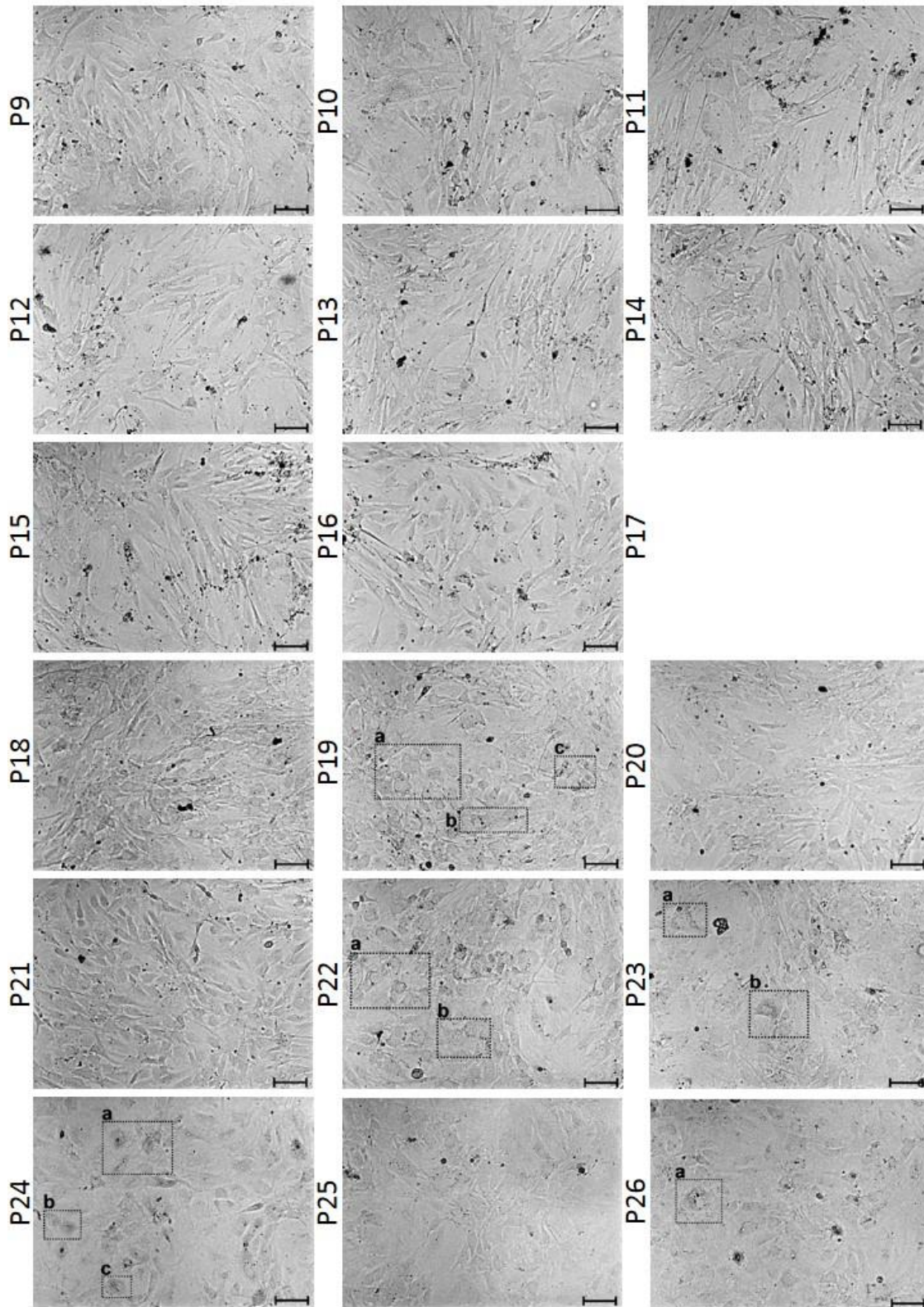
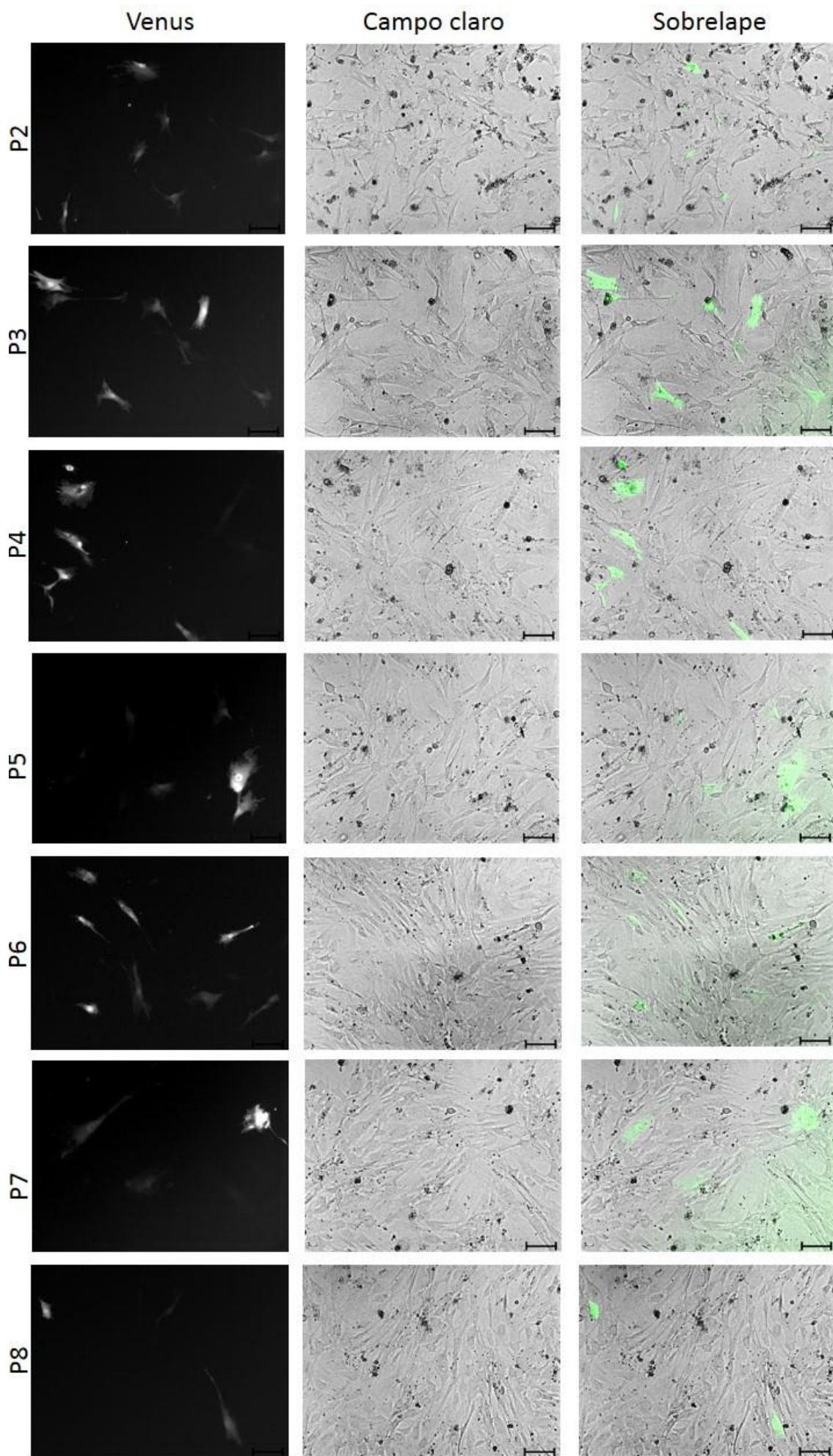
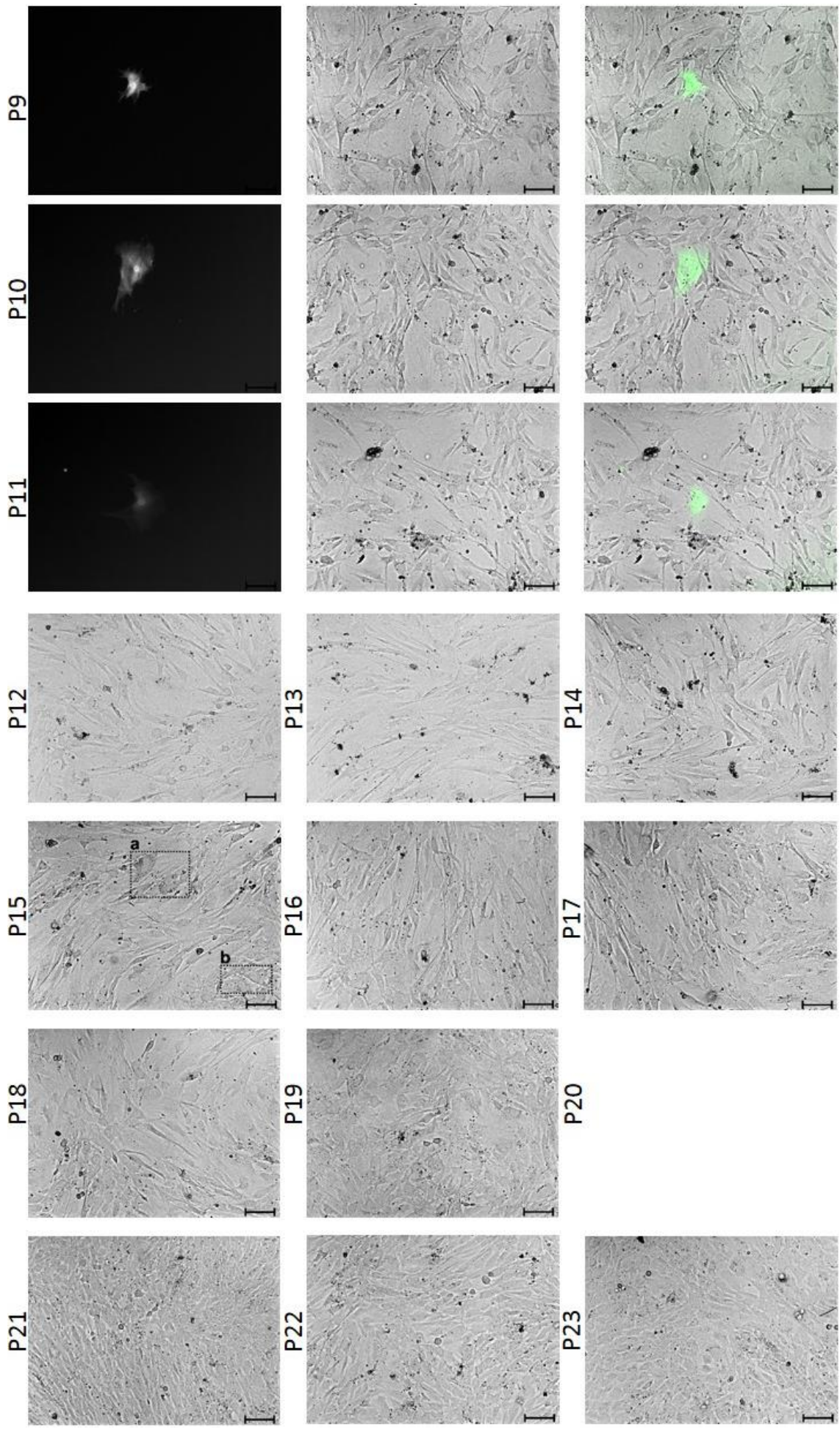


Fig. 25 | Morfología celular de MEF silvestres $Cat^{+/+}$ con expresión de catalasa citosólica $Cat^c-\Delta KANL$. Entre el P2 y P8 el número de células Venus positivas fue disminuyendo, lo que posiblemente refleja la expresión de catalasa y la pérdida de la proteína fluorescente. Las células tuvieron una morfología normal y se mantuvieron proliferando hasta el pase 18 y en los pases posteriores empezaron a aparecer células con morfología alargada y aplanada. La población en el P26 estuvo constituida por células aplanadas y alargadas, por lo que el experimento se detuvo. En diferentes pases se observaron células que contenían vesículas de gran tamaño (magnificaciones en Fig. XI de Apéndice 3), principalmente en pases tardíos (P19 a P26). El pase 2 corresponde a las células en caja de 9 cm^2 después de la electroporación. La eficiencia de electroporación fue 25%. En el pase 3 se sembraron 500,000 células transfectadas con $Cat^c-\Delta KANL$ (PB-Cat^c) en una caja de 21 cm^2 y se sub-cultivaron hasta que dejaron de dividirse y adoptaron una morfología alargada y aplanada. Se mantuvo el cultivo con $1.5\text{ }\mu\text{g}$ de Dox por mililitro de medio durante todo sub-cultivo. La escala corresponde a $100\text{ }\mu\text{m}$.





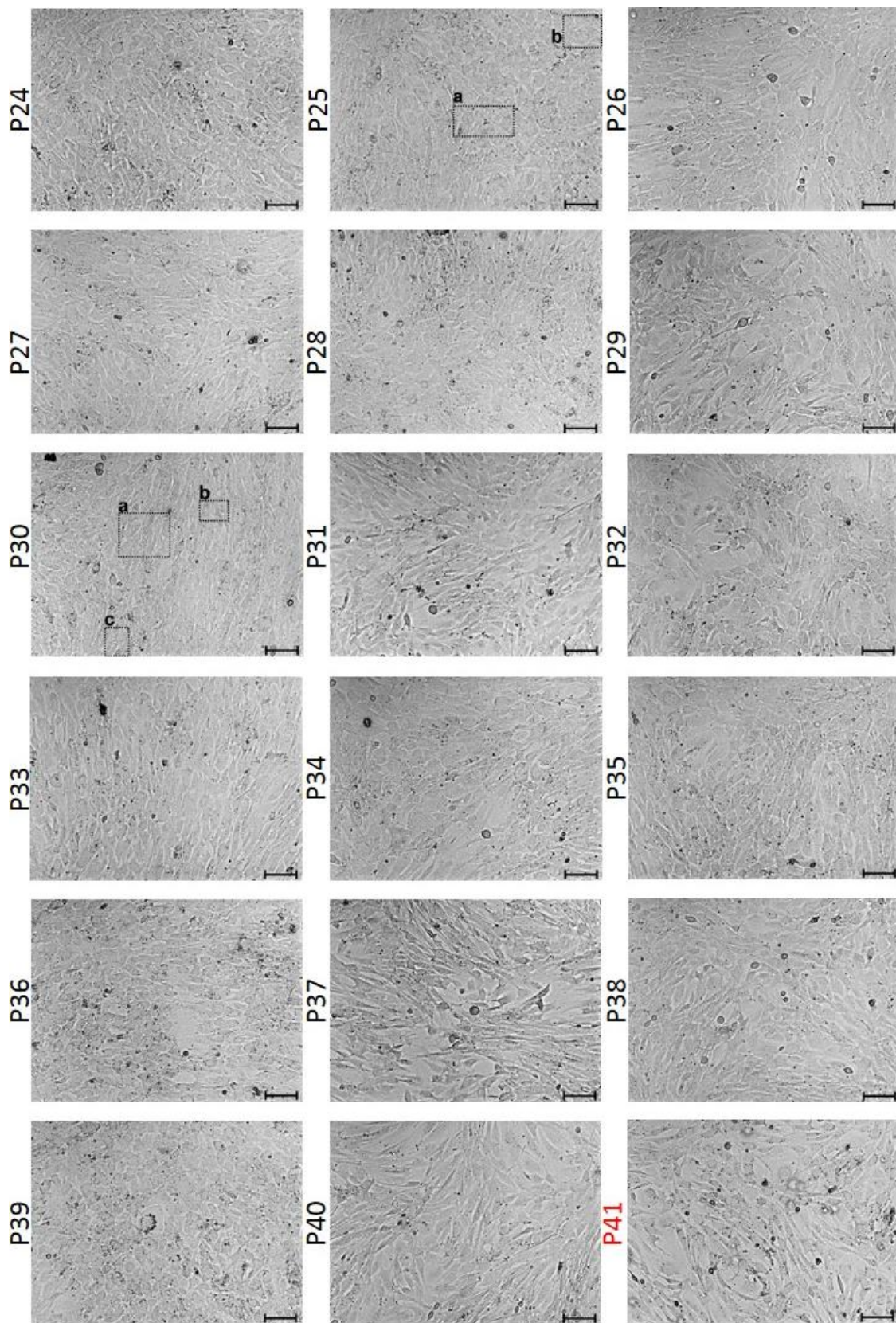


Fig. 26 | Morfología celular de MEF silvestres $Cat^{+/+}$ con expresión de catalasa peroxisomal Cat^P -SKL. Entre P2 y P11 el número de células verdes positivas disminuyó, lo que posiblemente refleja la expresión de catalasa y la pérdida de la proteína fluorescente. Se observa que las células mostraron una morfología normal, sin evidencia de células aplanadas y alargadas. En el pase 40, el cultivo se congeló y las células descongeladas mantuvieron su capacidad proliferativa y morfología normal (P41). En diferentes pases (P15, P25 y P30) había células que contenían estructuras vesiculares de gran tamaño (magnificaciones en Fig. XIII de Apéndice 3). El pase 2 corresponde a las células en caja de 9 cm² después de la electroporación. La eficiencia de electroporación fue 13%. En el pase 3 se sembraron 500,000 células transfectadas con catalasa-SKL (PB-Cat^P) en una caja de 21 cm² y se sub-cultivaron hasta el P41. Se mantuvo el cultivo con 1.5 µg de Dox por mililitro de medio. La escala corresponde a 100 µm.

4. Complementación de células troncales embrionarias (ESC) mutantes de catalasa $Cat^{-/-}$ con isoformas de catalasa citosólica $Cat^c-\DeltaKANL$ y peroxisomal Cat^p-SKL .

Para cumplir con el último objetivo, que es la complementación de la catalasa en células troncales embrionarias $Cat^{-/-}$, se aislaron blastocistos E3.5 pre-implantados (Fig. 24a) de cruces entre ratones homocigotos $Cat^{-/-}$ y se derivaron ESC. Esto se llevó a cabo con apoyo del Laboratorio de Producción de Roedores Transgénicos. Se obtuvieron ESC derivadas de tres embriones y se nombraron como: EI, EII y EIII. Las ESC derivadas formaron colonias compactas que crecieron de forma típica de unas células pluripotentes en las condiciones de cultivo estándar para su proliferación (Fig. 24b).

Las ESC provenientes de cada embrión se expandieron y se genotipificaron para identificar el sexo genético. Las ESC derivadas del embrión EII tuvieron cromosomas XY (Fig. 24c) por lo que se utilizó estas células para continuar con los experimentos y se nombraron como “EII XY”. Se aislaron 14 clonas $Cat^{-/-}$ de las ESC EII XY (Ver Tabla 3 en Apéndice 5). Cuando las ESC se encuentran por largos períodos de tiempo en cultivo *in vitro* se produce un fenómeno denominado adaptación que se caracteriza por la adquisición de aberraciones cromosómicas (ej. aneuploidías, amplificaciones, deleciones) (Baker *et al.*, 2007). Las ESC con un cariotipo anormal tienen características neoplásicas (ej. menor capacidad de diferenciación, mayor proliferación, mayor expresión de genes que controlan la pluripotencia) (Zhang *et al.*, 2016). Además, estas anomalías cromosómicas son incompatibles con el desarrollo del embrión (Levedev, 2011). Por lo tanto, las ESC con alteraciones genéticas pueden tener menor capacidad para contribuir a los tejidos embrionarios cuando se trasplantan a embriones en etapa de pre-implantación. Por lo tanto, se evaluó el cariotipo de las clonas de ESC $Cat^{-/-}$. El cariotipo de la clona C2.EII XY mostró que más del 70% de los spreads tuvieron 40 cromosomas, el 17% tuvo 39 cromosomas y 6% tuvo 38 cromosomas, lo que indica que el cariotipo es normal (Fig. 24d y 24e).

La clona C2.EII XY se electroporó con los vectores PB- Cat^c y PB- Cat^p y el vector PB-CAG-Hyper que contiene la transposasa. Las líneas transfectadas con las isoformas de catalasa ESC C2.EII $Cat^c-\DeltaKANL$ y ESC C2.EII Cat^p-SKL se sembraron a baja densidad, se seleccionaron y picaron colonias fluorescentes Venus⁺ para sub-clonar. Se aislaron cuatro sub-clonas complementadas con la catalasa citosólica (nombradas como “ESC $Cat^c-\DeltaKANL1-4$ ”) y peroxisomal (nombradas como “ESC $Cat^p-SKL1-4$ ”). Las sub-clonas crecieron en colonias compactas con bordes bien definidos (Fig. 25). Finalmente, las líneas se congelaron en el pase 4 para poder utilizarse en futuros estudios de generación de quimeras y ratones genéticamente modificados que expresen por inducción la catalasa.

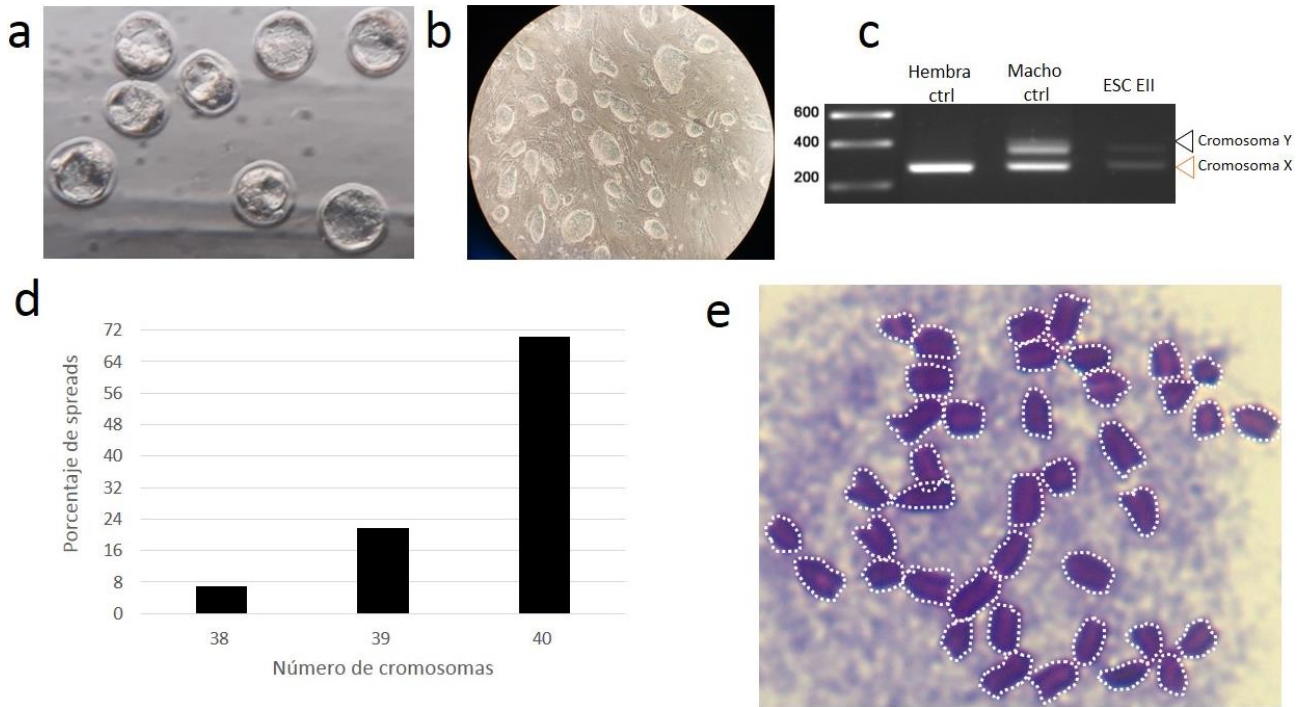


Fig. 27 | Derivación de células troncales embrionarias $Cat^{-/-}$. a) Blastocistos $Cat^{-/-}$ E3.5 en etapa de pre-implantación; b) Colonias de ESC compactas con bordes bien definidos derivadas del embrión EII XY (pase 1). c) Genotificación para sexo genético de ESC EII, se observan dos bandas que corresponde al cromosoma Y (353 bp) y cromosoma X (264 bp). En el control Hembra solo se observa una banda del cromosoma X y el control macho se observan las bandas XY. d) El cariotipo de la clona C2.EII XY fue normal debido a que el 70.2% de los spreads observados tuvieron 40 cromosomas, mientras que para 38 y 39 cromosomas el porcentaje fue 6.75% y 17%, respectivamente. e) Muestra donde se observan 40 cromosomas en un solo spread.

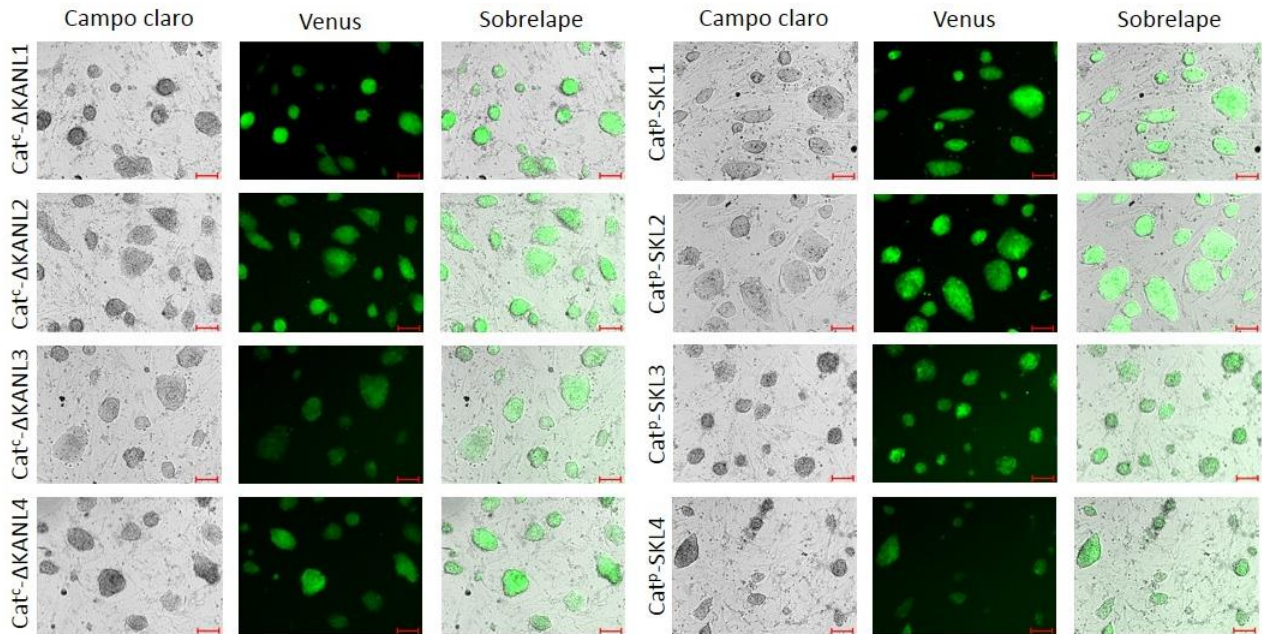


Fig. 27 | Sub-clonas ESC $Cat^{-/-}$ C2.EII XY complementada con las isoformas de catalasa citosólica $Cat^c-\Delta KANL$ y peroxisomal Cat^p-SKL . La clona C2.EII XY $Cas^{-/-}$ se transfectoraron con las isoformas de catalasa y se aislaron clonas. Se aislaron cuatro sub-clonas ESC $Cat^c-\Delta KANL1-4$, las cuales crecieron en colonias compactas con bordes bien definidos. También se aislaron cuatro sub-clonas ESC $Cat^p-SKL1-4$ que crecieron normalmente. Todas las sub-clonas son del pase 3. La escala corresponde a 100 μm .

Discusión.

1. *Los fibroblastos mutantes Cat^{-/-} tienen una viabilidad disminuida y baja capacidad proliferativa debido posiblemente al daño celular producido por el estrés oxidativo asociado a la criopreservación.*

En la criopreservación el congelamiento estimula el estrés oxidativo en células, lo que puede resultar en daño celular y apoptosis. En el descongelamiento se induce la generación de ROS, lo que produce pérdida de integridad de membrana y muerte celular (Fernandes *et al.*, 2019). Por lo tanto, se podría predecir que células que tienen un aumento en los niveles de ROS sean sensibles a la criopreservación. Se esperaría que los MEF Cat^{-/-} estudiados tengan niveles superiores de ROS, como se ha reportado previamente (Ivashchenko *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2020). Con base a lo anterior es entonces posible especular que los niveles de ROS generados por la congelación y descongelación pudieron aumentar más severamente en los MEF mutantes debido a la falta de catalasa, desencadenando muerte celular, lo que es coincidente con la gran acumulación de desechos celulares observados unos días después del descongelamiento. Es aparente que las células que sobrevivieron tuvieron baja capacidad proliferativa durante los 10 primeros pases (Fig. I y Fig. II en Apéndice 1). Interesantemente, se ha reportado que la adición de catalasa al medio de congelación convencional (50% SFB y 10% DMSO) disminuye el daño celular, resultando en el aumento de viabilidad al disminuir los niveles de ROS (Fernandes *et al.*, 2019).

Para dilucidar las alteraciones de la criopreservación en las células Cat^{-/-} se realizaron dos cultivos que se sub-cultivaron hasta que dejaron de proliferar y adquirieron una morfología senescente: 500,000 y 300,000 fibroblastos en una caja de 21 cm². El cultivo de 300,000 fibroblastos dejó de proliferar a los 35 días, lo que se relaciona con la morfología aplanada y alargada (Fig. IV en Apéndice I), una característica típica de células senescentes. El cultivo de 500,000 MEF en una caja de 21 cm² adoptó el mismo patrón alterado de proliferación, pero a partir del día 35 las células adquirieron nuevamente una morfología normal (similar a un fibroblasto con capacidad proliferativa; Fig. III en Apéndice I) y empezaron a proliferar de manera constante, alcanzando 27.3 duplicaciones poblacionales en el día 83. Este fenómeno probablemente representa un evento de inmortalización, un fenómeno especialmente común en el cultivo de MEF (Parrinello *et al.*, 2003; Torado & Green, 1963). Los MEF acumulan daño oxidativo en el DNA en condiciones normales de cultivo (Parrinello *et al.*, 2003). Se puede especular que la mayor producción de ROS que posiblemente se originó en los fibroblastos mutantes Cat^{-/-} aceleró la adquisición de anomalías genéticas que confirieron capacidad proliferativa ilimitada a estas células. Una estrategia para corroborar esta hipótesis sería evaluar la acumulación de mutaciones inducidas por estrés oxidativo.

2. *No hay diferencias en la capacidad proliferativa de fibroblastos silvestres Cat^{+/+} y mutantes Cat^{-/-} debido posiblemente a que el estrés oxidativo afecta similarmente a ambos genotipos.*

El patrón de proliferación de células primarias cultivadas *in vitro* ha sido dividido en tres fases (Hayflick & Moorhead, 1961). La fase 1 constituye el período de establecimiento de los cultivos primarios a partir del tejido intacto. Esta fase termina con la formación de la primera capa confluyente de células, cuando la población celular está lista para el primer pase de sub-cultivo. La segunda fase constituye la rápida proliferación celular y la formación de poblaciones confluentes. Para el caso de células de ratón, los MEF proliferan constantemente por una semana antes que el crecimiento empiece a declinar (Parrinello *et al.*, 2003). La fase 3 se caracteriza por la degeneración del cultivo, la acumulación de desechos celulares y la pérdida de la capacidad proliferativa. En esta última fase no se forman cultivos confluentes, sino que presenta células escasas alargadas y aplanadas, es decir, las poblaciones están constituidas por células senescentes (Hayflick & Moorhead, 1961). Esta última fase se desarrolla entre 4-5 semanas en MEF (Parrinello *et al.*, 2003).

Estas tres fases de proliferación fueron similares entre los cultivos MEF Cat^{+/+} y Cat^{-/-}. No hubo diferencias en el establecimiento del cultivo primario para ambos genotipos. La segunda fase se puede considerar hasta los 10-11 días para el caso de MEF Cat^{+/+}. Esta fase coincide con que más del 60% de los MEF Cat^{+/+} expresan el marcador de proliferación Ki67 en el día 10, de acuerdo con otro estudio de nuestro laboratorio que utilizó las mismas condiciones de cultivo con células Cat^{+/+} (Sánchez-Cázares, 2020). En los MEF mutantes Cat^{-/-} esta segunda fase de proliferación constante se extendió hasta los 14-15 días. El período de degeneración culminó a los 30 días para el cultivo de 500,000 fibroblastos Cat^{-/-} y Cat^{-/-}, lo cual se relaciona con la acumulación de desechos celulares, la adquisición de una morfología senescente y menos de 10% de células Ki57⁺ (Sánchez-Cázares, 2020; Parrinello *et al.*, 2003). Para el cultivo de 1,000,000 de células también se produjo una fase de degeneración a los 30 días, pero posteriormente se presentó otra etapa de proliferación de menor duración y terminaron degenerando a los 45 días. Este patrón posiblemente se debe a la condición de cultivo (1,000,000 de MEF en dos cajas de 21 cm²).

En condiciones de cultivo estándar, la senescencia en células de ratón se induce por daño oxidativo al DNA (Parrinello *et al.*, 2003). Como se ha mencionado, los MEF Cat^{-/-} tienen niveles superiores de ROS (Ivashchenko *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2020), por lo que se esperaría que en estas células senescieran durante un período de tiempo más corto que los MEF silvestres debido a la inducción de un programa senescente activado por estrés oxidativo. Sin embargo, la deficiencia de catalasa no disminuyó el tiempo de inducción de la senescencia. Es posible especular que durante los primeros pases el ligero aumento de H₂O₂ en células Cat^{-/-} no fue suficiente para causar estrés oxidativo y repercutir negativamente en la capacidad proliferativa. Inclusive el aumento de este ROS podría promover la proliferación (discutido más adelante). Conforme las células se sub-

cultivaron, este posible daño oxidativo se acumularía a niveles lo suficientemente altos que la presencia o ausencia de catalasa no provocarían una diferencia, activando la senescencia celular en ambos genotipos. Además, se puede especular que el daño oxidativo fue lo suficientemente alto para inmortalizar el cultivo de 1,000,000 fibroblastos silvestres $Cat^{+/+}$, un fenómeno que puede estar asociado por mutaciones (Parrinello *et al.*, 2003; Torado & Green, 1963).

Hay una tendencia de los fibroblastos mutantes $Cat^{-/-}$ por tener una mayor capacidad proliferativa debido a que alcanzaron más duplicaciones poblacionales y tuvieron mayores tasas de duplicación que las células silvestres $Cat^{+/+}$ en las tres condiciones de cultivo (500,000 MEF en una caja de 21 cm^2 ; 900,000 MEF en tres cajas de 21 cm^2 ; 1,000,000 MEF en dos cajas de 21 cm^2). Esta diferencia es más evidente en la condición de 900,000 MEF en tres cajas de 21 cm^2 , pues el cultivo de células mutantes alcanzó dos veces más duplicaciones poblacionales que las células silvestres (11.3 DP $Cat^{-/-}$ vs 6.1 DP $Cat^{+/+}$). Debido a que el sub-cultivo serial por largos períodos de tiempo depende del éxito de mantener el cultivo en la fase exponencial de crecimiento, un cultivo con menor densidad celular, al mantenerse por más tiempo en esta fase, alcanza mayor número de duplicaciones poblacionales (Hayflick, 1965; Todaro *et al.*, 1963). Por lo tanto, la condición de cultivo de 300,000 células (13900 células/ cm^2) parecer ser la más adecuada para demostrar si los fibroblastos mutantes $Cat^{-/-}$ tienen mayor capacidad proliferativa.

El mayor volumen celular es una característica de células senescentes *in vitro* e *in vivo* (Ogrodnik *et al.*, 2019). Además, el aumento en el tamaño celular es suficiente para interferir con la capacidad proliferativa y provocar senescencia celular en fibroblastos humanos (Neurohr *et al.*, 2019). A pesar de que en el presente trabajo no se pudieron determinar otras características que definen la senescencia celular (ej. β -galactosidasa asociada a senescencia, activación de p53, niveles de p21^{WIP1/CIP1} y p16^{INK4A}) o la pérdida de marcadores de proliferación (ej. Ki67, incorporación de BrdU), la morfología aplanada y alargada que presentaron las células y su asociación con su baja tasa de duplicación son fuertes indicativos funcionales de que los fibroblastos fueron senescentes.

Los fibroblastos humanos hipocatalasémicos muestran menor tasa de crecimiento, pero no hay diferencia en los niveles de SA- β -Gal con respecto a los fibroblastos humanos silvestres (Wood *et al.*, 2006). En este trabajo, los MEF $Cat^{-/-}$ mostraron mayor tasa de crecimiento, pero sin diferencias en el tiempo en que senescieron. Por lo tanto, esta contradicción se puede deber a las diferencias en la sensibilidad a estrés oxidativo y el mecanismo inductor de la senescencia celular entre las células humanas y de ratón. La mayor capacidad replicativa de las células $Cat^{-/-}$ podría deberse a un fenómeno de hormesis en el que, por el ligero aumento en el estrés oxidativo por la ausencia de catalasa (Ivashchenko *et al.*, 2011), se activen mecanismos compensatorios

antioxidantes que evitan el daño oxidativo (Pérez-Estrada *et al.*, 2019) y con ello promover el ligero aumento en la proliferación. Además, el H₂O₂ puede inducir la proliferación celular (Hernández-García *et al.*, 2010). Tampoco puede descartarse que el ligero aumento en la replicación de MEF Cat^{-/-} se debe a que se utilizaron directamente del cultivo primario, mientras que los silvestres se criopreservaron.

3. *La catalasa citosólica Cat^c-ΔKANL podría aumentar la proliferación de fibroblastos por un mecanismo que disminuye los niveles de ROS en el citosol.*

Se ha propuesto que la catalasa silvestre ha evolucionado la secuencia PTS1 no canónica “KANL” para permitir la distribución de la actividad antioxidante entre el citosol y el peroxisoma (Walton *et al.*, 2017). La isoforma citosólica Cat^c-ΔKANL puede formar homo-tetrámeros funcionales y proteger contra estrés oxidativo y muerte celular inducido por un tratamiento exógeno de H₂O₂ (Dubreuil *et al.*, 2020; Hernández-García *et al.*, 2008; Otera & Fujiki, 2011; Walton *et al.*, 2017). Además, la sobre-expresión de la enzima silvestre Cat-KANL en células senescentes, que se localiza en el citosol en estas células, disminuye los niveles de ROS y disminuyó ligeramente, aunque no significativamente, el marcador β-galactosidasa asociada a senescencia en células de humano (Koepke *et al.*, 2007). No obstante, no se han realizado experimentos en los que se evalúe la sobre-expresión de la catalasa con localización citosólica Cat^c-ΔKANL en la proliferación celular y senescencia.

La sobre-expresión de la Cat-ΔKANL en células Cat^{+/+} aumentó la proliferación celular, reflejándose en las más de 13 duplicaciones poblacionales a los 73 días de cultivo. Debido a la función antioxidante de la catalasa en citosol, es razonable que la sobre-expresión atrasó la senescencia celular al disminuir los niveles de ROS en el citosol que se acumulan a lo largo del sub-cultivo celular (Ivashchenko *et al.*, 2011). Además, como la Cat-ΔKANL puede formar hetero-tetrámeros con la enzima silvestre endógena Cat-KANL de los MEF Cat^{+/+} e importarse hacia el peroxisoma (Otera & Fujiki, 2011), es posible que la isoforma citosólica podría también tener efectos directos sobre la matriz peroxisomal.

Un efecto directo sobre la degradación de ROS es la disminución del estrés oxidativo, lo que ayuda a mantener la homeostasis celular. Indirectamente, al disminuir el estrés oxidativo en el citosol, los peroxisomas pueden seguir importando adecuadamente sus proteínas de la matriz, entre ellas la catalasa silvestre endógena, y mantener el metabolismo adecuado de lípidos y la homeostasis redox (Terlecky *et al.*, 2006; Titorenko & Terlecky, 2011). Además, esto ayudaría a conservar la adecuada función de la mitocondria (Lismont *et al.*, 2015). Todo esto en conjunto probablemente es la causa del aumento de la proliferación y el atraso de la aparición del fenotipo senescente.

Se tenía como objetivo determinar el efecto de la sobre-expresión de Cat- Δ KANL en células Cat^{-/-} para contestar una de las preguntas planteadas en este proyecto: cuál localización sub-celular, citosólico o peroxisomal, de la catalasa aumentan la proliferación y retrasa o evita la senescencia celular. No obstante, no se pudo llevar a cabo. Una de las principales razones es que los MEF Cat^{-/-} descongelados no pudieron proliferar después de la electroporación (datos no mostrados) porque, como se ha mencionado, posiblemente son sensibles al estrés oxidativo y por lo tanto el estrés inducido por la transfección sensibilizó aún más las células. Otra razón fue la disponibilidad de tiempo que impidió llevar a cabo otro experimento, pues si el efecto de la sobre-expresión de la catalasa se hubiera reproducido en células mutantes Cat^{-/-} como sucedió en células silvestres, el tiempo de cultivo hubiera sido mayor a los 70 días. Aunque exploratorios, estos resultados nos promueven a investigar el papel de la catalasa citosólica sobre el estado redox peroxisomal y la senescencia celular de fibroblastos embrionarios de ratón.

4. La catalasa peroxisomal Cat^P-SKL podría aumentar la proliferación de fibroblastos Cat^{+/+} por un mecanismo que involucra el metabolismo de lípidos y la señalización ROS.

En la matriz peroxisomal, la catalasa controla la síntesis, almacén y oxidación de lípidos en células cultivadas *in vitro* y en el hígado a través de un mecanismo que involucra la homeostasis redox del peroxisoma (Heit *et al.*, 2017; Pérez-Estrada *et al.*, 2019; Piao *et al.*, 2017; Sheikh *et al.*, 1998). Diferentes estudios apuntan a que los procesos metabólicos en el peroxisoma (ej. metabolismo de lípidos, señalización ROS) contribuyen a la senescencia celular en célula humanas y al envejecimiento cronológico y replicativo en levaduras (Titorenko & Terlecky, 2011). Si la catalasa peroxisomal puede influir en la senescencia celular a través de regular el metabolismo peroxisomal de lípidos es aún desconocido, por lo que se indujo la sobreexpresión de la catalasa Cat^P-SKL en MEF y se evaluó sus efectos en la proliferación celular.

La Cat^P-SKL aumentó la proliferación celular y evitó la senescencia de las células silvestres Cat^{+/+} (Fig. 24 y Fig. 26). Esto concuerda con que la sobre-expresión de la catalasa peroxisomal Cat^P-SKL, pero no de la catalasa silvestre Cat-KANL, disminuye la actividad del marcador de senescencia β -galactosidasa y los niveles de ROS en fibroblastos humanos y acatalasémicos (Koepke *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 2007). Debido a que hay información indicando que la Cat^P-SKL no protege contra el estrés oxidativo y la muerte celular inducidos por la adición exógena de H₂O₂ en células de humano (Walton *et al.*, 2017; Dubreuil *et al.*, 2020), el mecanismo por el que la catalasa Cat^P-SKL podría evitar la senescencia celular en MEF parece ser independiente del estrés oxidativo.

En fibroblastos humanos, la pérdida de catalasa peroxisomal disminuye la actividad en la β -oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga, la α -oxidación de ácido fitánico y la biosíntesis de plasmalógenos (Sheikh *et al.*, 1998). Además, la complementación con Cat^P-SKL normalizó estas actividades metabólicas del peroxisoma

(Sheikh *et al.*, 1998). En el hígado de ratones $Cat^{-/-}$, un tejido con alta actividad de catalasa y de metabolismo de lípidos, la deficiencia de catalasa disminuyó la acumulación y síntesis de lípidos en condiciones normales y en una dieta alta en grasa (Pérez-Estrada *et al.*, 2019). Por lo tanto, se esperaría que la sobreexpresión de Cat^P -SKL en los fibroblastos de ratón $Cat^{+/+}$ tenga efectos en el metabolismo de lípidos. A pesar de que en nuestros experimentos faltan controles, los fibroblastos transfectados con Cat^P -SKL pudieron acumular grasas cuando se sometieron al tratamiento con ácido palmítico (un tratamiento que simula una dieta alta en grasa; Ver Fig. XIII en Apéndice 3), lo cual podría indicar que se promueve la acumulación de lípidos por efecto de la catalasa peroxisomal en células $Cat^{+/+}$. La conclusión definitiva depende de determinar el nivel de acumulación de lípidos en fibroblastos silvestres $Cat^{+/+}$, mutantes $Cat^{-/-}$ y células que expresen Cat^c - Δ KANL.

El receptor PPAR α tiene como activadores endógenos los sustratos de acil-CoA de la β -oxidación peroxisomal. Este receptor es el principal PPAR que activa la transcripción de genes involucrados en la biogénesis peroxisomal (Pawlak *et al.*, 2015; Schrader *et al.*, 2012). Los productos de la β -oxidación peroxisomal (ej. ácido docosohexanoico) también son inductores de la biogénesis peroxisomal por un mecanismo independiente de PPAR α (Itoyama *et al.*, 2012). Así, el metabolismo de lípidos peroxisomal está estrechamente relacionado a la biogénesis del peroxisoma (Reddy & Hashimoto, 2001). Por lo tanto, se podría plantear que las células deficientes en catalasa peroxisomal, al tener disminuida la actividad metabólica de lípidos, presenten un menor número de peroxisomas. Los ratones mutantes $Cat^{-/-}$ tienen ligeramente disminuido el nivel de expresión de PPAR α en el hígado, pero no presentan cambios significativos en el número de peroxisomas en hepatocitos (Pérez-Estrada, 2019). Lo contrario se esperaría que sucediera cuando se indujera la sobreexpresión de catalasa en la matriz peroxisomal, es decir, se promovería el metabolismo de lípidos y se debería inducir la proliferación peroxisomal. Un dato que podría sugerir este efecto sobre el metabolismo y la biogénesis peroxisomal por la Cat^P -SKL es la mayor intensidad de señal de PMP70 (Fig. 16), lo que representa un aumento en el número y tamaño de los peroxisomas. Por lo tanto, se propone que la sobre-expresión de Cat^P -SKL indujo la biogénesis peroxisomal en MEF $Cat^{+/+}$ a través de un mecanismo que involucra la actividad metabólica peroxisomal de lípidos.

A pesar de que no se pudo corroborar su localización dentro del peroxisoma, otros estudios han demostrado que la Cat^P -SKL tiene mayor eficiencia de importación hacia la matriz peroxisomal (Dubreuil *et al.*, 2020; Koepke *et al.*, 2007; Walton *et al.*, 2017). El aumento del tamaño y número peroxisomas observado por primera vez en este trabajo, no se observó en otros estudios en los que expresaron la isoforma Cat^P -SKL posiblemente porque su expresión se llevó en líneas celulares derivadas de cáncer (Dubreuil *et al.*, 2020), en las cuales la biogénesis peroxisomal podría no llevarse adecuadamente debido a su fenotipo transformado, y en células senescentes (Koepke *et al.*, 2007), las cuales presentan ya un aumento en el número y tamaño de

peroxisomas (fenómeno llamado “senescencia peroxisomal”). En el otro estudio donde también sobre-expresaron la catalasa Cat^P-SKL no analizaron los cambios en el número de este organelo (Walton *et al.*, 2017).

Se pueden proponer varios mecanismos por los que el metabolismo de lípidos peroxisomal evita la activación de la senescencia celular. Diferentes estudios demuestran que el metabolismo de lípidos y la acumulación de ciertos ácidos grasos aumentan la esperanza de vida de animales (ej. *Caenorabditis elegans*) y levaduras por un mecanismo que aumenta la respuesta contra estrés y mantiene la proteoestasis (Han *et al.*, 2017; Imanikia *et al.*, 2019). Un mecanismo similar podría ser el responsable por el que la Cat^P-SKL, al restaurar la acumulación de lípidos, aumentó la proliferación y evitó la senescencia celular en fibroblastos Cat^{+/+}. Interesantemente, en *C. elegans* la eliminación de la catalasa peroxisomal (Ctl2) pero no de la isoforma citosólica (Ctl1) causa un fenotipo progérico (Petriv & Rachubinski, 2004). Si bien no se observó un aumento en el número de células senescentes en el hígado que podrían explicar la disminución de la esperanza de vida de ratones Cat^{-/-} (Pérez-Estrada *et al.*, 2019), aún falta analizar la acumulación de células senescentes otros tejidos en los que el peroxisoma son importantes centros metabólicos (ej. intestino, cerebro, tejido adiposo) que podría explicar este fenómeno en los ratones carentes de catalasa.

5. La ausencia de catalasa en el peroxisoma puede repercutir en la autofagia.

La autofagia es un sistema intracelular que degrada proteínas intracelulares. La inducción de la macroautofagia provoca la formación del autofagosoma el cual se fusiona con el lisosoma para formar el autolisosoma, un organelo en el que se degradan los componentes celulares por las enzimas lisosomales (Yoshii & Muzishima, 2017). El metabolismo H₂O₂ peroxisomal influye la actividad de mTOR1 y la autofagia. El complejo de señalización TSC (TSC1, TSC2, Rheb y TBC1D) se localiza en la membrana del peroxisoma a través de su interacción con el receptor Pex5 y la PMP Pex19. En respuesta a altos niveles de ROS peroxisomales este complejo inhibe la actividad de mTORC1 e induce la autofagia (Zhang *et al.*, 2013). Al influir en los niveles de ROS peroxisomales, la catalasa es un regulador de esta vía de señalización que induce autofagia. Por ejemplo, al silenciar post-transcripcionalmente o al inhibir químicamente la actividad antioxidante de la catalasa, se induce autofagia en células humanas HepG2 y RPE1 (Lee *et al.*, 2018).

La deficiencia de catalasa en MEF Cat^{-/-} de los cultivos de 1,000,000 y 9000,000 células causaron la aparición de estructuras que se denominaron “estructuras vesiculares” aún de naturaleza desconocida. Estas estructuras fueron muy abundantes en el citoplasma y su tamaño fue muy variable (Fig. V y VI). Este fenotipo fue más evidente en las células transfectadas con la isoforma de catalasa citosólica Cat^C-ΔKANL, observándose un gran número de células por campo de visualización a lo largo de diferentes pases (Fig. XI). Aunque también se presentaron en las células que sobre-expresaron la Cat^P-SKL, el número de vesículas, células y pases

aparentemente fue menor (Fig.XII). Aunque solo se tiene evidencia visual, la naturaleza de estas estructuras vesiculares puede ser muy variable. Sin embargo, debido a la relación del peroxisoma y la autofagia, es posible postular que constituyen vesículas autofágicas probablemente producidas por la alteración de la regulación redox peroxisomal deficientes en catalasa. También es necesario determinar si la acumulación se debe a un aumento de la actividad autofágica o a un bloqueo del flujo autofágico (Yoshii & Muzishima, 2017).

6. *Células troncales embrionicas Cat^{-/-} complementadas con isoformas de catalasa Cat^P-SKL y Cat^C-ΔKANL podrían ser utilizadas para dilucidar la señalización de H₂O₂ peroxisomal sobre la acumulación de lípidos y otros procesos celulares en animales.*

La determinación de la función génica requiere al menos dos análisis complementarios: pérdida y ganancia de función. La pérdida de catalasa en humanos se manifiesta como la enfermedad de Takahara durante la infancia (Takahara *et al.*, 1960). Por otra parte, los ratones mutantes Cat^{-/-} no acumulan lípidos en el hígado cuando se someten a regímenes de alimentación (ej. dieta alta en grasa) que inducen esteatosis hepática. La evidencia indica que, por la deficiencia de catalasa, la señalización alterada de H₂O₂ peroxisomal disminuye la biogénesis de lípidos y evita su acumulación (Pérez-Estrada *et al.*, 2019). Por lo tanto, se ha propuesto que la catalasa, al controlar la señalización de H₂O₂ peroxisomal, regula el metabolismo de lípidos en el hígado.

Para determinar la función génica y comprender este mecanismo de regulación es necesario realizar la complementación y sobre-expresión de la catalasa. Una estrategia *in vitro* para dirigir este problema sería el modelo de acumulación de lípidos en fibroblastos embrionarios de ratón *in vitro* que sobre-expresen las isoformas de catalasa, establecido en este trabajo (ver Fig. XIII en Apéndice 3). Sin embargo, debido a las diferencias metabólicas entre el linaje hepático y los fibroblastos, el modelo de MEF tendría limitaciones. Otra estrategia que se intentó en este trabajo fue la derivación de líneas clonales de células HepG2 que sobre-expresen las isoformas de catalasa. Sin embargo, como se mencionó, no se pudieron establecer dichas clonas (datos no mostrados). Las células troncales derivadas en este trabajo (ver Tabla 4 en Apéndice 4) representan una herramienta para superar estas limitaciones. Las líneas de células troncales embrionicas Cat^C-ΔKANL1-4 y Cat^P-SKL1-4 generadas (Fig. 27) podrían diferenciarse a hepatocitos a través de protocolos ya establecidos (Zeilenger *et al.*, 2016), para estudiar la participación de la catalasa peroxisomal en el metabolismo de lípidos del peroxisoma. Otra estrategia innovadora es la generación de organoides hepáticos a partir de las ESC, los cuales recapitulan varios aspectos del hígado como la esteatosis (Ouchi *et al.*, 2019).

La generación de ratones transgénicos o quiméricos que sobreexpresen un gen de interés es una estrategia común para estudiar la ganancia de función de un gen *in vivo*. Una estrategia para generarlos es por la inyección de células troncales embrionicas modificadas genéticamente a embriones en la etapa blastocitos y la

transferencia a ratonas pseudopreñadas para su desarrollo (Kumar *et al.*, 2009). Las líneas de ESC Cat^c- Δ KANL1-4 y Cat^p-SKL1-4 generadas (Fig. 27) podrían ser utilizadas para generar los ratones quiméricos o transgénicos con sobre-expresión de catalasa, los cuales podrían servir como un modelo a través del cual estudiar los mecanismos de señalización redox peroxisomal y su relación con el metabolismo de lípidos *in vivo*.

Para estudiar el papel de ROS en diversos procesos celulares (ej. muerte celular durante el desarrollo) se han utilizado principalmente moléculas antioxidantes no biológicas *ex vivo* o *in vitro* como una herramienta para disminuir los ROS (Hernández-García *et al.*, 2008; 2010). Sin embargo, estas moléculas no eliminan por completo los ROS y pueden intervenir en otros procesos no relacionados con la eliminación de especies reactivas. Los ratones quiméricos o transgénicos que sobre-expresen las isoformas de catalasa podrían constituir un modelo para estudiar la contribución de ROS, específicamente H₂O₂, en diferentes procesos celulares (ej. morfogénesis de las extremidades).

Como se ha mencionado anteriormente, el campo de la senescencia necesita nuevos modelos animales que sean útiles para estudiar poblaciones senescentes no caracterizadas (Gasek *et al.*, 2021). Tal es el caso que recientemente se ha creado un nuevo modelo transgénico para conocer una población de células senescentes que depende del p21^{WAF1/CIP1} (Wang *et al.*, 2021) y se siguen refinando los modelos transgénicos que dependen del locus *CDKN2A* para identificar las células dependientes de p16^{INK4A} (Grosse *et al.*, 2020; Omori *et al.*, 2020). Es indudable que se seguirán generando nuevos modelos que permitan identificar diferentes programas senescentes. Debido a que la sobre-expresión de las isoformas de catalasa parecen evitar la senescencia celular de MEF, sería interesante conocer si su sobre-expresión en tejidos tiene efectos sobre un nuevo programa de senescencia inducido por alteraciones peroxisomales. Para ello los ratones quiméricos que se podrían generar a partir de las ESC Cat^c- Δ KANL1-4 y Cat^p-SKL1-4 generadas en este trabajo constituirían un nuevo modelo para investigar este hipotético programa senescente.

Conclusiones.

- No hay diferencias en la capacidad proliferativa entre los fibroblastos de ratón $Cat^{+/+}$ y $Cat^{-/-}$.
- La sobre-expresión de catalasa en el peroxisoma o citosol aumenta significativamente la proliferación celular y evitan o atrasan la senescencia celular de MEF $Cat^{+/+}$.
- Las ESC que expresan las isoformas de catalasa Cat^p -SKL y Cat^c - Δ KANL pueden ser utilizadas para estudiar la contribución de ROS en diferentes procesos celulares *in vivo*, como la senescencia.

Referencias bibliográficas.

1. Adeva-andany, M. M., Carneiro-freire, N., Seco-filgueira, M., Fernández-Fernández, C., & Mouriño-bayolo, D. (2019). Mitochondrial β -oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion*, 46, 73–90. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.02.009>
2. Apanasets, O., Grou, C. P., Van Veldhoven, P. P., Brees, C., Wang, B., Nordgren, M., ... Fransen, M. (2014). PEX5, the Shuttling Import Receptor for Peroxisomal Matrix Proteins, Is a Redox-Sensitive Protein. *Traffic*, 15(1), 94–103. <https://doi.org/10.1111/tra.12129>
3. Baker DE, Harrison NJ, Maltby E, Smith K, Moore HD, Shaw PJ, Heath PR, Holden H, Andrews PW. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat Biotechnol*, 25(2):207-15. doi: 10.1038/nbt1285. PMID: 17287758.
4. Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonja, T., Lebrasseur, N. K., Childs, B. G., Van De Sluis, B., Kirkland, J. L., & Van Deursen, J. M. (2011). Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479(7372), 232–236. <https://doi.org/10.1038/nature10600>
5. Biran, A., Zada, L., Abou Karam, P., Vadai, E., Roitman, L., Ovadya, Y., ... Krizhanovsky, V. (2017). Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell*, 16(4), 661–671. <https://doi.org/10.1111/ace1.12592>
6. Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C., Morin, G. B., ... Wright, W. E. (1998). Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science*, 279, 349–352.
7. Braverman, N., Dodt, G., Gould, S. J., & Valle, D. (1998). An isoform of Pex5p, the human PTS1 receptor, is required for the import of PTS2 proteins into peroxisomes, 7(8), 1195–1205.
8. Brocard, C., & Hartig, A. (2006). Peroxisome targeting signal 1: Is it really a simple tripeptide? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(12), 1565–1573. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.022>
9. Burdette, D. E., Kremser, K., Fink, J. K., Pahan, K., Stanley, W., & Singh, I. (1996). Late-onset generalized disorder of peroxisomes. *Neurology*, 46, 829–832
10. Busuttil, R. A., Rubio, M., Dollé, M. E. T., Campisi, J., & Vijg, J. (2003). Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture. *Aging Cell*, 2(6), 287–294. <https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2003.00066.x>
11. Campisi, J. (2013). Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annual Review of Physiology*, 75(1), 685–705. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>
12. Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 192–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
13. Coppe, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Krtolica, A., Beausejour, C., Parrinello, S., ... Campisi, J. (2010). A Human-Like Senescence-Associated Secretory Phenotype Is Conserved in Mouse Cells Dependent on Physiological Oxygen. *PLoS ONE*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009188>
14. Covarrubias, L., Hernández-García, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., & Castro-Obregón, S. (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Developmental Biology*, 320(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.041>
15. Crawford, D. R., Mirault, M.-E., Rémi, M., Zbinden, I., & Cerutti, P. A. (1988). Molecular Defect in Human Acatalasemia Fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 153(1), 59–66.
16. Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., Laberge, R. M., Vijg, J., VanSteeg, H., Dollé, M. E. T., Hoeijmakers, J. H. J., deBruin, A., Hara, E., & Campisi, J. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell*, 31(6), 722–733. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>
17. Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., & d'Adda di Fagagna, F. (2020). Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>
18. Dias, A. F., Francisco, T., Rodrigues, T. A., Grou, C. P., & Azevedo, J. E. (2016). The first minutes in the life of a peroxisomal matrix protein. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(5), 814–820. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.025>
19. Dubreuil, M. M., Morgens, D. W., Okumoto, K., Honsho, M., Contrepolis, K., Lee-McMullen, B., ... Bassik, M. C. (2020). Systematic Identification of Regulators of Oxidative Stress Reveals Non-canonical Roles for Peroxisomal Import and the Pentose Phosphate Pathway. *Cell Reports*, 30(5), 1417-1433.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.013>
20. Emmanouilidis, L., Gopalswamy, M., Passon, D. M., Wilmanns, M., & Sattler, M. (2016). Structural biology of the import pathways of peroxisomal matrix proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(5), 804–813. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.034>
21. Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Zglinicki, T. Von, & Saretzki, G. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426, 194–198.
22. Fernandes, S., Khan, N., Kale, V., & Limaye, L. (2019). Catalase incorporation in freezing mixture leads to improved recovery of cryopreserved iPSC lines. *Cryobiology*, 90, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.09.003>
23. Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., & Apanasets, O. (2012). Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(9), 1363–1373. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.001>

24. Freitas, M. O., Francisco, T., Rodrigues, T. A., Alencastre, I. S., Pinto, M. P., Grou, C. P., ... Azevedo, J. E. (2011). PEX5 protein binds monomeric catalase blocking its tetramerization and releases it upon binding the N-terminal domain of PEX14. *Journal of Biological Chemistry*, 286(47), 40509–40519. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.287201>
25. Gasek, N. S., Kuchel, G. A., Kirkland, J. L., & Xu, M. (2021). Strategies for targeting senescent cells in human disease. *Nature Aging*, 1(10), 870–879. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00121-8>
26. Giordano, C. R., & Terlecky, S. R. (2012). Peroxisomes, cell senescence and rates of aging. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1822(9), 1358–1362. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.03.013>
27. Glorieux, C., & Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*, 398(10), 1095–1108. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>
28. Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., ... Demaria, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>
29. Goyal, M. M., & Basak, A. (2012). Hydroxyl radical generation theory: A possible explanation of unexplained actions of mammalian catalase. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.050>
30. Guerrero-Flores, G. (2018). Caracterización de la adquisición del fenotipo terminal y la neurogénesis en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas. Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología, UNAM.
31. Han, S., Schroeder, E. A., Silva-García, C. G., Hebestreit, K., Mair, W. B., & Brunet, A. (2017). Mono-unsaturated fatty acids link H3K4me3 modifiers to C. elegans lifespan. *Nature*, 544(7649), 185–190. <https://doi.org/10.1038/nature21686>
32. Hashimoto, M., Asai, A., Kawagishi, H., Mikawa, R., Iwashita, Y., Kanayama, K., Sugimoto, K., Sato, T., Maruyama, M., & Sugimoto, M. (2016). Elimination of p19ARF-expressing cells enhances pulmonary function in mice. *JCI Insight*, 1(12). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.87732>
33. Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614–636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
34. Hayflick, L., & Moorhead, P. (1961). The serial cultivation of human cell strains'. *Experimental Cell Research*, 25, 585–621.
35. He, S., & Sharpless, N. E. (2017). Senescence in Health and Disease. *Cell*, 169(6), 1000–1011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>
36. Heit, C., Marshall, S., Singh, S., Yu, X., Charkoftaki, G., Zhao, H., ... Vasiliou, V. (2017). Catalase deletion promotes prediabetic phenotype in mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 103, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.011>
37. Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P. C., Chen, D. J., & Sedivy, J. M. (2004). Telomere Shortening Trigger Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, p53, and p21, but Not p16 INK4a. *Molecular Cell*, 14, 501–513.
38. Hernández-García, D., Castro-Obregón, S., Gómez-López, S., Valencia, C., & Covarrubias, L. (2008). Cell death activation during cavitation of embryoid bodies is mediated by hydrogen peroxide. *Experimental Cell Research*, 314(10), 2090–2099. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.03.005>
39. Hernández-García, D., Wood, C. D., Castro-Obregón, S., & Covarrubias, L. (2010). Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free Radical Biology and Medicine*, 49(2), 130–143. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.020>
40. Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>
41. Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1238–1246. <https://doi.org/10.1172/JCI95148>
42. Heyer, J., Kwong, L. N., Lowe, S. W., & Chin, L. (2010). Non-germline genetically engineered mouse models for translational cancer research. *Nature Reviews Cancer*, 10(7), 470–480. <https://doi.org/10.1038/nrc2877>
43. Ho, Y. S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A., & Ho, D. S. (2004). Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32804–32812. <http://doi.org/10.1074/jbc.M404800200>
44. Imanikia, S., Sheng, M., Castro, C., Griffin, J. L., Taylor, R. C., Imanikia, S., ... Taylor, R. C. (2019). XBP-1 Remodels Lipid Metabolism to Extend Report XBP-1 Remodels Lipid Metabolism to Extend Longevity. *CellReports*, 28(3), 581–589.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.057>
45. Ivashchenko, O., Veldhoven, P. P. Van, Brees, C., Ho, Y., Terlecky, S. R., & Fransen, M. (2010). Intraperoxisomal redox balance in mammalian cells: oxidative stress and interorganellar. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-11-0919>
46. Itoyama, A., Honsho, M., Abe, Y., Moser, A., Yoshida, Y., & Fujiki, Y. (2012). Docosahexaenoic acid mediates peroxisomal elongation, a prerequisite for peroxisome division. *Journal of Cell Science*, 125, 589–602. <https://doi.org/10.1242/jcs.087452>
47. Izdebska, M., Pia, I., Korolczuk, A., Herbet, M., Gieroba, R., Sysa, M., ... Dudka, J. (2017). The beneficial effects of resveratrol on steatosis and mitochondrial oxidative stress in HepG2 cells. *Can J Physiol Pharmacol*, 1453(July), 1442–1453.
48. Jansen, G. A., & Wanders, R. J. A. (2006). Alpha-Oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, 1403–1412. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.012>
49. Kim, M. M., Rivera, M. A., Botchkina, I. L., Shalaby, R., Thor, A. D., & Blackburn, E. H. (2001). A low threshold level of expression of mutant-template telomerase RNA inhibits human tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), 7982–7987. <https://doi.org/10.1073/pnas.131211098>

50. Kodama, S., Mori, I., Roy, K., Yang, Z., Suzuki, K., & Watanabe, M. (2001). Culture condition-dependent senescence-like growth arrest and immortalization in rodent embryo cells. *Radiation Research*, 155(1), 254–262. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2001\)155\[0254:CCDSL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2001)155[0254:CCDSL]2.0.CO;2)
51. Koepke, J. I., Nakrieko, K. A., Wood, C. S., Boucher, K. K., Terlecky, L. J., Walton, P. A., & Terlecky, S. R. (2007). Restoration of peroxisomal catalase import in a model of human cellular aging. *Traffic*, 8(11), 1590–1600. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00633.x>
52. Koepke, J. I., Wood, C. S., Terlecky, L. J., Walton, P. A., & Terlecky, S. R. (2008). Progeric effects of catalase inactivation in human cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232(1), 99–108. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2008.06.004>
53. Kumar TR, Larson M, Wang H, McDermott J, Bronshteyn I. Transgenic mouse technology: principles and methods. *Methods Mol Biol* (2009) 590: 335–62. doi:10.1007/978-1-60327-378-7
54. Lee, J. N., Dutta, R. K., Maharjan, Y., Liu, Z. Qiang, Lim, J. Y., Kim, S. J., Cho, D. H., So, H. S., Choe, S. K., & Park, R. (2018). Catalase inhibition induces pexophagy through ROS accumulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 501(3), 696–702. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.050>
55. Legakis, J. E., Koepke, J. I., Jedeszko, C., Barlasakar, F., Terlecky, J., Edwards, H. J., ... Terlecky, S. R. (2002). Peroxisome Senescence in Human Fibroblasts, 13, 4243–4255.
56. Lebedev, I. (2011). Mosaic aneuploidy in early fetal losses. *Cytogenetic and Genome Research*, 133(2–4), 169–183. <https://doi.org/10.1159/000324120>
57. Lewis, W. H. (1985). Establishment of Mouse Cell Lines Homozygous for Temperature-Sensitive Mutation in Catalase Gene. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 11(4), 319–324.
58. Lismont, C., Nordgren, M., Van Veldhoven, P. P., & Fransen, M. (2015). Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00035>
59. Lismont, C., Revenco, I., & Fransen, M. (2019). Peroxisomal Hydrogen Peroxide Metabolism and Signaling in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 3673. <https://doi.org/10.3390/ijms20153673>
60. Lodhi, I. J., & Semenkovich, C. F. (2014). Peroxisomes: A nexus for lipid metabolism and cellular signaling. *Cell Metabolism*, 19(3), 380–392. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.002>
61. Martín-Rivera, L., Herrera, E., Albar, J. P., & Blasco, M. A. (1998). Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), 10471–10476. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10471>
62. Martínez-Sarmiento, J. A. (2016). Patrones de plutipotencia inducida por reprogramación celular utilizando un sistema auto-inducible. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
63. Maynard, E. L., Gatto, G. J., & Berg, J. M. (2004). Pex5p binding affinities for canonical and noncanonical PTS1 peptides. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 55(4), 856–861. <https://doi.org/10.1002/prot.20112>
64. Mehlem, A., Hagberg, C. E., Muhl, L., Eriksson, U., & Falkevall, A. (2013). Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nature Protocols*, 8(6), 1149–1154. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.055>
65. Milanovic, M., Yu, Y., & Schmitt, C. A. (2018). The Senescence–Stemness Alliance – A Cancer-Hijacked Regeneration Principle. *Trends in Cell Biology*, 28(12), 1049–1061. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.09.001>
66. Mojica, A. K. (2018). Papel de Dll1 en el mantenimiento de las células troncales neurales del nicho dopaminérgico embrionario. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
67. Mulas, C., Meyenn, F. Von, Leitch, H. G., Nichols, J. & Smith, A. (2019). Defined conditions for propagation and manipulation of mouse embryonic stem cells. *Development*, (146), dev178970. <https://doi.org/10.1242/dev.178970>
68. Nakashima, H., Yamamoto, M., Goto, K., Osumi, T., Hashimoto, T., & Endo, H. (1989). Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. *Gene*. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90021-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90021-1)
69. Neurohr, G. E., Terry, R. L., Lengfeld, J., Bonney, M., Brittingham, G. P., Moretto, F., ... Amon, A. (2019). Excessive Cell Growth Causes Cytoplasm Dilution And Contributes to Senescence. *Cell*, 176(5), 1083-1097.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.018>
70. Ogrodnik, M., Salmonowicz, H., Jurk, D., & Passos, J. F. (2019). Expansion and Cell-Cycle Arrest: Common Denominators of Cellular Senescence. *Trends in Biochemical Sciences*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.06.011>
71. Okumoto, K., El Shermely, M., Natsui, M., Kosako, H., Natsuyama, R., Marutani, T., & Fujiki, Y. (2020). The peroxisome counteracts oxidative 1 stresses by suppressing catalase import via pex14 phosphorylation. *ELife*, 9, 1–52. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.55896>
72. Otera, H., & Fujiki, Y. (2012). Pex5p imports folded tetrameric catalase by interaction with pex13p. *Traffic*, 13(10), 1364–1377. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01391.x>
73. Ouchi, R., Togo, S., Kimura, M., Shinozawa, T., Koido, M., Koike, H., ... Takebe, T. (2019). Modeling Steatohepatitis in Humans with Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids. *Cell Metabolism*, 30(2), 374-384.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.007>
74. Ovadya, Y., & Krizhanovsky, V. (2018). Strategies targeting cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1247–1254. <https://doi.org/10.1172/JCI95149>
75. Parrinello, S., Krtochka, A., Goldstein, J., Campisi, J., Samper, E., & Melov, S. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nature Cell Biology*, 5(8), 741–747. <https://doi.org/10.1038/ncb1024>

76. Pawlak, M., Lefebvre, P., & Staels, B. (2015). Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 62(3), 720–733. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.10.039>
77. Pérez-Estrada, J. R. (2019). Efecto de la ausencia de la catalasa en el metabolismo, el envejecimiento y el desarrollo de enfermedades metabólicas. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología, UNAM.
78. Pérez-Estrada, J. R., Hernández-García, D., Leyva-Castro, F., Ramos-León, J., Cuevas-Benítez, O., Díaz-Muñoz, M., ... Covarrubias, L. (2019). Reduced lifespan of mice lacking catalase correlates with altered lipid metabolism without oxidative damage or premature aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 135, 102–115. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.016>
79. Petriv, O. I., & Rachubinski, R. A. (2004). Lack of Peroxisomal Catalase Causes a Progeric Phenotype in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 19996–20001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400207200>
80. Piao, L., Choi, J., Kwon, G., & Ha, H. (2017). Endogenous catalase delays high-fat diet-induced liver injury in mice. *Korean J Physiol Pharmacol*, 21(3), 317–325. <https://doi.org/https://doi.org/10.4196/kjpp.2017.21.3.317>
81. Pike, L. & Wu, M. (2014). Rapid Analysis of Glycolytic and Oxidative Substrate Flux of Cancer Cells in Microplate. *PlosOne*, 9(10).
82. Platta, H. W., Hagen, S., Reidick, C., & Erdmann, R. (2014). Biochimie The peroxisomal receptor dislocation pathway : To the exportomer and beyond. *Biochimie*, 98, 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.12.009>
83. Platta, H. W., Brinkmeier, R., Reidick, C., Galiani, S., Clausen, M. P., & Eggeling, C. (2016). Regulation of peroxisomal matrix protein import by ubiquitination. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(5), 838–849. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.010>
84. Poullos, E., Trougakos, I. P., Chondrogianni, N., & Gonos, E. S. (2007). Exposure of human diploid fibroblasts to hypoxia extends proliferative life span. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1119(1), 9–19. <https://doi.org/10.1196/annals.1404.025>
85. Purdue, P. E., & Lazarow, P. B. (1996). Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence. *The Journal of Cell Biology*, 134(4), 849–862. <https://doi.org/10.1083/jcb.134.4.849>
86. Putman, C., Arvai, A., Bourne, Y., & Tainer, J. (2000). Active and Inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 296, 295–309. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3458>
87. Quan, F., Korneluk, R. G., Tropak, M. B., & Gravel, R. A. (1986). Isolation and Characterization of Human catalase gene. *Nucleic Acids Research*, 14(13), 5321–5335.
88. Reddy, J., & Hashimoto, T. (2001). Peroxisomal β -oxidation and peroxisome proliferator- activated receptor α : an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*, 21, 193–230. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133354>
89. Robbins, E., Levine, E. M., & Eagle, H. (1970). Morphologic changes accompanying senescence of cultured human diploid cells. *J Exp Med.*, 131(6), 1211–1222. <https://doi.org/10.1084/jem.131.6.1211>.
90. Rubio, M. A., Kim, S. H., & Campisi, J. (2002). Reversible manipulation of telomerase expression and telomere length: Implications for the ionizing radiation response and replicative senescence of human cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 28609–28617. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203747200>
91. Rucktäschel, R., Girzalsky, W., & Erdmann, R. (2011). Protein import machineries of peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(3), 892–900. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.07.020>
92. Ruijtenberg, S., & Heuvel, S. Van Den. (2016). Coordinating cell proliferation and differentiation : Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell Cycle*, 15(2), 196–212. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1120925>
93. Sadamoto, M. (1966). Nature of cultured cells of the skin from acatalasemic individuals with Takahara's disease. *Acta Medica Okayama*, 20, 193–202.
94. Sambrook, J (2001). *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
95. Sánchez-Cázares, L. M. (2020). Contribución de los oncogenes E6 y E7 a la reprogramación inducida por MKOS de células postmitóticas. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
96. Sani, M., Sebäi, H., Gadacha, W., Boughattas, N. A., Reinberg, A., & Mossadok, B. A. (2006). Catalase activity and rhythmic patterns in mouse brain, kidney and liver. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 145(3–4), 331–337. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.08.005>
97. Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
98. Schrader, M., Bonekamp, N. A., & Islinger, M. (2012). Fission and proliferation of peroxisomes. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1822(9), 1343–1357. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.014>
99. Shaffer, Jacquelin B. & Preston, K. E. (1990). Molecular analysis of an acatalasemic mouse mutant. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173(3), 1043–1050.
100. Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer*, 15(7), 397–408. <https://doi.org/10.1038/nrc3960>
101. Sheikh, F. G., Pahan, K., Khan, M., Barbosa, E., & Singh, I. (1998). Abnormality in catalase import into peroxisomes leads to severe neurological disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 2961–2966.
102. Shin, S. K., Cho, H. W., Song, S. E., Im, S. S., Bae, J. H., & Song, D. K. (2020). Oxidative stress resulting from the removal of endogenous catalase induces obesity by promoting hyperplasia and hypertrophy of white adipocytes. *Redox Biology*, 37(October), 101749. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101749>

103. Singh, I., Voigt, R. G., Sheikh, F. G., Kremser, K., & Brown, F. R. (1997). Biochemical Features of a Patient with Zellweger-like Syndrome with Normal PTS-1 and PTS-2 Peroxisomal Protein Import Systems : A New Peroxisomal Disease. *Biochemical and Molecular Medicine*, 207, 198–207.
104. Takahara, S., Hamilton, H. B., Neel, J. V., Kobara, T. Y., Ogura, Y., & Nishimura, E. T. (1960). Hypocatalasemia: a new genetic carrier state. *The Journal of Clinical Investigation*, 39, 610–619. <https://doi.org/10.1172/JCI104075>
105. Terlecky, S. R., Koepke, J. I., & Walton, P. A. (2006). Peroxisomes and aging. *Biochimica et Biophysica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.017>
106. Titorenko, V. I., & Terlecky, S. R. (2011). Peroxisome Metabolism and Cellular Aging. *Traffic*, 12(3), 252–259. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01144.x>
107. Tompers, D. M., & Labosky, P. A. (2014). Electroporation of Murine Embryonic Stem Cells: A Step-by-Step Guide. *Stem Cells*, 22, 243–249. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-3-243>
108. Torado, G. J. & Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development in established lines. *The Journal of Cell Biology*, 17, 299–313.
109. Tunster, S. J. (2017). Genetic sex determination of mice by simplex PCR. *Biology of Sex Differences*, 8(1), 6–9. <https://doi.org/10.1186/s13293-017-0154-6>
110. Van Veldhoven, P. P., & Baes, M. (2013). Peroxisome deficient invertebrate and vertebrate animal models. *Frontiers in Physiology*, 4 <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00335>
111. Walton, P. A., & Pizzitelli, M. (2012). Effects of peroxisomal catalase inhibition on mitochondrial function. *Frontiers in Physiology*, 3, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00108>
112. Walton, P. A., Brees, C., Lismont, C., Apanasets, O., & Fransen, M. (2017). The peroxisomal import receptor PEX5 functions as a stress sensor, retaining catalase in the cytosol in times of oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864(10), 1833–1843. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.07.013>
113. Wanders, R. J. A., Komen, J., & Kemp, S. (2011). Fatty acid omega-oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans. *FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07947.x>
114. Wang, B., Van Veldhoven, P. P., Brees, C., Rubio, N., Nordgren, M., Apanasets, O., ... Fransen, M. (2013). Mitochondria are targets for peroxisome-derived oxidative stress in cultured mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 882–894. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.173>
115. Wang, B., Wang, L., Gasek, N. S., Zhou, Y., Kim, T., Guo, C., Jellison, E. R., Haynes, L., Yadav, S., Tchkonja, T., Kuchel, G. A., Kirkland, J. L., & Xu, M. (2021). An inducible p21-Cre mouse model to monitor and manipulate p21-highly-expressing senescent cells in vivo. *Nature Aging*, 1(10), 962–973. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00107-6>
116. Wen, J. K., Osumi, T., Hashimoto, T., & Ogata, M. (1990). Molecular analysis of human acatalasemia. Identification of a splicing mutation. *Journal of Molecular Biology*, 211(2), 383–393. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90359-T](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90359-T)
117. Weydert, C. & Cullen, J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissues. *Nature Protocols*, 5(1) :51-66.
118. Wiley, C. D., Velarde, M. C., Lecot, P., Gerencser, A. A., Verdin, E., Wiley, C. D., ... Verdin, E. (2016). Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metabolism*, 23(2), 303–314. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.011>
119. Wood, C. S., Koepke, J. I., Teng, H., Boucher, K. K., Katz, S., Chang, P., ... Terlecky, S. R. (2006). Hypocatalasemic fibroblasts accumulate hydrogen peroxide and display age-associated pathologies. *Traffic*, 7(1), 97–107. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00358.x>
120. Yang, S., Shi, H., Chu, X., Zhou, X., & Sun, P. (2016). A rapid and efficient polyethylenimine-based transfection method to prepare lentiviral or retroviral vectors: useful for making iPS cells and transduction of primary cells. *Biothechnol Lett*.
121. Yao, G. (2014). Modelling mammalian cellular quiescence. In *Interface Focus* (Vol. 4, Issue 3). <https://doi.org/10.1098/rsfs.2013.0074>
122. Zámocký, M., & Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 72, 19–66.
123. Zeilinger, K., Freyer, N., Damm, G., Seehofer, D., & Knöspel, F. (2016). Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Experimental Biology and Medicine*, 241(15), 1684–1698. <https://doi.org/10.1177/1535370216657448>
124. Zhang, J., Kim, J., Alexander, A., Cai, S., Tripathi, D. N., Dere, R., ... Walker, C. L. (2013). A tuberous sclerosis complex signalling node at the peroxisome regulates mTORC1 and autophagy in response to ROS. *Nature Cell Biology*, 15(10), 1186–1196. <https://doi.org/10.1038/ncb2822>
125. Zhang, M., Cheng, L., Jia, Y., Liu, G., Li, C., Song, S., ... Huang, Y. (2016). Aneuploid embryonic stem cells exhibit impaired differentiation and increased neoplastic potential. *The EMBO Journal*, 35(21), 2285–2300. <https://doi.org/10.15252/embj.201593103>
126. Zhu, C., Xie, P., Zhao, F., Zhang, L., An, W., & Zhan, Y. (2014). Mechanism of the promotion of steatotic HepG2 cell apoptosis by cholesterol. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(10), 6807–6813.

Apéndices.

Apéndice 1: proliferación celular de fibroblastos embrionarios de ratón silvestres $Cat^{+/+}$ y mutantes $Cat^{-/-}$.



Fig. I | Crecimiento de 500,000 fibroblastos mutantes $Cat^{-/-}$ descongelaos. Las células descongelaos tuvieron menor capacidad proliferativa durante los primeros 10 pases, lo cual se relaciona con la adquisición de una morfología aplanada y alargada (Fig. III), que caracteriza a las células senescentes. En el P11 las células adquirieron una morfología normal (similar a un fibroblasto con capacidad proliferativa) y empezaron a proliferar de manera constante, alcanzando 27.3 duplicaciones poblacionales en el P25. Este fenómeno probablemente refleja un evento de inmortalización. Los fibroblastos se congelaron siguiendo el protocolo de extracción, se descongelaos en una caja de 57 cm^2 para permitir una ligera expansión, se sembraron 500,000 en una caja de 21 cm^2 (P2) y se sub-cultivaron. Con el objetivo de poder comparar, se observa la curva de duplicaciones poblacionales del cultivo de 500,000 células $Cat^{-/-}$ de cultivo primario que llegó a senescencia al P11.

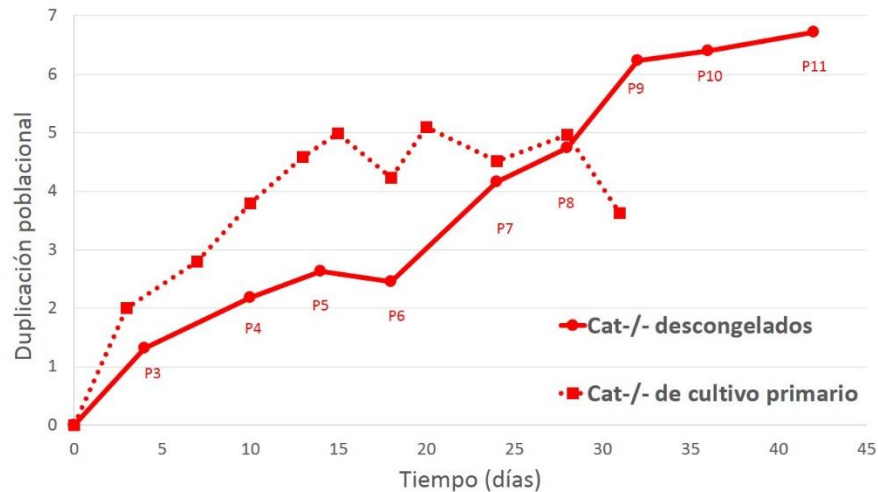
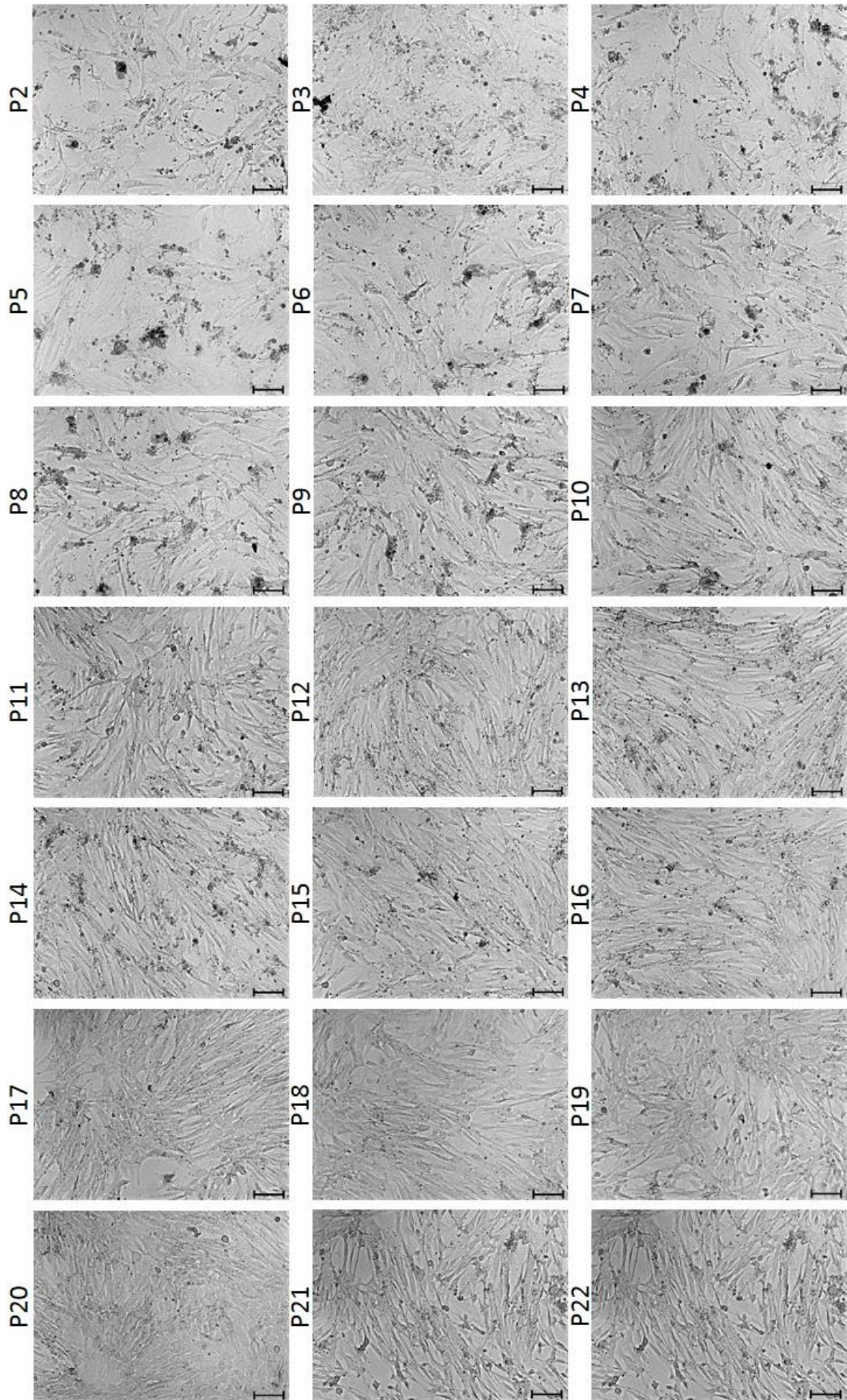


Fig. II | Crecimiento de 300,000 fibroblastos mutantes $Cat^{-/-}$ descongelaos. Las células descongelaos tuvieron menor capacidad proliferativa durante los primeros 6 pases respecto a las células de cultivo primario, pero posteriormente proliferaron hasta el P11 y alcanzaron 6.7 duplicaciones poblacionales. Obsérvese que entre cada pase de células descongelaos hubo un período de 4 y 6 días, lo cual difiere de las células de cultivo primario que se sub-cultivaron cada 2-3 días. Entre el pase 10 y 11 hubo un período de 6 días y se relacionó con la adquisición de una morfología aplanada y alargada (Fig. IV), por lo que se detuvo el experimento al día 42 y 6.7 duplicaciones poblacionales. Los fibroblastos se congelaron siguiendo el protocolo de extracción, se descongelaos en una caja de 57 cm^2 y sembraron 300,000 en una caja de 21 cm^2 (P2) y se sub-cultivaron. Con el objetivo de poder comparar, se observa la curva de duplicaciones poblacionales del cultivo de 500,000 células $Cat^{-/-}$ de cultivo primario que llegó a senescencia al P11.



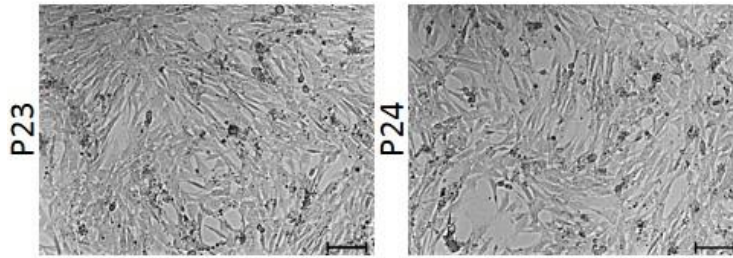


Fig. III | Morfología celular en el sub-cultivo de 500,000 MEF mutantes $Cat^{-/-}$ descongelados. Los fibroblastos se congelaron y las células que sobrevivieron la descongelación se transfirieron 500,000 en una caja de 21 cm^2 . Durante los primeros 9 pases, el cultivo presentó gran acumulación de desechos celulares y las células tuvieron una morfología aplanada y a largada, lo cual se relaciona con su bajo potencial de replicación (ver Fig. I). Sin embargo, en el pase 10 las células empezaron a proliferar y adquirir una morfología similar a células proliferativas. Obsérvese que, en los cultivos sub-confluentes, las células se orientaron paralelamente entre sí. Las células probablemente se inmortalizaron. La última fotografía corresponde al P24 y el último pase que se realizó fue el P25, cuando se detuvo el experimento. La escala corresponde a 100 μm .

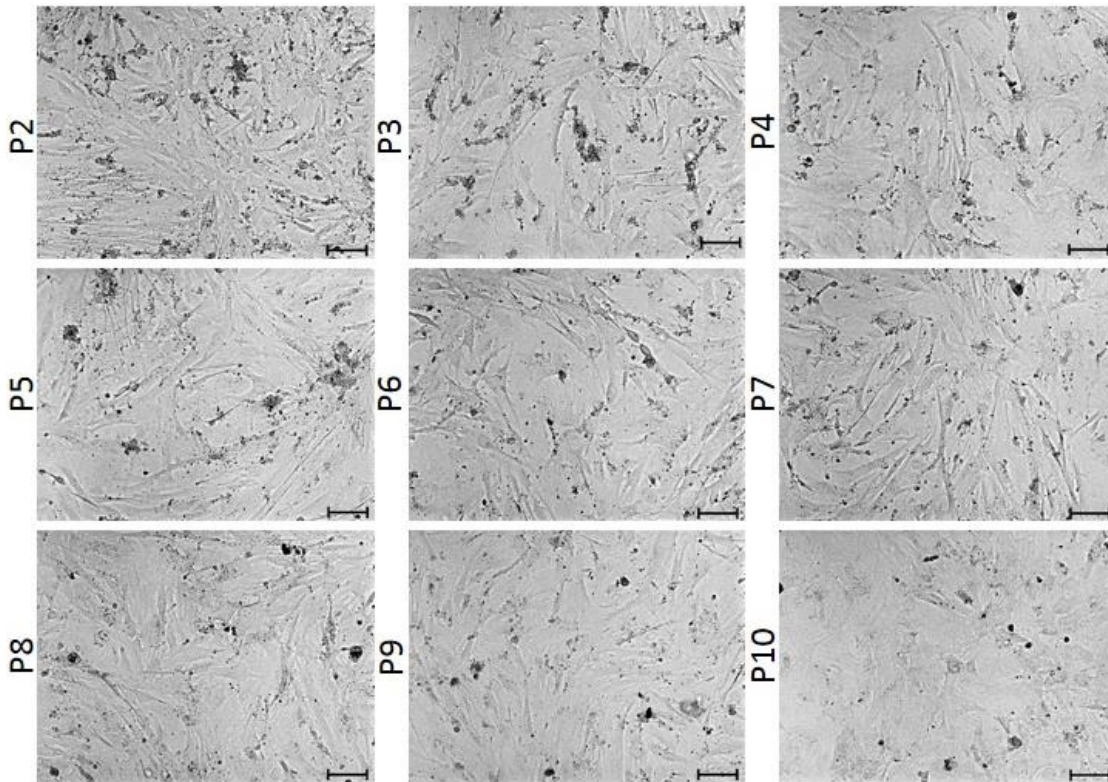


Fig. IV | Morfología celular en el sub-cultivo de 300,00 MEF mutantes $Cat^{-/-}$ descongelados. Las células descongeladas adquiriendo gradualmente una morfología alargada y aplanada. Durante los primeros pases el cultivo presentó una gran acumulación de desechos celulares y las células no proliferaron adecuadamente (ver Fig. II). En el P10 se observa que las células cubrieron completamente la superficie de cultivo, por lo que se realizó el pase 11 pero no se sub-cultivaron las células. Los fibroblastos se congelaron siguiendo el protocolo de extracción, se descongelaron en una caja de 10 cm y sembraron 300,000 en una caja de 21 cm^2 (P2) y se sub-cultivaron. La escala corresponde a 100 μm .

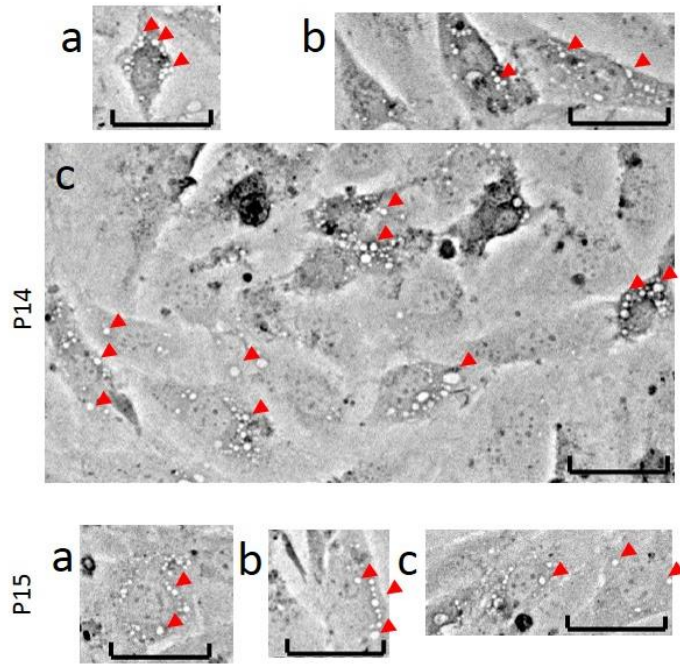


Fig. V | Magnificaciones de MEF mutantes $Cat^{-/-}$ en pases 14 y 15. Se observan estructuras vesiculares de diferentes tamaños en los pases 14 y 15. El cultivo corresponde a 1,000,000 células en dos cajas de 21 cm^2 . La escala corresponde a 50 μm .

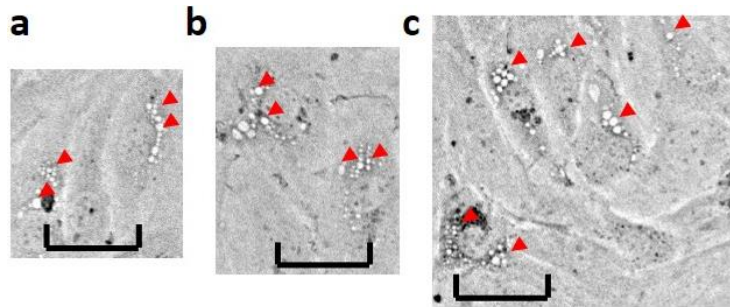


Fig. VI | Magnificaciones de MEF mutantes $Cat^{-/-}$ en pase 12. Se observan estructuras vesiculares de diferentes tamaños en el pase 12. El cultivo corresponde a 900,000 células en dos cajas de 21 cm^2 . La escala corresponde a 50 μm .

Apéndice 2: vectores empleados en biología molecular.

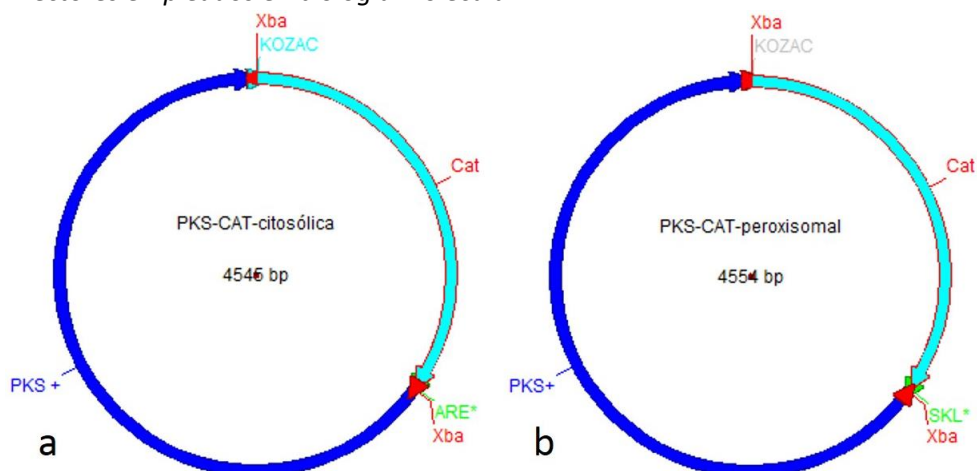


Fig. VII | Genes de catalasa peroxisomal y citosólica en vector PKS: a) vector PKS-Cat^c (4545 bp) contiene la catalasa citosólica; b) vector PKS-Cat^p (4554 pb) contiene la catalasa peroxisomal. Los productos de PCR se digirieron con la enzima XbaI en ambos extremos y se ligaron en el vector PKS+ digerido con XbaI.

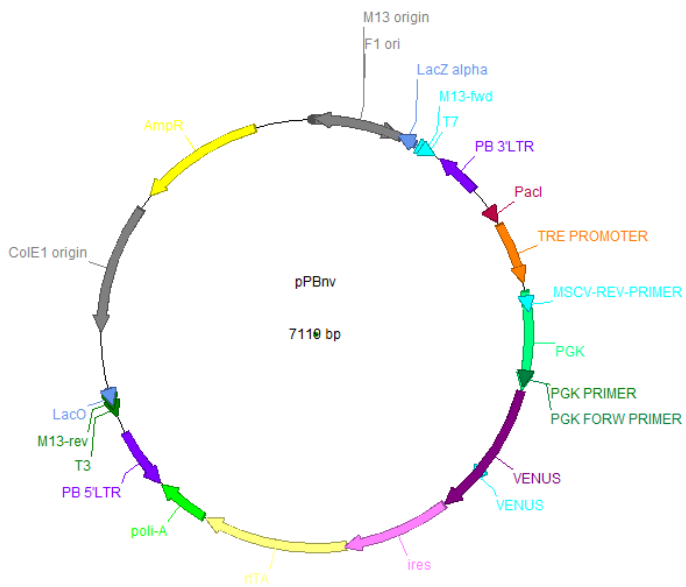
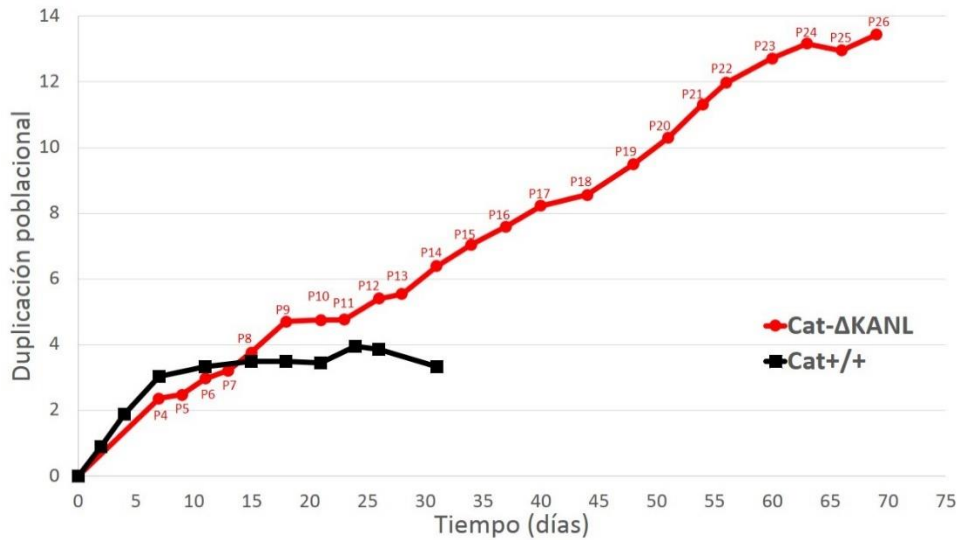
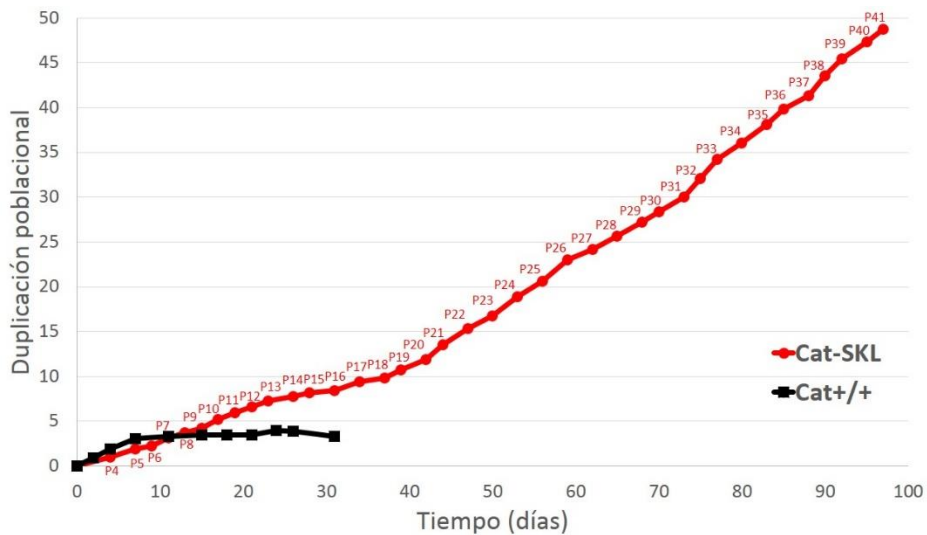


Fig. VIII | Vector pBooster. El gen de interés se inserta en el sitio múltiple de clonación localizado entre los promotores TRE y PGK.

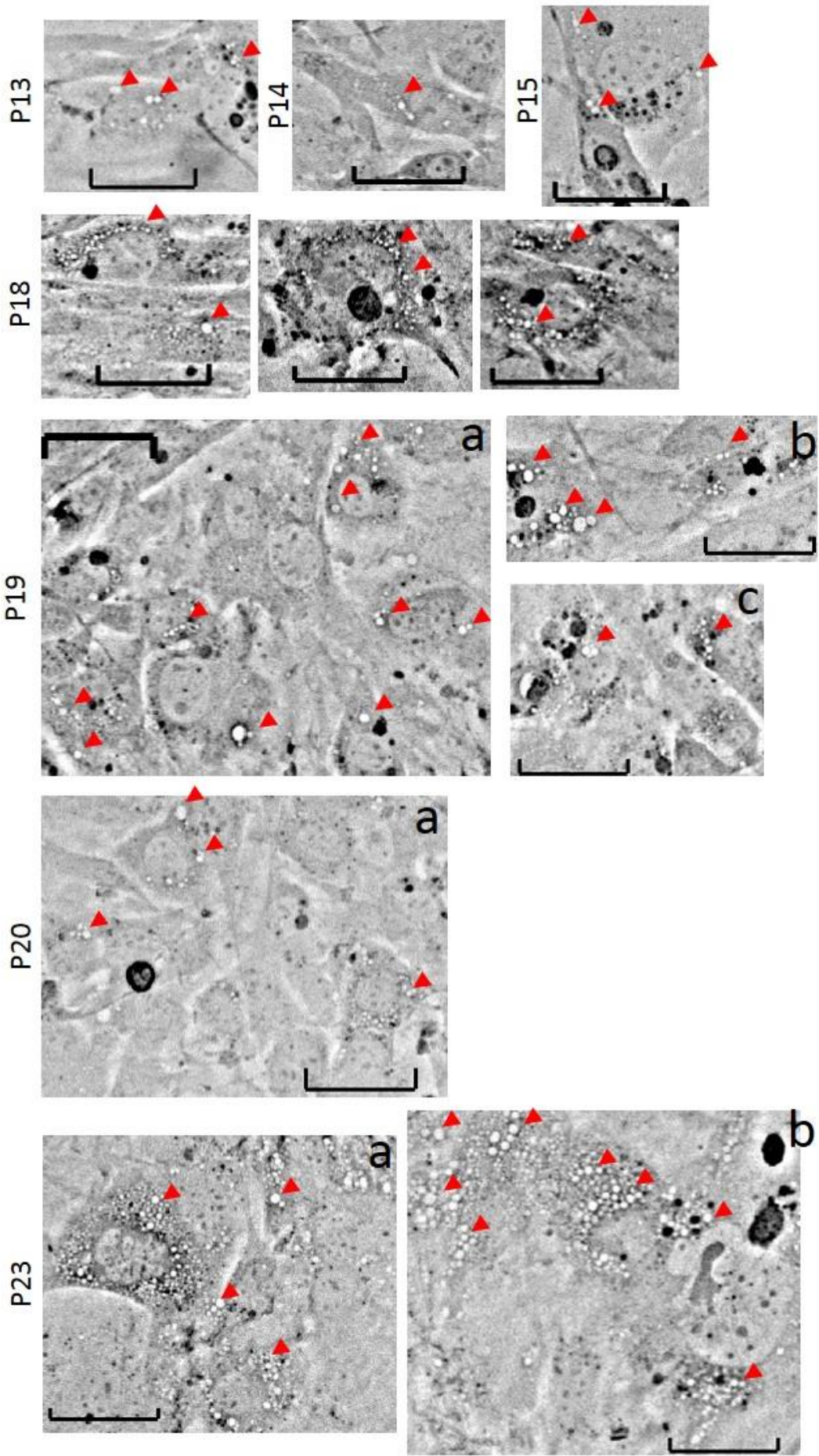
Apéndice 3: proliferación celular de fibroblastos embrionarios de ratón $Cat^{+/+}$ transfectados con las isoformas de catalasa.



Gráfica IX | Efecto de catalasa citosólica $Cat^{-}\Delta KANL$ sobre la proliferación celular de MEF silvestres $Cat^{+/+}$. Entre el P3 (caja de 35 mm) y el P4 (caja 6 cm) hubo un período de 7 días. Las células se mantuvieron proliferando constantemente hasta los pases 9-11 y alcanzaron 4.7 duplicaciones poblacionales. Posteriormente las células se mantuvieron proliferando hasta el pase 24. En el P26 se obtuvo un número reducido de células por lo que el subcultivo se detuvo. Se sembraron 500,000 células transfectadas con $Cat^{-}\Delta KANL$ una caja de 21 cm² y se sub-cultivaron hasta que dejaron de dividirse y adoptaron una morfología alargada y aplanada. Se mantuvo el cultivo con 1.5 μg de doxicilina por mililitro de medio. Para comparación también se observa la curva de duplicaciones poblacionales del cultivo de 500,000 fibroblastos silvestres que llegó a senescencia al P12.



Gráfica X | Efecto de catalasa peroxisomal Cat^P -SKL sobre la proliferación celular de MEF $Cat^{+/+}$. Los fibroblastos proliferaron constante hasta el pase 41 y superaron las 48 duplicaciones poblacionales. Debido a que probablemente las células se inmortalizaron, el cultivo se detuvo en el P41. Se sembraron 500,000 células transfectadas con Cat^P -SKL una caja de 21 cm² y se sub-cultivaron hasta que dejaron de dividirse y adoptaron una morfología alargada y aplanada. Se mantuvo el cultivo con 1.5 μg de doxicilina por mililitro de medio. Para comparación también se observa la curva de duplicaciones poblacionales del cultivo de 500,000 fibroblastos silvestres que llegó a senescencia al P12.



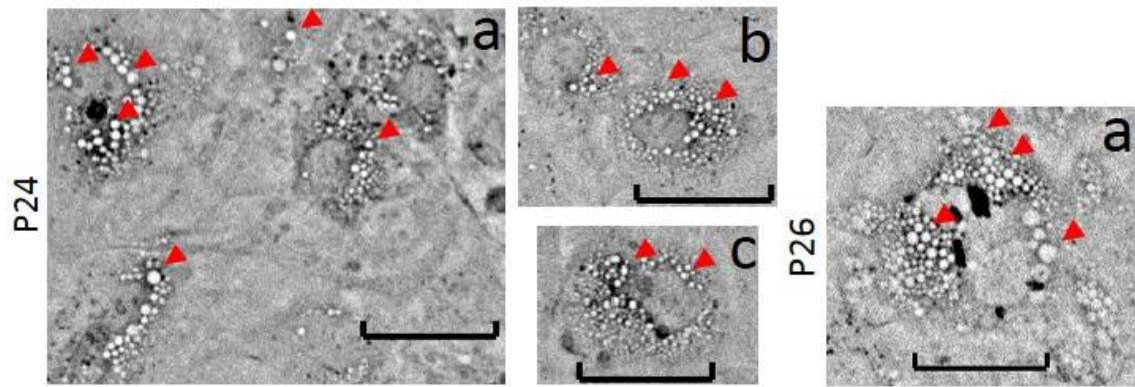


Fig. XI | Estructuras vesiculares en fibroblastos $Cat^{+/+}$ transfectados con catalasa citosólica $Cat^c-\DeltaKANL$. Durante pases intermedios (P13-15) un número escaso de células presentaron algunas vesículas en su citosol. En pases posteriores (P19-P26) el número de célula y el número y tamaño de vesículas por células aumentó. Las magnificaciones son de la Fig. 13. La escala corresponde a 50 μm .

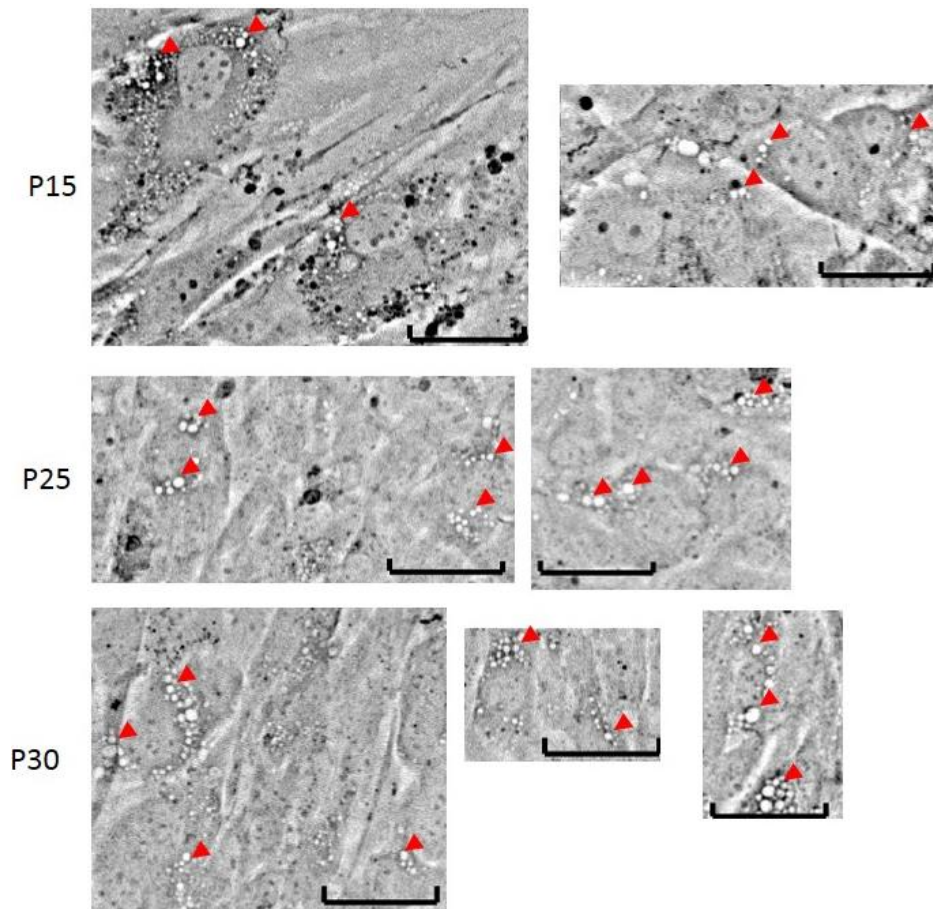


Fig. XII | Vesículas en fibroblastos $Cat^{+/+}$ transfectados con catalasa peroxisomal Cat^p-SKL . Vesículas citosólicas en los pases 15, 25 y 30 de algunas células transfectadas con Cat^p . Las magnificaciones son de la Fig. 14. La escala corresponde a 50 μm .

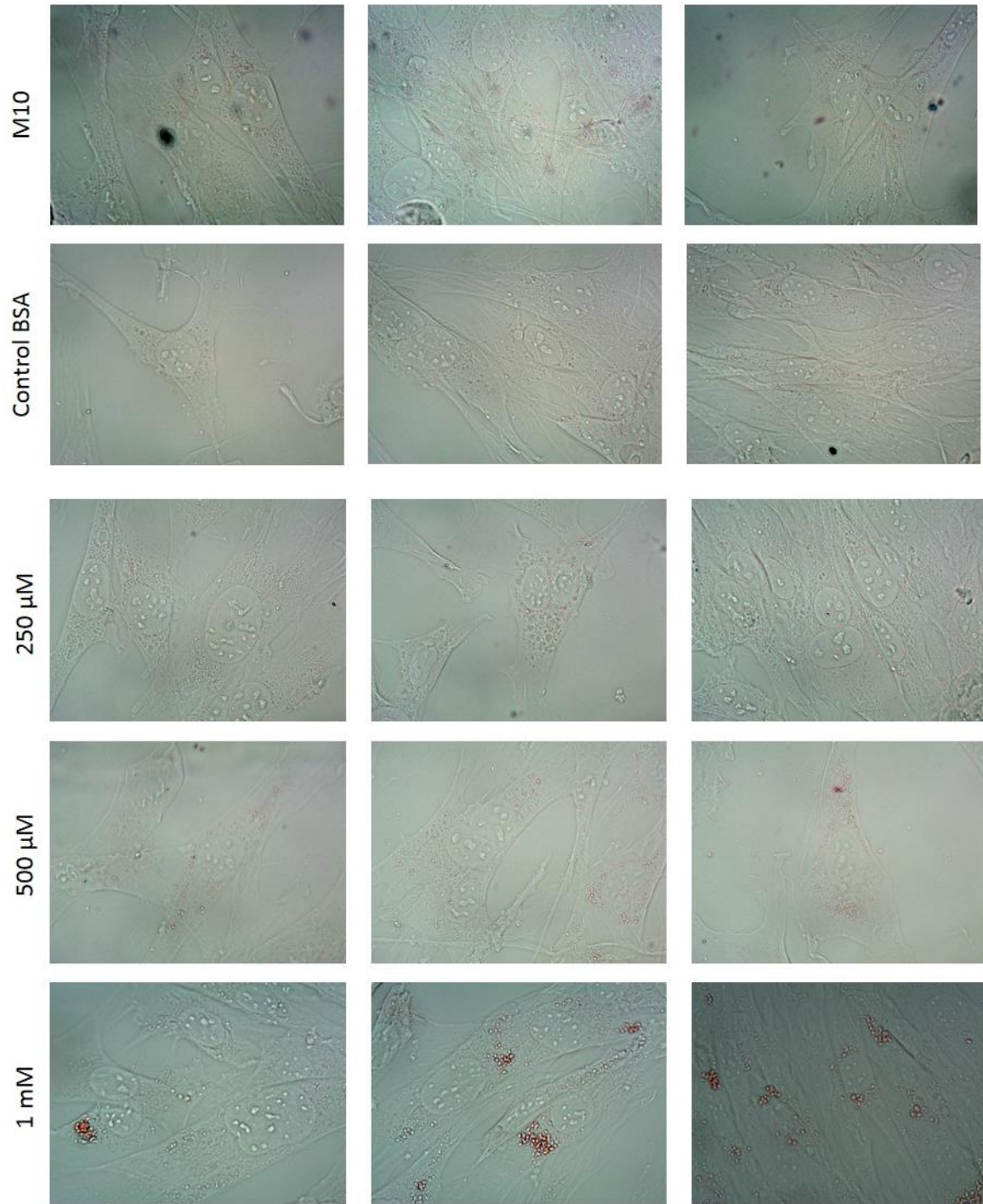


Fig. XIII | Acumulación de lípidos en fibroblastos $Cat^{+/+}$ transfectados con la isoforma de catalasa peroxisomal. Las células tratadas con 1mM de ácido palmítico tuvieron gran acumulación de lípidos. Con 500 μ M, hubo acumulación por fue menor. No parece haber diferencias entre el tratamiento con 250 μ M y los controles con BSA y medio M10. Los MEF son del pase 40. Las fotografías fueron tomadas en 100x.

Apéndice 4: derivación de células troncales embrionarias $Cat^{-/-}$

Tabla 3 | Pools, clonas y sub-clonas derivadas de ESC $Cat^{-/-}$

Nombre de pool, clona o subclona	Pase	Descripción
ESC $Cat^{-/-}$ EI	P1	Pool de ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EI, no genotipificado para sexo genético
ESC $Cat^{-/-}$ EI	P3	Pool de ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EI, no genotipificado para sexo genético
ESC $Cat^{-/-}$ EIII	P1	Pool de ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EIII, no genotipificado para sexo genético
ESC $Cat^{-/-}$ EII XY	P1	Pool de ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ EII XY	P2	Pool de ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ A1.EII	P4	Clona ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ A2.EII	P5	Clona ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ A2.EII	P7	Clona ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ A3.EII	P3	Clona ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ A5.EII	P3	Clona ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ A6.EII	P3	Clona ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ B1.EII	P4	Clona ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ B2.EII	P3	Clona ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ B3.EII	P3	Clona ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ B3.EII	P8	Clona ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ B6.EII	P3	Clona ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ C1.EII	P3	Clona ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ C2.EII	P4	Clona ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ C2.EII	P8	Clona ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ C4.EII	P3	Clona ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ C5.EII	P3	Clona ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC $Cat^{-/-}$ C6.EII	P3	Clona ESC $Cat^{-/-}$ derivado de embrión EII XY
ESC B4.EII Cat^p -SKL	P8	Pool ESC B4.EII transfectado con isoforma de catalasa peroxisomal
ESC B4.EII Cat^c - Δ KANL	P8	Pool ESC B4.EII transfectado con isoforma de catalasa citosólica
ESC A2.EII Cat^p -SKL	P10	Pool ESC A2.EII transfectado con isoforma de catalasa peroxisomal
ESC A2.EII Cat^c - Δ KANL	P10	Pool ESC A2.EII transfectado con isoforma de catalasa citosólica
ESC C2.EII Cat^p -SKL	P9	Pool ESC A2.EII transfectado con isoforma de catalasa peroxisomal

ESC C2.EII Cat ^P -SKL	P10	Pool ESC A2.EII transfectado con isoforma de catalasa peroxisomal
ESC C2.EII Cat ^c -ΔKANL	P9	Pool ESC C2.EII transfectado con isoforma de catalasa citosólica
ESC C2.EII Cat ^c -ΔKANL	P10	Pool ESC C2.EII transfectado con isoforma de catalasa citosólica
ESC Cat-SKL1	P4	ESC subclona 1 transfectada con con isoforma de catalasa peroxisomal
ESC Cat-SKL2	P4	ESC subclona 2 transfectada con con isoforma de catalasa peroxisomal
ESC Cat-SKL3	P4	ESC subclona 3 transfectada con con isoforma de catalasa peroxisomal
ESC Cat-SKL4	P4	ESC subclona 4 transfectada con con isoforma de catalasa peroxisomal
ESC Cat-ΔKANL 1	P4	ESC subclona 1 transfectada con con isoforma de catalasa citosólica
ESC Cat-ΔKANL 2	P4	ESC subclona 2 transfectada con con isoforma de catalasa citosólica
ESC Cat-ΔKANL 3	P4	ESC subclona 3 transfectada con con isoforma de catalasa citosólica
ESC Cat-ΔKANL 4	P4	ESC subclona 4 transfectada con con isoforma de catalasa citosólica