



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ANÁLISIS DEL RETROTRANSPOSÓN LINE-1
COMO MARCADOR DE SENESCENCIA EN EL
MODELO MURINO DE ENVEJECIMIENTO
ACELERADO ZMPSTE24 -/-**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

TANIA VALDIVIA HERRERA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. YAIR ROMERO LÓPEZ**

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1. Datos de la alumna:

Valdivia
Herrera
Tania
56224800 ext 84075
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
418003798

2. Datos del tutor

Dr.
Yair
Romero
López

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Gustavo
Ramírez
Martínez

4. Datos del sinodal 2

M. en C.
Ana Paulina
Mendoza
von der Borch

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Annie
Pardo
Cemo

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Beatriz
Aguilar
Maldonado

7. Datos del trabajo escrito

Análisis del retrotransposon LINE-1 como marcador de senescencia en el modelo murino de envejecimiento acelerado Zmpste24 -/-
54 p.
2023

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por brindarme mi formación profesional y darme algunos de los mejores años de mi vida.

A la Dra. Annie Pardo y al Dr. Moisés Selman por el apoyo, la apertura y la oportunidad de integrarme al Laboratorio de Fibrosis.

A mi tutor, el Dr. Yair Romero y a la maestra Remedios Ramírez por haber sido mis mentores; por todo el apoyo, conocimiento y sabiduría que me han brindado, y por acogerme en el laboratorio.

A Uriel, a Fernanda, a Ángeles, y a todas y todos los integrantes del laboratorio que hicieron este proyecto posible.

A mi comité sinodal por sus comentarios y contribuciones que mejoraron este trabajo.

Al Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT), al Bioterio y al Laboratorio de Biopatología Pulmonar del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

A mi familia: a mis papás, por guiarme, quererme, acompañarme en todo momento, e inspirarme a ser mejor, les dedico a ustedes este logro. A Andrea por siempre creer en mí, y por el amor y apoyo incondicional.

Este proyecto fue posible gracias a Conacyt Ciencia de Frontera #51219

ÍNDICE

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
Características celulares y moleculares del envejecimiento	9
Senescencia celular	10
Arresto del ciclo celular	12
SASP	13
Senescencia celular durante el envejecimiento	14
Marcadores de la senescencia celular	15
Beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal)	16
Elementos genéticos móviles y LINE-1	17
Estructura de LINE-1	18
LINE-1 durante el envejecimiento y la senescencia celular	19
Fibrosis Pulmonar Idiopática	20
Patogénesis	20
FPI y senescencia celular	21
LINE-1 en patologías asociadas al envejecimiento	22
Modelo murino de envejecimiento acelerado: ratón Zmpste24 -/-	23
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS PARTICULARES	26
MÉTODOS	27
Modelos de estudio	27
Aislamiento de fibroblastos de ratón Zmpste24 -/-	27
Obtención de RNA y síntesis de cDNA	29
RT-qPCR	30
Ensayo de beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA β-gal)	31

Inmunofluorescencia (IF).....	31
Inmunohistoquímica (IHC).....	32
Análisis estadístico	33
RESULTADOS	34
Los fibroblastos derivados del ratón Zmpste24 -/- presentan mayor senescencia comparados con ratones wild type	34
El elemento LINE-1 colocaliza con la actividad de beta-galactosidasa asociada a senescencia de forma similar a p16 en fibroblastos pulmonares de ratón Zmpste24 -/-	36
Algunas líneas de fibroblastos senescentes de ratón Zmpste24 -/- presentan una alta expresión de LINE-1	41
El elemento LINE-1 se encuentra principalmente en el epitelio pulmonar de ratón Zmpste24 -/-.....	41
El elemento LINE-1 está presente en tejido pulmonar con fibrosis pulmonar idiopática	42
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES.....	48
REFERENCIAS	49

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y TABLAS

ILUSTRACIÓN 1. INTERCONEXIONES FUNCIONALES ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DEL ENVEJECIMIENTO.....	10
TABLA 1. MARCADORES Y TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE LA SENESCENCIA CELULAR.....	15
ILUSTRACIÓN 2. ESTRUCTURA DEL ELEMENTO LINE-1 EN HUMANOS Y EN RATÓN.....	18

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. COMPARACIÓN DE ACTIVIDAD DE BETA-GALACTOSIDASA ASOCIADA A SENESCENCIA EN FIBROBLASTOS PULMONARES DE RATÓN WILD TYPE Y ZMPSTE24 -/-	35
FIGURA 2. COLOCALIZACIÓN DE ACTIVIDAD DE SA-B-GAL Y LINE-1 EN FIBROBLASTOS PULMONARES DE RATÓN ZMPSTE24 -/- Y RATÓN WILD TYPE	37
FIGURA 3. COLOCALIZACIÓN DE ACTIVIDAD DE SA-B-GAL Y P16 EN FIBROBLASTOS PULMONARES DE RATÓN ZMPSTE24 -/- Y RATÓN WILD TYPE	39
FIGURA 4. EXPRESIÓN RELATIVA DE LINE-1 EN FIBROBLASTOS DE RATÓN WILD TYPE VS. RATÓN ZMPSTE24 -/-	40
FIGURA 5. DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL ELEMENTO LINE-1 EN TEJIDO PULMONAR DERIVADO DE RATÓN WILD TYPE, RATÓN ZMPSTE24 -/- JOVEN, Y RATÓN ZMPSTE24 -/- VIEJO	42
FIGURA 6. DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL ELEMENTO LINE-1 EN TEJIDO PULMONAR DERIVADO DE PACIENTES CON FPI Y TEJIDO PULMONAR NORMAL	44

ABREVIATURAS

BSA	albúmina de suero bovino
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
CDK	cinasa dependiente de ciclina
Ct	valor umbral de ciclo
DDR	respuesta al daño en el DNA
DMEM	medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucleico
EpCAM	molécula de adhesión de células epiteliales
FBS	suero fetal bovino
FPI	Fibrosis Pulmonar Idiopática
HBSS	solución balanceada de sales Hanks
IF	Inmunofluorescencia
IHC	Inmunohistoquímica
kb	kilobase
kDa	kilodalton
KO	<i>knockout</i>
LINE-1, L1	<i>Long Interspersed Element-1</i> (elementos nucleares dispersos largos)
LTRs	repeticiones terminales largas
MACS	clasificación celular activada magnéticamente
ORF	marco de lectura abierto
PBS	buffer fosfato salino
PBST	buffer fosfato salino con tween
pRB	proteína del retinoblastoma
RNA	ácido ribonucleico
ROS	especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
RT-qPCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SA- β -gal	beta galactosidasa asociada a senescencia
SAHFs	focos de heterocromatina asociados a senescencia
SASP	fenotipo de secreción asociado a senescencia
UTR	región no traducida
WT	<i>wild type</i> (silvestre)
Zmpste24	metaloproteasa de zinc STE24

RESUMEN

La senescencia celular es un estado celular caracterizado por un arresto irreversible del ciclo celular, y puede ser desencadenada por daño en el DNA, acortamiento de los telómeros y/o activación de retrotransposones como LINE-1 (*Long Interspersed Element-1*), el único retrotransposón autónomo activo que constituye el 17% del genoma humano. La actividad de LINE-1 representa un riesgo para la estabilidad genómica y puede contribuir a enfermedades asociadas al envejecimiento, como lo es la Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI), una enfermedad del intersticio pulmonar crónica, irreversible y generalmente letal; donde el envejecimiento es el principal factor de riesgo y conductor de esta enfermedad. El objetivo de esta tesis fue determinar si el elemento LINE-1 se encuentra en células senescentes de pulmón en el modelo murino de envejecimiento acelerado *Zmpste24* *-/-*. Para ello, se realizó una técnica de inmunotinción secuencial, mediante ensayos de SA- β -gal seguido de inmunofluorescencia para LINE-1 o p16 en fibroblastos de ratón *Zmpste24* *-/-*. LINE-1 también se examinó en tejido pulmonar de ratón y tejido pulmonar de humano con FPI mediante inmunohistoquímica. En nuestros resultados, se observó un aumento significativo de la senescencia en fibroblastos de ratones KO en comparación con los controles WT por actividad de SA- β -gal y p16. Además, se encontró que la actividad de LINE-1 colocaliza con SA- β -gal en fibroblastos de ratón *Zmpste24* *-/-*, lo que sugiere un vínculo entre LINE-1 y la senescencia celular. Notablemente, LINE-1 se halló en tejido pulmonar de pacientes con FPI. Estos resultados sugieren un vínculo entre la activación de LINE-1 y la senescencia celular, lo que otorga a LINE-1 un papel potencial como marcador de senescencia en el contexto de las enfermedades pulmonares asociadas con el envejecimiento.

INTRODUCCIÓN

Características celulares y moleculares del envejecimiento

El envejecimiento puede definirse como el deterioro funcional dependiente del tiempo que ocurre gradualmente a nivel celular y del organismo y que afecta a la mayoría de los seres vivos (1, 2). Está acompañado de la pérdida de la homeostasis tisular, la disminución de la capacidad regenerativa, el deterioro de la función general de los órganos y un mayor riesgo de desarrollar enfermedades asociadas con la edad avanzada (3).

Lopez-Otín y sus colaboradores en 2013 inicialmente definieron nueve características biológicas distintivas que contribuyen al proceso de envejecimiento y determinan el fenotipo del mismo, las cuales agruparon en tres categorías (ilustración 1). Las primarias, que incluyen la inestabilidad genómica, el acortamiento de los telómeros, las alteraciones epigenéticas y la pérdida de la proteostasis, son aquellas que se consideran las causas del daño celular y tienen un efecto completamente negativo. Las antagónicas, que incluyen la desregulación del censado de nutrientes, la disfunción mitocondrial y la senescencia celular, las cuales se consideran respuestas de protección iniciales al daño ocasionado por las primarias, sin embargo, si estas respuestas se exacerban se vuelven deletéreas. Por último, las integrativas, que abarcan el agotamiento de células troncales y la alteración de la comunicación celular, son el resultado de los daños acumulados por las primeras dos y están asociadas directamente al declive funcional del envejecimiento (2). En 2023 se publicó una revisión y actualización, donde se añadieron tres características adicionales. Dentro de las características primarias se incluyó la inhabilitación de la autofagia, y dentro de las características integrativas se incluyó la inflamación crónica y la disbiosis (4).

A partir de la elucidación de estos mecanismos moleculares que conducen el proceso del envejecimiento, es posible estudiar y proponer nuevos blancos para la intervención terapéutica.

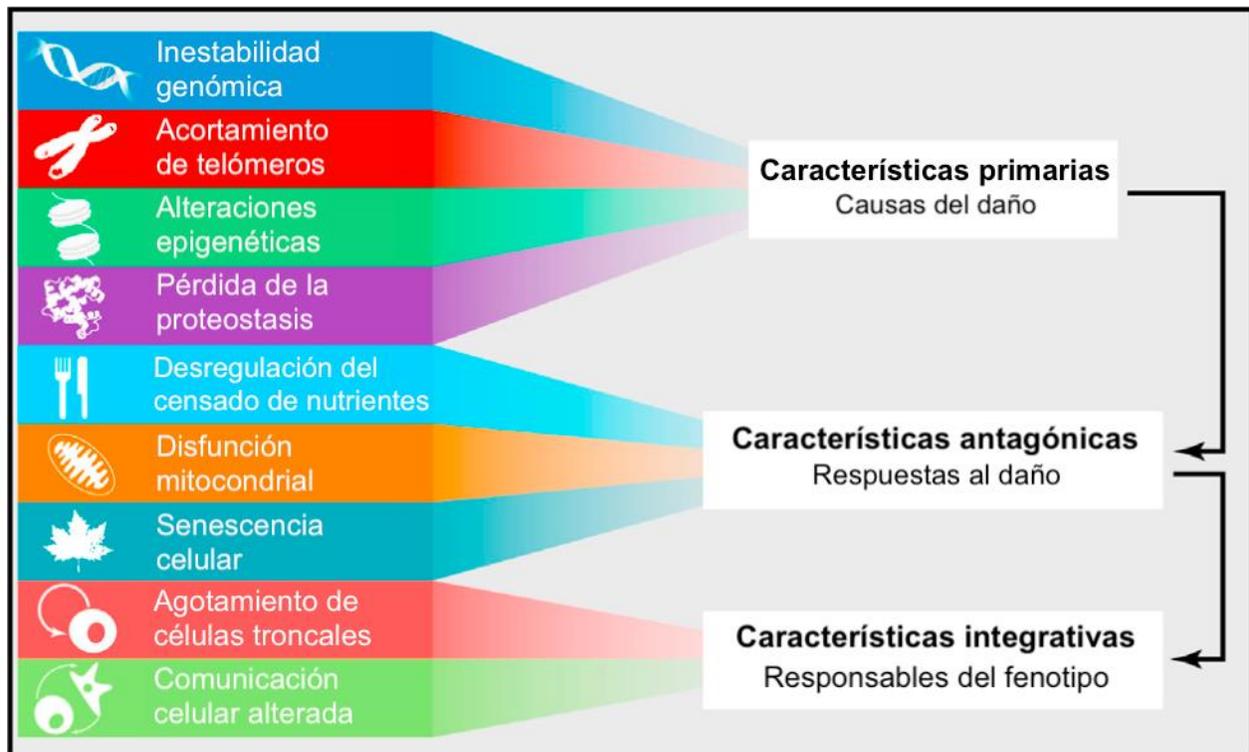


Ilustración 1. Interconexiones funcionales entre las características distintivas del envejecimiento. Obtenida y traducida de López-Otín et al. *Cell* 153, 1194-1217 (2013).

Senescencia celular

Como se mencionó anteriormente, la senescencia celular constituye una de las características distintivas del envejecimiento. Es un estado celular distinguido por el arresto irreversible del ciclo celular, que puede ser desencadenado por diversos factores de estrés intrínsecos y extrínsecos, como los son el daño al DNA, acortamiento de los telómeros, estrés oxidativo, activación de oncogenes, hipoxia, cambios epigenéticos, disfunción mitocondrial, entre otros (5). Estos estímulos o factores de estrés pueden inducir el fenotipo de senescencia de distintas formas, algunos ejemplos son la senescencia replicativa, la senescencia inducida por oncogenes (OIS), senescencia inducida por estrés oxidativo, senescencia inducida por radiación, senescencia inducida epigenéticamente, senescencia asociada a la disfunción mitocondrial (MiDAS), entre otras. Cabe resaltar que algunos de estos modelos de senescencia solo se han podido

observar *in vitro* (6). Otras características distintivas de las células senescentes incluyen la resistencia a la apoptosis, alteraciones metabólicas, daño macromolecular y el desarrollo de un fenotipo de secreción asociado a senescencia (SASP, por sus siglas en inglés) (5, 7, 8).

Las células senescentes también presentan algunas alteraciones morfológicas particulares. El aumento del tamaño celular es una característica conservada en la senescencia replicativa. Las líneas celulares primarias humanas tienen un aumento del tamaño celular cuando entran en un arresto permanente del ciclo celular y senescencia (9). Otras alteraciones observables en células senescentes *in vitro* incluyen una morfología irregular y aplanada, y cambios en la estructura nuclear (10). Las células senescentes también presentan un incremento de material granular, probablemente debido a las alteraciones metabólicas (11).

La senescencia puede tener efectos beneficiosos o deletéreos, dependiendo del contexto fisiológico. En principio, la senescencia celular actúa como un mecanismo de supresión tumoral, al promover el arresto de la proliferación celular como respuesta al daño celular o al estrés oncogénico. Las células senescentes también juegan un papel importante en múltiples procesos fisiológicos como el desarrollo de tejidos y órganos durante la embriogénesis, en la regeneración y reparación tisular en los organismos adultos (12, 13) y en la secreción de insulina por las células beta pancreáticas (14). Sin embargo, la evidencia indica que la senescencia descontrolada, o los efectos acumulados de la senescencia crónica promueven las patologías degenerativas relacionadas con el envejecimiento.

Estas propiedades aparentemente paradójicas de la senescencia celular son explicadas por la teoría evolutiva de la pleiotropía antagónica (15, 16). Esta teoría postula que los rasgos seleccionados para asegurar la supervivencia de los organismos jóvenes, en entornos naturales en los que la esperanza de vida es corta, pueden volverse perjudiciales en los entornos “protegidos” actuales, donde la esperanza de vida es significativamente mayor. Los genes pleiotrópicos antagónicos, con efectos positivos tempranos, son favorecidos por la selección aunque estos genes puedan tener efectos negativos en edades avanzadas. Dado que la contribución de un carácter a la aptitud es una combinación tanto de la magnitud de su efecto, como de la probabilidad de sobrevivir

para verse afectado por él, un efecto beneficioso temprano, aunque pequeño, en la vida de un organismo puede superar un efecto deletéreo tardío (13, 17). De este modo, los efectos positivos de la senescencia celular son dominantes en los primeros años de vida antes de la edad reproductiva. Después de esto, en edades avanzadas, la presión selectiva para que la senescencia celular sea beneficiosa desaparece, y el estrés celular y ambiental acumulativo revela su lado deletéreo (15).

Arresto del ciclo celular

El arresto del ciclo celular durante la senescencia está mediado en gran parte por la activación de una o ambas vías supresoras de tumores p53/p21^{WAF1/CIP1} y p16^{INK4A}/pRB. Dichas vías mantienen el estado de senescencia principalmente al inducir cambios en la expresión génica, ya que p53 y pRB son reguladores transcripcionales importantes. Ambas vías actúan de manera conjunta e interconectada para bloquear el ciclo celular e inducir la senescencia. La activación de una o ambas vías para la inducción y mantenimiento de la senescencia depende del tipo de señal de estrés y el tejido. p21^{WAF1/CIP1} actúa río abajo de p53, mientras que p16^{INK4A} actúa río arriba de pRB. La sobre expresión prolongada de cualquiera de estos cuatro elementos es suficiente para inducir la senescencia celular. Cabe mencionar que los distintos estímulos o factores de estrés pueden iniciar la inducción del arresto del ciclo celular a través de otras vías o mecanismos que convergen con alguna o ambas la de las vías p53/p21^{WAF1/CIP1} y p16^{INK4A}/pRB (18, 19).

La respuesta constitutiva al daño en el DNA, que puede ser desencadenada por rupturas de doble cadena, el acortamiento de los telómeros, radiación, entre otros factores de estrés, lleva a la activación de p53, que a su vez estimula la expresión de p21^{WAF1/CIP1}, lo que detiene el ciclo celular de forma inicial. p21^{WAF1/CIP1} se une e inhibe a la cinasa CDK2, lo que ocasiona que la proteína del retinoblastoma (pRB) permanezca hipofosforilada y activa. De igual forma, la proteína antitumoral p16^{INK4A} se une e inhibe a CDK6 y/o CDK4, inhibiendo la fosforilación de pRB. Cuando el pRB se desfosforila, se une a factores de transcripción E2F formando el complejo represor RB-E2F. Estos complejos represores inhiben la transcripción de los genes necesarios para la progresión del ciclo celular, al

unirse a las regiones promotoras de los genes blanco de E2F y al reclutar deacetilasas de histonas (19, 20). La expresión de p21^{WAF1/CIP1} no se mantiene en las células senescentes, puesto que su expresión se requiere principalmente para la inducción inicial del arresto del ciclo celular, mientras que la permanencia del arresto es mantenida por p16^{INK4A}, que se acumula en las células senescentes (5, 21). De este modo, es posible utilizar a la proteína p16 como marcador de senescencia.

SASP

Como se mencionó anteriormente, una de las características distintivas de las células senescentes es que son metabólicamente activas, y desarrollan un complejo fenotipo de secreción asociado a senescencia (SASP). Este fenotipo consiste en la secreción de numerosos factores como citocinas proinflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento, proteasas, componentes de la matriz extracelular, y otras moléculas como especies reactivas de oxígeno (22). El SASP es notablemente variable y plástico, sus componentes dependen del tipo de célula y del inductor de la senescencia, además es dinámico, con características que cambian a lo largo del tiempo (13).

El SASP es un mediador importante de los efectos patofisiológicos de las células senescentes y también está estrechamente relacionado con los efectos beneficiosos de la senescencia (12). Los factores del SASP son capaces de reforzar la senescencia e inducir senescencia a células vecinas a través de mecanismos de señalización autocrinos y paracrinos (11, 23), pueden estimular la permanencia del arresto del ciclo celular, promover la comunicación aberrante entre las células circundantes y están involucrados en la remodelación de la matriz extracelular (24).

Estas funciones biológicas de las células senescentes dependen en gran medida de su capacidad para comunicarse con el entorno a través de diversos procesos de comunicación intercelular, incluyendo los factores del SASP. A medida que el daño se acumula en los tejidos y órganos, el número de células senescentes y las moléculas del SASP continúan aumentando. Este proceso puede resolverse mediante la eliminación de células senescentes por el sistema inmunológico, ya que varios de los factores del SASP son proinflamatorios y pueden reclutar a células inmunitarias como macrófagos, células

NK, neutrófilos y linfocitos T, que permiten la eliminación de las células senescentes y de otras células dañadas. Sin embargo, durante el envejecimiento se da una disminución de la función inmunitaria denominada inmunosenescencia, lo que limita la eliminación de células senescentes y exacerba la inflamación local (10, 20, 25). Aunado a esto, existe evidencia que indica que las señales del SASP pueden otorgar resistencia a las células senescentes para evadir la eliminación inmunitaria (26). De este modo, el SASP puede potenciar la acumulación de células senescentes e impedir su eliminación, y al mismo tiempo amplificarse, provocando un ambiente de inflamación crónica y factores de estrés adicionales que inducen la senescencia de forma paracrina, lo que ocasiona un ciclo de retroalimentación positiva (11).

Senescencia celular durante el envejecimiento

Se ha observado que las células senescentes se acumulan con la edad en múltiples tejidos tanto de humanos como de roedores, y numerosas patologías relacionadas con el envejecimiento se han asociado con la senescencia celular, incluyendo aterosclerosis, osteoartritis, cáncer, diabetes tipo 2, enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis pulmonar idiopática (10, 18, 21, 27). Las células senescentes pueden influir en la patogénesis o la progresión de las enfermedades relacionadas con el envejecimiento por distintos mecanismos. La senescencia celular puede afectar tanto a células diferenciadas, como a células troncales y progenitoras. El arresto del ciclo celular en estas células lleva a su agotamiento, limitando la capacidad regenerativa de los tejidos e interfiere con el funcionamiento y la homeostasis tisular. La combinación de la eliminación ineficiente de las células senescentes, su acumulación en los tejidos, el SASP excesivo que estimula la inflamación crónica y la inducción de senescencia paracrina, y la disminución del potencial regenerativo de las células troncales, promueve la disfunción de los tejidos y órganos durante el envejecimiento y puede contribuir a múltiples patologías asociadas al envejecimiento (28, 29).

Marcadores de la senescencia celular

Como se mencionó anteriormente, existen múltiples y diversos factores de estrés y/o estímulos que desencadenan la senescencia celular, así como distintos tipos de senescencia. Esto ocasiona que el fenotipo senescente sea altamente heterogéneo, dinámico y complejo, pues no todas las células senescentes presentan las mismas características distintivas de la senescencia (30). Por ello, existen múltiples marcadores y técnicas para identificar las células senescentes con base en algunas de las distintas propiedades que muestran estas células (tabla 1).

Tabla 1. Marcadores y técnicas para la detección de la senescencia celular.
Obtenida y modificada de Hernandez-Segura et al. *Trends Cell Biol.* 28, 436-453 (2018).

Propiedades de las células senescentes	Marcador o técnica de detección
Respuesta al daño en el DNA (DDR)	Detección de focos de daño al DNA a través la tinción de γ -H2AX o de la proteína de unión a p53 (TP53BP1).
Arresto del ciclo celular	Ensayo del potencial de proliferación de las células mediante la medición de su potencial de formación de colonias o de la tasa de síntesis de DNA mediante ensayos de incorporación de BrdU/EdU. Evaluación del nivel de expresión de los inhibidores de CDKs: p16 y p21.
SASP	Se utilizan como marcadores citocinas (ej. IL-1 α , IL-6, IL-8), quimiocinas (ej. CCL2, CXCL) y metaloproteasas (ej. MMP-1 y MMP-3). También se puede utilizar inmunotinción o ELISA para medir la expresión proteica y la secreción de algunos de estos factores.
Alteraciones lisosomales	Ensayo de beta-galactosidasa asociada a senescencia. Tinción de cúmulos lisosomales de lipofuscina con negro sudán B.

Alteraciones nucleares	Focos de heterocromatina asociados a senescencia (SAHFs), que se pueden observar como regiones oscuras en el núcleo, al teñir con DAPI. También se pueden detectar utilizando marcadores de heterocromatina como H3K9me3 y HP1 γ . Evaluación de niveles de lamina B1, que se encuentra disminuida en células senescentes.
Resistencia a la apoptosis	La sobre regulación de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-w o Bcl-xL, permite que puedan ser utilizadas como marcadores.
Alteraciones mitocondriales	En las células senescentes, el número y el tamaño mitocondrial incrementa, así como la producción de ROS, la fosforilación oxidativa y el consumo de oxígeno. Es posible utilizar ensayos de estado redox, de función mitocondrial y de biogénesis mitocondrial (11).

Aunado a esto, algunas de las características moleculares y morfológicas asociadas a la senescencia también se pueden encontrar en otros estados o procesos celulares, como la regulación positiva del supresor de tumores p16^{INK4A}, la activación de DDR y cambios en la heterocromatina (10). Por estas razones, a pesar de la gran variedad de marcadores que existen, ninguno es universal, ni completamente específico, por lo que es recomendable utilizar la combinación de más de uno para corroborar el estado senescente de las células. Esto representa una de las limitaciones y retos para la detección de las células senescentes.

Beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal)

La beta galactosidasa es una hidrolasa lisosomal con actividad enzimática óptima a un pH de 4.0 - 4.5 en las células normales, mientras que en las células senescentes se puede detectar actividad enzimática a pH 6.0 (21). Esta diferencia permitió el desarrollo de un ensayo colorimétrico para la detección de estas células y se ha vuelto un biomarcador canónico de la senescencia celular. Esta detección se logra a través de la adición del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal),

el cual produce un compuesto azul insoluble cuando es degradado por la β -galactosidasa y esta tinción es visible al microscopio (31).

La detección diferencial de células senescentes a través de este ensayo es posible en principio debido a un incremento en la abundancia de la β -galactosidasa durante la senescencia, relacionada con el aumento en el número de lisosomas y de la actividad lisosomal observada en células senescentes. A pesar de que esta enzima tiene una actividad óptima a pH 4.0, la magnitud de este incremento durante la senescencia celular es suficiente para que se pueda detectar a un pH subóptimo de 6.0 (32).

Elementos genéticos móviles y LINE-1

Los elementos genéticos móviles, también llamados transposones o “genes saltarines”, son secuencias de ácidos nucleicos que pueden moverse de un lugar a otro en el genoma. Estos elementos se clasifican según su modo de movilización: los clase I, también denominados transposones de DNA, se mueven a través de intermediarios de DNA, mientras que los clase II, denominados retrotransposones, se mueven a través de intermediarios de RNA (33). Los elementos genéticos móviles pueden ser autónomos, cuya propia secuencia codifica las proteínas necesarias para su amplificación en el genoma, y no autónomos, aquellos que dependen de las proteínas de otro elemento. Los retrotransposones también se pueden clasificar en dos grupos, en elementos LTRs (repeticiones terminales largas) o elementos no LTRs, dependiendo de la presencia de estas secuencias (34).

Los elementos no LTRs incluyen a los elementos LINE-1 (*Long INterspersed Element-1*). LINE-1 es el elemento genético móvil más abundante en el genoma de los mamíferos y en humanos es el único retrotransposón activo y autónomo, constituyendo aproximadamente el 17% del genoma humano, con alrededor de 516,000 copias (35, 36). Aunque LINE-1 es el elemento genético móvil más abundante en el genoma, la gran mayoría de las copias de LINE-1 se han vuelto inactivas debido a mutaciones puntuales, reordenamientos o truncamientos. Sin embargo, quedan alrededor de 80 a 100 elementos LINE-1 de longitud completa en el genoma que conservan la capacidad de retrotransposición (37, 38). En el ratón (*Mus musculus*) los elementos LINE-1 constituyen

el 18% del genoma, con aproximadamente 600,000 copias (39). En el caso de los retrotransposones, se mueven a través de un mecanismo tipo “copiar y pegar”, donde su secuencia de DNA primero se transcribe a RNA y después es transcrita a una secuencia de DNA complementario por la transcriptasa reversa y posteriormente se inserta en un nuevo sitio del genoma (40).

A) LINE-1 en humano



B) LINE-1 en ratón



Ilustración 2. Estructura del elemento LINE-1 en humanos y en ratón. UTR, región no traducida; ORF1/ORF2, marco de lectura abierto 1 / 2; CC, dominio hélice superenrollada; RRM, motivo de reconocimiento de RNA; CTD, dominio carboxilo terminal; EN, endonucleasa; RT, transcriptasa reversa; C, dominio rico en cisteína. Los triángulos verdes representan los monómeros en la región 5'UTR del LINE-1 de ratón, y la caja blanca representa la secuencia enlazadora no codificante. Figura creada con BioRender.

Estructura de LINE-1

En humanos, los elementos LINE-1 miden de 6.0 a 7.0 kb y consisten de una región no traducida en 5' (5'-UTR), dos marcos de lectura abiertos (ORF1 y ORF2) y una región no traducida en 3' (3'-UTR) con un cola de poli-A (41). La 5'UTR contiene un promotor interno de RNA polimerasa II que dirige la transcripción desde el extremo 5' del elemento; también contiene sitios de unión en cis para múltiples factores de transcripción. El ORF1

codifica para una proteína (ORF1p) de 40-kDa, que tiene actividad de chaperona y de unión a RNA. ORF1p tiene un dominio hélice superenrollada en el extremo amino-terminal, un motivo de reconocimiento de RNA ubicado en el centro y un dominio carboxilo terminal. El ORF2 codifica para una proteína (ORF2p) de 150-kDa, que contiene dominios de endonucleasa y transcriptasa reversa, y un dominio rico en cisteína cerca del carboxilo terminal (ilustración 2A) (35, 42). Los LINE-1 de ratón son estructuralmente similares a los de humano, sin embargo, la 5'UTR de ratón es distinta. El promotor de LINE-1 de ratón contiene una serie de repeticiones en tándem llamadas monómeros y va seguido de una secuencia 'enlazadora' no codificante río arriba del ORF1 (ilustración 2B) (39, 43).

LINE-1 durante el envejecimiento y la senescencia celular

Como se mencionó anteriormente, otra de las características distintivas del envejecimiento incluyen alteraciones epigenéticas (2). Estos cambios son complejos y generalmente específicos del tipo de célula, pero una característica consistente es la pérdida de heterocromatina y la consiguiente desrepresión transcripcional en sitios a lo largo del genoma. De igual forma, la senescencia celular está acompañada de cambios y rearrreglos importantes en la cromatina (42). En las células y organismos jóvenes, las secuencias repetidas, incluyendo a los retrotransposones, están altamente metiladas y condensadas en heterocromatina. Durante la senescencia celular y el envejecimiento, las secuencias repetidas pierden la metilación y se vuelven accesibles para los factores de transcripción. Esta descondensación de la cromatina en regiones con retrotransposones resulta en su reactivación, reflejado por un aumento en la expresión de RNA y la movilización de retrotransposones en células senescentes (44, 45).

Recientemente se ha reportado una fase tardía de la senescencia celular en fibroblastos humanos caracterizada por una activación exponencial de la transcripción del elemento LINE-1. Esta activación ocurre principalmente por la desregulación de tres factores en las células senescentes a través de tres mecanismos aditivos: la pérdida de RB1, que causa la disminución de la heterocromatinación de LINE-1; la sobre expresión de FOXA1, que activa el promotor LINE-1 y la pérdida de TREX1, que compromete la eliminación de

cDNA de LINE-1. La acumulación de cDNA de LINE-1 en la célula induce la activación de la señalización inmune durante la senescencia celular y el envejecimiento, que se da a través de la vía estimulante del interferón tipo I (IFN-I) y ocasiona una respuesta proinflamatoria. Esto, a su vez, contribuye al establecimiento y permanencia del SASP. Esta activación del elemento LINE-1 y la consiguiente respuesta de IFN-I es un fenotipo de las células senescentes, que evoluciona progresivamente durante la respuesta de senescencia y parece ser un componente importante del SASP que no había sido apreciado anteriormente (46).

Fibrosis Pulmonar Idiopática

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad crónica, progresiva, irreversible y usualmente letal del parénquima pulmonar de etiología desconocida, con tratamientos disponibles muy limitados (47). Esta enfermedad se caracteriza por la acumulación excesiva de moléculas de la matriz extracelular en el intersticio pulmonar, seguido de la destrucción de la arquitectura y función pulmonar. La FPI es el resultado de una compleja interacción de factores genéticos y ambientales, entre los factores de riesgo se encuentran el tabaquismo e infecciones virales, pero el vínculo más fuerte con la expresión y progresión de la enfermedad es el envejecimiento (48). La mayoría de los pacientes son mayores de 50 años al momento del diagnóstico y la incidencia aumenta notablemente con la edad (49).

Patogénesis

Aunque los mecanismos de la patogénesis no son del todo claros, en el modelo propuesto por Selman & Pardo (2020), tres principales factores convergen para dar origen a la FPI. En primer lugar, una predisposición genética que facilita la pérdida de la integridad del epitelio alveolar, que resulta en la pérdida de la capacidad de responder adecuadamente a daños en el tejido y al estrés mecánico. Segundo, cambios epigenéticos asociados al envejecimiento como la metilación del DNA, la modificación de las colas de histonas y una desregulación de la expresión de microRNAs. Tercero, cuando estos factores tienen

lugar en pulmones con envejecimiento acelerado, el resultado es una respuesta aberrante de las células epiteliales. Estas células comienzan a secretar factores de crecimiento, citoquinas, quimiocinas, metaloproteasas, entre otras moléculas, que promueven la migración y proliferación de fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos, produciendo los focos de fibroblastos característicos de los pulmones de pacientes con FPI. Los fibroblastos comienzan a secretar moléculas de la matriz extracelular de forma excesiva, principalmente colágenas fibrilares, lo que contribuye al endurecimiento de la matriz extracelular y a la remodelación y destrucción irreversible del tejido pulmonar (50).

FPI y senescencia celular

La mayoría de las características distintivas del envejecimiento acelerado se han identificado en los pulmones con FPI, incluyendo acortamiento de los telómeros, inestabilidad genómica, disfunción mitocondrial, aumento del estrés oxidativo y senescencia celular (49). Se ha demostrado que varios tipos de células experimentan senescencia en los pulmones con FPI, incluyendo las células epiteliales alveolares tipo II, fibroblastos y células endoteliales, y la evidencia emergente sugiere que la senescencia celular contribuye de manera importante a la fisiopatología de la enfermedad (48, 51).

Múltiples estudios han demostrado que el tejido y los fibroblastos pulmonares en la FPI presentan características del fenotipo senescente. Se ha observado que la expresión de varios marcadores de la senescencia celular, incluyendo p16, SA- β -gal y p53 se encuentra aumentada en tejido y fibroblastos pulmonares de pacientes con FPI. También se ha visto que estos fibroblastos alcanzan la senescencia de forma acelerada y presentan una elevada expresión de varios factores del SASP (51–53). Se ha reportado que los factores del SASP son capaces de inducir senescencia y cambios fenotípicos pro fibróticos a fibroblastos y macrófagos (54, 55). Particularmente, se ha observado que la interleucina (IL)-1 β es suficiente para inducir la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos (56). Esto sugiere que la senescencia puede contribuir a la patogénesis

de la FPI disminuyendo el potencial regenerativo del tejido a través de varios mecanismos: manteniendo un arresto persistente del crecimiento celular, provocando la secreción anormal de múltiples mediadores que alteran la estructura y organización tisular y aumentando la resistencia a la apoptosis en los miofibroblastos (49).

LINE-1 en patologías asociadas al envejecimiento

La actividad de retrotransposones como LINE-1, y los eventos de retrotransposición mediados por LINE-1 pueden causar transcripción aberrante, mutagénesis, daño al DNA y alteraciones genómicas, incluyendo mutaciones de inserción, deleciones y duplicaciones. Por este motivo, los genomas de los organismos han evolucionado múltiples mecanismos moleculares de defensa que funcionan en distintas etapas del ciclo de retrotransposición de LINE-1, a nivel epigenético, transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona (33, 38). Sin embargo, se ha observado que estos mecanismos se deterioran y se vuelven menos eficientes con el envejecimiento, lo que resulta en la desrepresión del elemento LINE-1 (44, 57). De este modo, la evidencia emergente también sugiere que la actividad del retrotransposón LINE-1 puede contribuir a diversas enfermedades relacionadas con el envejecimiento, tales como cáncer y patologías neurodegenerativas (45, 58). En cáncer, se ha reportado que aproximadamente el 50% de los cánceres presentan retrotransposición somática de LINE-1 y se ha demostrado que la hipometilación de LINE-1 se correlaciona con la prognosis en muchos tipos de cáncer, por lo que se ha propuesto como biomarcador. Se ha observado que se asocia a un mal pronóstico en cáncer de esófago, mama, vejiga y pulmón (59, 60).

Notablemente, la inhibición del elemento LINE-1 disminuye la inflamación y retrasa los biomarcadores del envejecimiento como la expresión de p16 y la edad de metilación en ratones y atenúa la respuesta del SASP en fibroblastos humanos (46, 61). En ratones SIRT6 KO, con fenotipo de envejecimiento prematuro, la inhibición de LINE-1 duplica su esperanza de vida y atenúa sus disfunciones fisiológicas y celulares (61). Estos estudios sugieren que la supresión de los retrotransposones puede mitigar los fenotipos asociados con la edad, lo cual respalda la noción de que estos elementos contribuyen al

envejecimiento y a las patologías asociadas con el envejecimiento y, por lo tanto, son objetivos potenciales para las intervenciones terapéuticas (45).

Modelo murino de envejecimiento acelerado: ratón *Zmpste24* $-/-$

El gen *Zmpste24* es el homólogo del gen ZMPSTE24 en humanos, también llamado FACE-1. *Zmpste24* es una metaloproteasa de zinc responsable del paso final de escisión de la prelamina A, presente en la envoltura nuclear de la célula, un paso crítico en su proceso de maduración. La acumulación de prelamina A es altamente tóxica para la célula y ocasiona daño en el DNA, remodelación de la cromatina y senescencia temprana. Los ratones deficientes en *Zmpste24* (*Zmpste24* $-/-$) tienen dicho gen apagado (*knockout*) cuando son homocigotos. Los ejemplares *knockout* lucen sanos hasta aproximadamente las 4 semanas de edad y son indistinguibles de sus compañeros de camada heterocigotos o *wild type*. Después de las ocho semanas de edad, los ratones homocigotos muestran progresivamente un fenotipo de envejecimiento acelerado que incluye retraso severo del crecimiento, pérdida de pelo, osteoporosis, miocardiopatía dilatada, distrofia muscular, lipodistrofia y su esperanza de vida se acorta a 4-6 meses. Estas alteraciones fenotípicas son muy similares a las que se observan en laminopatías progeroides en humanos (62, 63).

JUSTIFICACIÓN

Se ha observado que las células senescentes se acumulan con la edad en múltiples tejidos tanto de humanos como de roedores, y numerosas patologías relacionadas con el envejecimiento se han asociado con la senescencia celular, incluyendo la fibrosis pulmonar idiopática (10, 18, 21, 27). La detección e identificación de estas células representa un reto debido a, por un lado la alta heterogeneidad del fenotipo senescente, puesto que no todas las células senescentes expresan los mismos marcadores, y por otro a que algunas de las características moleculares y morfológicas asociadas a la senescencia también se pueden encontrar en otros estados o procesos celulares (10, 30).

La actividad de retrotransposones como LINE-1 puede causar transcripción aberrante, mutagénesis, daño al DNA y alteraciones genómicas. Asimismo, de acuerdo con la evidencia emergente, se vuelve más claro que los retrotransposones como LINE-1 participan en la senescencia celular y en múltiples enfermedades asociadas al envejecimiento (33, 45, 46). Por lo tanto, en el presente trabajo de investigación, se busca establecer la relación entre el envejecimiento y la expresión del retrotransposon LINE-1 utilizando un modelo de envejecimiento acelerado. Los resultados del presente proyecto nos permitirán profundizar sobre las características del envejecimiento y la senescencia, así como la posibilidad de utilizar a LINE-1 como herramienta para la detección de las células senescentes que representan un área de estudio de gran interés para dichas patologías, como lo es la fibrosis pulmonar idiopática.

HIPÓTESIS

Las células derivadas del ratón *Zmpste24* ^{-/-} con envejecimiento acelerado presentan activación del elemento LINE-1, lo que contribuye a la permanencia del fenotipo senescente de estas células.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el elemento LINE-1 se encuentra en células con senescencia en un modelo de envejecimiento acelerado (ratón Zmpste24 -/-).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar la técnica de inmunohistoquímica en tejido de pulmón de ratón y de humano.
- Estandarizar la técnica de tinción de SA- β -gal en fibroblastos pulmonares de ratón Zmpste24 -/-
- Determinar si existe una correlación entre la activación de LINE-1 y la senescencia celular en fibroblastos pulmonares de ratón Zmpste24 -/- a través de la colocalización con SA- β -gal por inmunofluorescencia.
- Cuantificar la expresión del elemento LINE-1 por RT-qPCR en células senescentes del ratón Zmpste24 -/-
- Identificar LINE-1 en tejido de pulmón de pacientes con FPI a través de IHC.

MÉTODOS

Modelos de estudio

- Muestras de pulmón humano y del modelo murino de envejecimiento (Zmpste24 -/-)

Todas las muestras fueron donadas por el grupo de fibrosis pulmonar del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER), siguiendo los protocolos de bioética y consentimiento informado (#B01-23). Se trabajó con una colonia de 6 ratones Zmpste24 -/- clasificados como KO viejos, con una edad de aproximadamente 16 semanas. Para los controles se utilizó una colonia de 6 ratones WT con una edad de 16 semanas. En el caso de los ratones KO jóvenes, se utilizaron cortes histológicos pulmonares provenientes de ejemplares de 10 a 12 semanas de edad. Las laminillas de cortes histológicos con tejido pulmonar de pacientes con FPI fueron donadas por el Dr. Moisés Selman Lama del Laboratorio de Biopatología Pulmonar del INER.

Aislamiento de fibroblastos de ratón Zmpste24 -/-

- Disección

Siguiendo los protocolos de bioética y de manejo de animales de laboratorio, se sacrificó a cada ratón administrando una inyección de 0.2 ml de pentobarbital. Posteriormente se realizó la disección de los pulmones completos, conservando la tráquea y el árbol bronquial. Previo a su extracción, los pulmones se perfundieron con PBS 1x.

- Obtención de suspensión celular

Los pulmones obtenidos se instilaron con 1 ml de dispasa y se dejaron en agitación a temperatura ambiente durante 45 minutos para disgregar el tejido. Posteriormente, en condiciones de esterilidad se retiró la tráquea y el árbol bronquial, se cortó finamente el tejido pulmonar y se le realizaron dos lavados de DMEM+5% FBS incubando con dicha solución en un agitador horizontal por 10 minutos. Después la solución se filtró con una

membrana de 70 μm para eliminar la matriz extracelular y se añadió 10 ml de DMEM+5% FBS. Dicha suspensión se centrifugó a 1300 rpm por 10 minutos a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en un buffer de lisis para eritrocitos en el que se incubó durante 2 minutos, pasado este tiempo la reacción se detuvo añadiendo 10 ml de DMEM+ 5% FBS. Se centrifugó la solución durante a 1300 rpm por 10 minutos a 4° C y el pellet obtenido se resuspendió en 2 ml de buffer MACS. Nuevamente esta solución se filtró con una membrana de 40 μm , añadiendo 10 ml más de buffer MACS para facilitar el proceso. Finalmente se centrifugó la solución durante 10 minutos a 1300 rpm a 4°C y se conservó en un tubo de 50 ml sin descartar el sobrenadante. En todas las centrifugaciones se descartó el sobrenadante salvo aquellas en las que se indica lo contrario.

- Separación de fracciones celulares

Con el objetivo de separar las células epiteliales de los fibroblastos, se utilizó un equipo con tecnología de clasificación celular activada magnéticamente (MultiMACS Cell24 Separator Plus) en el que las células incubadas en un buffer con un anticuerpo específico unido a perlas magnéticas se separan en una fracción positiva y una negativa, según la interacción anticuerpo-antígeno, al pasar por una columna magnética. El anticuerpo específico utilizado reconoce una glicoproteína transmembranal expresada por células epiteliales (Anti-CD326 EpCAM magnetic microbeads, Miltenyi Biotec, 130-105-958), que permitió la identificación de células epiteliales (EpCAM positivas) y no epiteliales (EpCAM negativas) de pulmón. Se resuspendió el pellet obtenido en el paso anterior en 450 μl de buffer MACS y 50 μl del anticuerpo unido a perlas magnéticas, y se incubó durante 15 minutos a 4°C. Se agregaron 5 ml de buffer MACS y se centrifugaron durante 10 minutos a 1300 rpm y 4°C. El pellet obtenido se resuspendió, descartando el sobrenadante, en 500 μl de buffer MACS. Esta solución con células en suspensión se añadió a las columnas para realizar la selección de las células. Finalmente, tras recuperar la fracción positiva y negativa, se añadió buffer HBSS a cada una de las fracciones y se centrifugaron por 10 minutos a 1300 rpm a 4°C. Los tubos con los pellets obtenidos se almacenaron a -20°C.

- Cultivo y propagación de fibroblastos de ratón

La fracción EpCAM negativa se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. En condiciones de esterilidad, se le removió el sobrenadante y el pellet se resuspendió en medio de cultivo DMEM+ 5% FBS. Finalmente, esta solución se repartió en frascos de cultivo celular T-25 etiquetadas con la fecha correspondiente. Para propagar las células se les removió el medio de cultivo y se le añadió 2 ml de buffer HBSS a cada frasco, haciendo dos lavados. Posteriormente se les removió el buffer y se añadió 1 ml de tripsina 1x a cada frasco y se incubó durante 2-5 minutos. Para detener la reacción se les añadió 4 ml de medio de cultivo DMEM+ 5% FBS y se pasó la suspensión a tubos para centrifugación de 15 ml, los cuales se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos. Finalmente se desechó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 5ml de medio DMEM+ 5% y se colocó la suspensión en nuevos frascos T-25, etiquetando con el número de pasajes correspondiente.

Obtención de RNA y síntesis de cDNA

- Extracción de RNA de células en suspensión

Se centrifugó la suspensión de células, descartando el sobrenadante y se agregó al pellet 1 ml de reactivo TRIzol (Invitrogen #15596018) por muestra, incubando toda la noche a -20°C. Después se agregaron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol y se incubó durante 3 minutos. Se centrifugó la muestra a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se transfirió la fase acuosa transparente que contiene el RNA a un tubo nuevo. Se precipitó el RNA agregando a la fase acuosa 0.5 ml de isopropanol, por cada ml de TRIzol utilizado para la lisis y se incubó durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó la muestra a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1 ml de etanol al 75% por cada ml de TRIzol. Se agitó la muestra brevemente y se centrifugó a 7500 rpm durante 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió el pellet en 15 µl de agua libre de nucleasas. La cuantificación del RNA aislado y la determinación de su pureza, se realizó en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 de Thermo Scientific. Se

consideró con un buen nivel de pureza el RNA con valores de ~ 2 para el cociente A260/A280. El RNA aislado se almacenó a -80°C .

- Conversión de RNA a cDNA

Se calcularon los volúmenes de muestra de RNA requeridos para realizar la síntesis de cDNA con el fin de obtener dos concentraciones finales (250 ng/ μl y 1000 ng/ μl en un volumen de 15 μl) por cada muestra. La conversión a cDNA se realizó utilizando el kit de iScript de Bio-Rad #1708890. Se preparó la mezcla de reacción añadiendo el volumen calculado de RNA, la 5x Reaction Mix, la transcriptasa reversa y agua libre de nucleasas, para un volumen final de 20 μl por muestra. Finalmente se incubó en un termociclador Bio-Rad CFX96 programado con el protocolo indicado por el fabricante.

RT-qPCR

Para analizar la expresión relativa de LINE-1, se realizó una RT-qPCR con el cDNA obtenido del RNA previamente aislado. Para realizar las comparaciones de la expresión relativa de LINE-1 entre las muestras de ratón KO y WT se utilizaron las muestras de cDNA de las fracciones EpCAM negativas provenientes de cuatro ratones KO y cuatro ratones WT estandarizadas en una concentración de 10 ng/ μl . Primero se calculó el volumen necesario de los reactivos y de las muestras de cDNA. Se preparó la mezcla de reacción utilizando el MasterMix Low ROX SYBR 2X blue dTTP de Takyon (#UF-LSMT-B0701), primers del gen de interés (LINE-1) y de un gen constitutivo (β -actina), y agua libre de nucleasas. Se añadió un volumen final de 15 μl (3 μl de cDNA + 0.33 μl de cada primer + 7 μl de MasterMix + 4.4 μl de agua libre de nucleasas) a cada pocillo de una placa para PCR de 96 pozos y se selló con una película adhesiva. Finalmente se incubó en el termociclador Bio-Rad CFX96. Cada muestra se analizó por triplicado, se realizaron tres repeticiones de este experimento y se obtuvo el promedio por muestra. La expresión relativa de genes se analizó mediante el método delta Ct (ΔCt). El valor de Ct se refiere al número de ciclos en el que la señal fluorescente de la muestra sobrepasa un umbral de amplificación, y se normalizan los datos utilizando los valores de Ct del gen

constitutivo. ΔCt es la diferencia del Ct del gen de interés y el gen constitutivo para una muestra dada $\Delta Ct = Ct(i) - Ct(c)$.

Primers utilizados:

LINE-1	Fwd	ATCTGTCTCCCAGGTCTGCT
LINE-1	Rv	TCCTCCGTTTACCTTTTCGCC
β -actina	Fwd	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
β -actina	Rv	GGCTGTATTCCCCTCCATCG

Ensayo de beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA β -gal)

Para este ensayo se utilizó el Senescence Cells Histochemical Staining Kit de Sigma-Aldrich (#CS0030). Se retiró el medio de cultivo de las células y se realizaron dos lavados de la placa con PBS 1x. Se agregó 1 ml de solución fijadora 1X a cada pocillo y se dejó incubar durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente hicieron dos lavados con PBS 1x. Se preparó la solución de tinción de β -galactosidasa según las instrucciones del fabricante y se agregó 1 ml a cada pocillo, filtrando la solución con una membrana de 0.22 μ m. Se selló la placa con película adhesiva Parafilm para evitar la evaporación y se dejó incubando a 37 °C durante la noche en una incubadora seca (sin CO₂). Mientras la solución de tinción todavía estaba en la placa, se revisaron las células bajo un microscopio para comprobar que se había desarrollado el color azul. Finalmente se removió la solución de tinción β -galactosidasa y se cubrió cada pocillo con PBS 1x. Las placas se almacenaron a 4°C.

Inmunofluorescencia (IF)

Para estos experimentos se colocó la suspensión de células en cámaras de cultivo sobre portaobjetos Chamber Slide Lab-Tek II CC2 de Thermo Fisher (#154917). Después de haber fijado las células (al realizar el ensayo de SA β -gal), se removió el PBS 1x y para

permeabilizar las células, se incubaron con Tritón al 0.25% en PBS durante 10 minutos y al terminar se hicieron dos lavados de 5 minutos con PBS 1x. Posteriormente se bloquearon los sitios no específicos utilizando bloqueador universal de Biogenex (HK085-5KE) diluido 1:10 en agua durante 10 minutos y al terminar se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se hicieron dos lavados con PBS 1x y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 durante una hora, y transcurrido este tiempo se incubaron con 1 µl de Hoechst 33342 en 2 ml de PBS durante 5 minutos para teñir los núcleos. Finalmente se realizó un lavado con PBS 1x, se desmontaron las cámaras y se fijaron los portaobjetos utilizando medio de montaje Fluoromount de Sigma-Aldrich (#F4680). Las laminillas se observaron en el microscopio de fluorescencia y las imágenes obtenidas se procesaron con el software NIS Elements de Nikon y con el programa ImageJ.

Inmunohistoquímica (IHC)

Para desparafinar el tejido, las muestras se incubaron con xilol durante 25 minutos y se rehidrataron con etanol absoluto, al 95% y al 50%, durante 5 minutos cada uno, después se mantuvieron en agua estéril. Posteriormente se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol y se lavaron con PBS 1x por 5 minutos. Después se realizó la recuperación antigénica, a través de la incubación con buffer de citratos (pH=6) o buffer Tris/EDTA (pH=9) y la aplicación de calor, dejando hervir durante 3 minutos. Al terminar, se lavaron con PBS 1X durante 5 minutos. Para prevenir la unión de los anticuerpos a sitios inespecíficos, se bloquearon las muestras incubando primero con bloqueador universal de Biogenex HK085-5KE diluido 1:10 en agua durante 10 minutos y después con suero fetal bovino o BSA diluido 1:100 en PBS durante 30 minutos lavando con PBS entre cada incubación. Posteriormente, las muestras experimentales se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. Pasado este tiempo, se realizaron dos lavados con PBST 0.1% y se incubaron con Multilink de Biogenex (HK340-5K), y posteriormente con estreptavidina conjugada con peroxidasa Super sensitive HRP (HK330-5K), lavando con PBST al 0.1% entre cada incubación. Finalmente se hizo el revelado de la peroxidasa utilizando AEC (HK09-5K) y las muestras se contratiñeron con

hematoxilina. Las laminillas se fijaron con medio de montaje ImmunoHistoMount de Sigma-Aldrich (#11161) y resina.

Análisis estadístico

El tamaño de la muestra no se determinó utilizando herramientas estadísticas. Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar. Las diferencias se analizaron mediante la prueba estadística de t de Student con dos colas. Se consideró el valor de $p < 0.05$, 0.01 y .001 como *, ** y *** respectivamente. Este análisis se realizó con el programa GraphPad Prism 8.0.1.

RESULTADOS

Los fibroblastos derivados del ratón Zmpste24 -/- presentan mayor senescencia comparados con ratones wild type

Con el fin de comprobar el estado senescente de los fibroblastos pulmonares derivados del ratón Zmpste24 -/- que muestra un fenotipo de envejecimiento acelerado, se realizó el ensayo de tinción de beta galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal), en donde las células senescentes, o positivas adquieren una coloración azul.

Al momento de aislar los fibroblastos de ratón KO, el crecimiento es similar a los del ratón WT. Sin embargo, los fibroblastos KO alcanzan un fenotipo de senescencia más rápido y tardan más en alcanzar la confluencia que sus contrapartes WT. En el pasaje 3, se realizó un conteo de las células positivas en ambas muestras. Como se muestra en la figura 1a, la proporción de células senescentes fue significativamente mayor en las muestras provenientes del ratón Zmpste24 -/- comparado con las de los ejemplares WT. Esta diferencia también se puede observar en las fotomicrográficas de la figura 1b, por lo que estos resultados sugieren que los fibroblastos de ratón Zmpste24 -/- en cultivo alcanzan la senescencia celular en un pasaje más temprano y en mayor proporción que los fibroblastos WT.

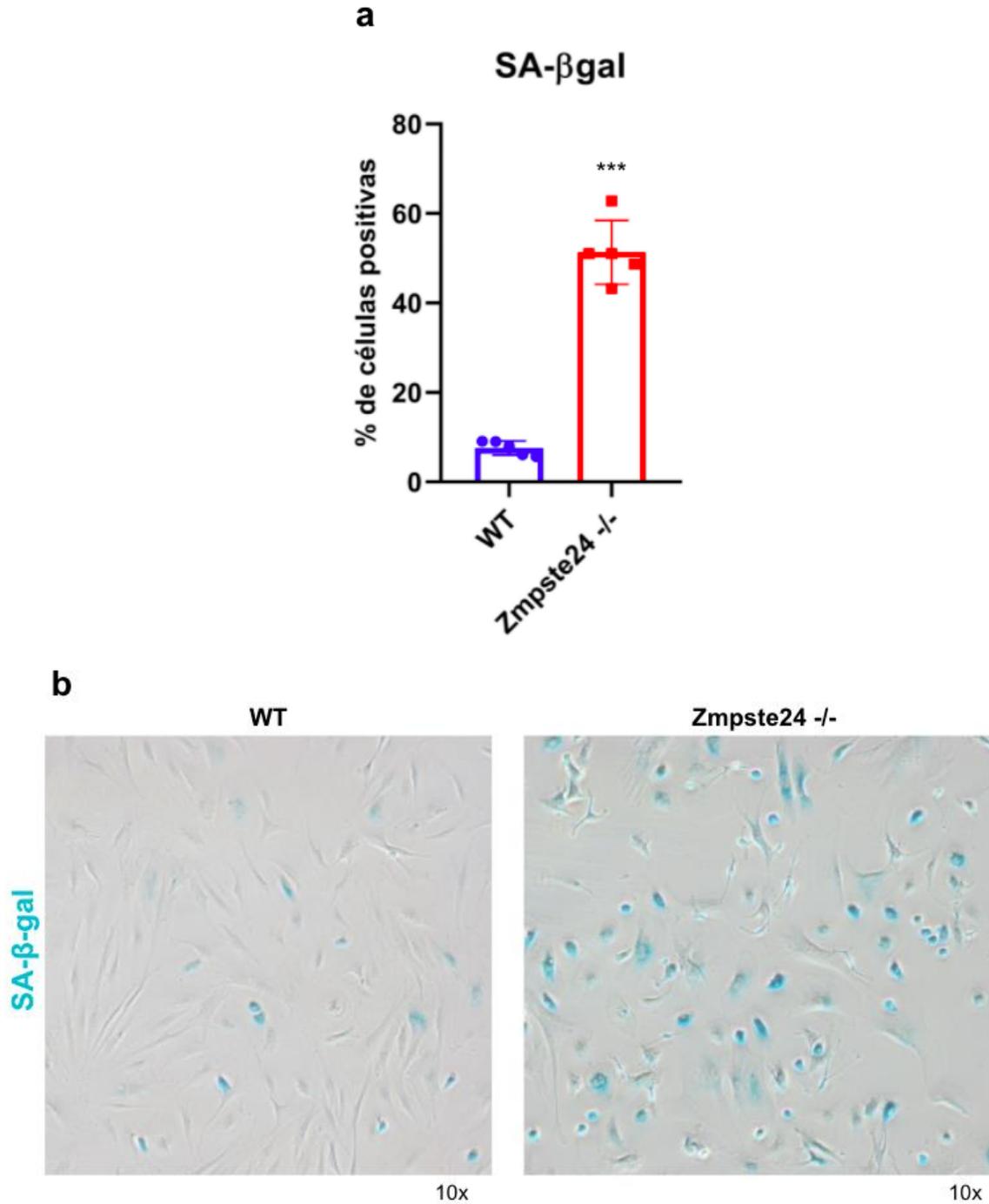


Figura 1. Comparación de actividad de beta-galactosidasa asociada a senescencia en fibroblastos pulmonares de ratón Zmpste24 -/- y wild type. a. Cuantificación de células senescentes en muestras WT y KO, n=5 por duplicado. Los datos se muestran en la gráfica como promedio \pm desviación estándar. Se consideró el valor de $p < 0.001$ como *** **b.** Fotomicrografías representativas de la tinción de SA- β gal en fibroblastos WT y KO.

El elemento LINE-1 colocaliza con la actividad de beta-galactosidasa asociada a senescencia de forma similar a p16 en fibroblastos pulmonares de ratón Zmpste24 -/-

Como era esperado, los fibroblastos derivados del ratón Zmpste24 -/- con envejecimiento acelerado muestran mayor senescencia desde el pasaje 3 por lo que esto nos permite utilizarlos para la colocalización con LINE-1 y así evaluar su probable papel como marcador de senescencia. Una vez comprobado el estado senescente de los fibroblastos, tras haber realizado el ensayo de SA- β -gal, se procedió a analizar la colocalización por medio de inmunofluorescencia. Para ello las células se permeabilizaron y se bloquearon los sitios inespecíficos, para después incubarse con los anticuerpos primarios contra la proteína ORF1 de LINE-1 o contra p16. Finalmente se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo para poder analizar las muestras con microscopía de fluorescencia.

En ambos experimentos se observó que tanto LINE-1, como p16 se encuentran en una mayor proporción de células en las muestras provenientes de ratón Zmpste24 -/- en comparación con las muestras de ratón WT. Además, se encontró que en aquellas células donde se observa tinción positiva de SA- β -gal, también se observa la señal de la proteína ORF-1 de LINE-1 y la de p16, es decir, se colocalizan (fig.2, fig.3). Cabe resaltar también que en aquellas células donde la tinción de SA- β -gal se observa con mayor saturación, la señal fluorescente de LINE-1 también se observa con mayor intensidad, lo que sugiere un estrecho vínculo entre la actividad de LINE-1 y la senescencia celular (fig.2).

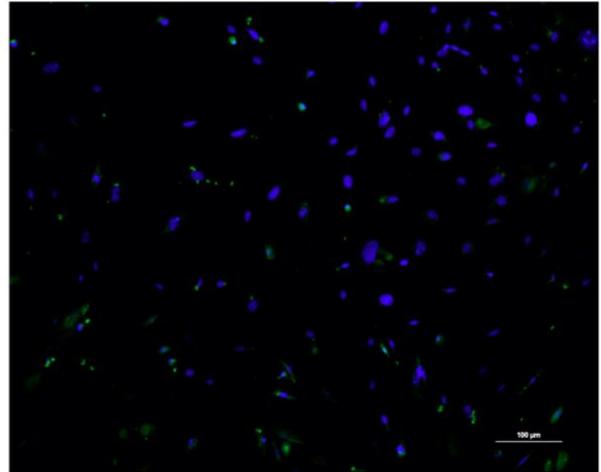
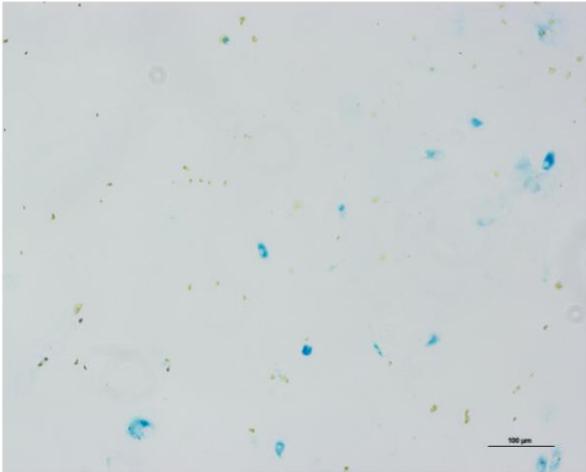
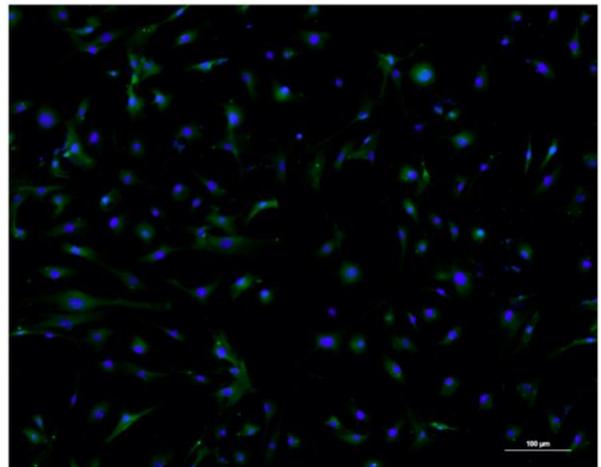
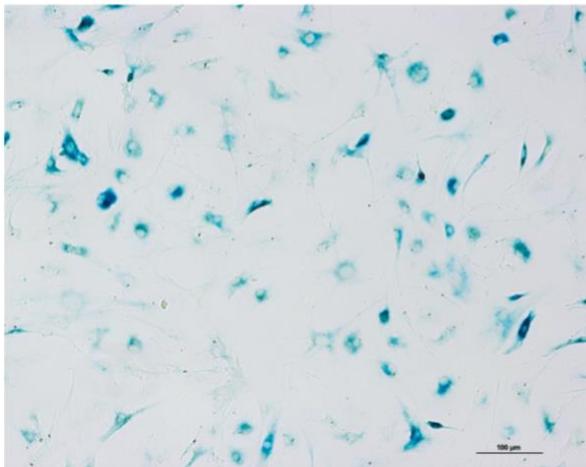
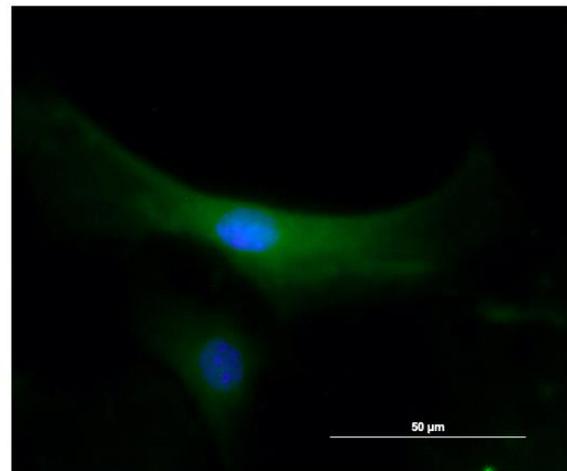
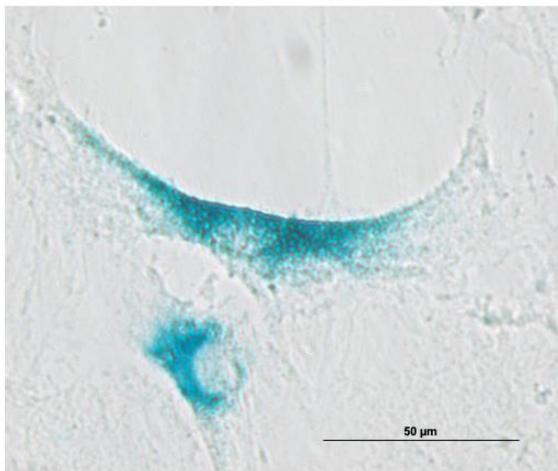
A**B****C**

Figura 2. Colocalización de la actividad de SA-β-gal y LINE-1 en fibroblastos pulmonares de ratón *Zmpste24* ^{-/-} y ratón wild type. Las muestras se examinaron mediante la tinción conjunta para la actividad de SA-β-Gal y para la proteína ORF1 de

LINE-1 por inmunofluorescencia. En la columna de la izquierda se encuentran las imágenes observadas con campo claro, y en la derecha las imágenes observadas con microscopía de fluorescencia. En verde se observa la tinción de LINE-1 realizada con Alexa Fluor 488 y los núcleos se observan en azul, teñidos con Hoechst 33342. Fotomicrografías representativas de la colocalización en (A) fibroblastos de ratón WT, 10x. (B, C) fibroblastos de ratón Zmpste24 -/-, 10x y 40x respectivamente.

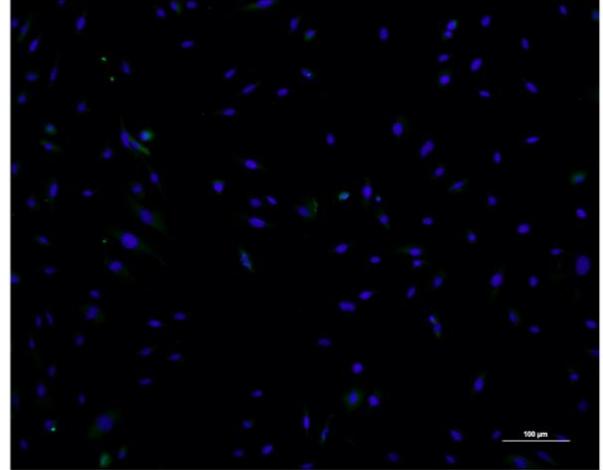
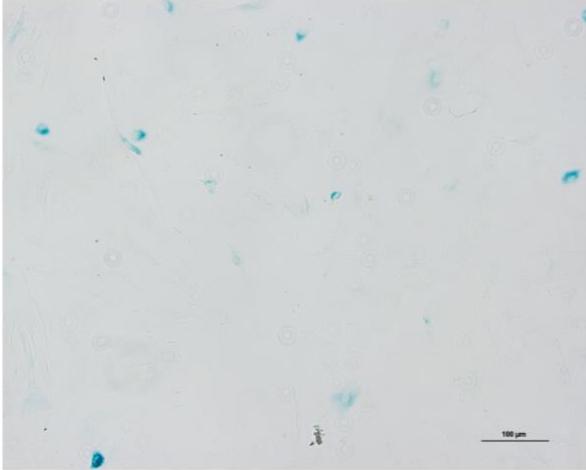
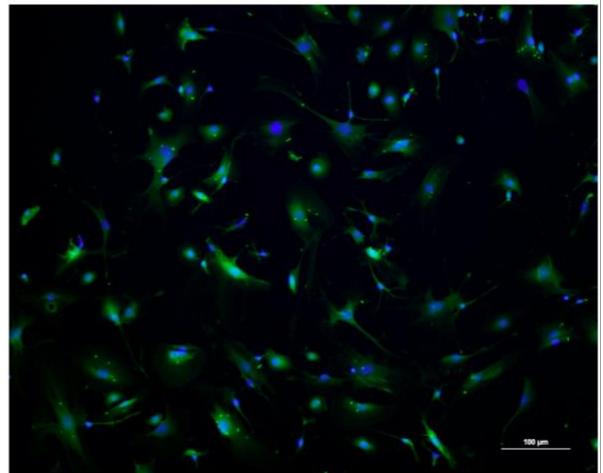
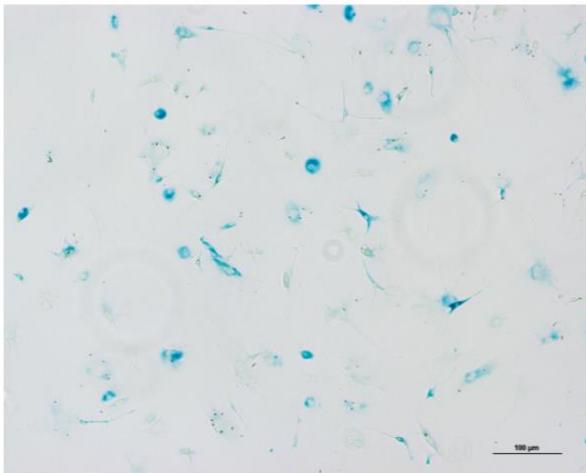
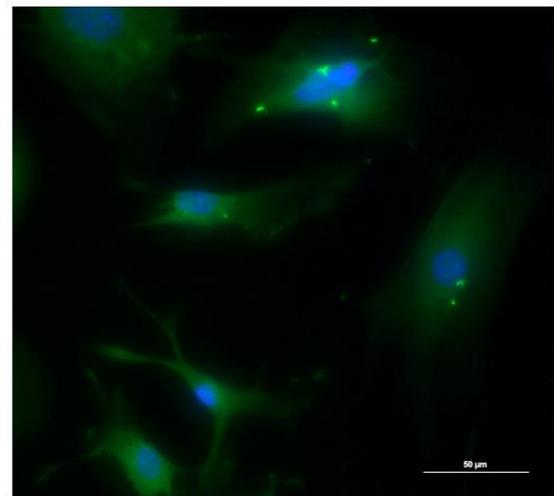
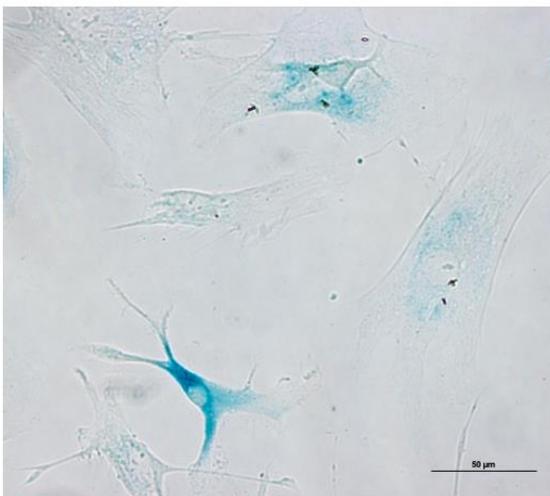
A**B****C**

Figura 3. Colocalización de la actividad de SA-β-gal y p16 en fibroblastos pulmonares de ratón *Zmpste24* -/- y ratón wild type. Las muestras se examinaron

mediante la tinción conjunta para la actividad de SA- β -Gal y la proteína p16 por inmunofluorescencia. En la columna de la izquierda se encuentran las imágenes observadas con campo claro, y en la derecha las imágenes observadas con microscopía de fluorescencia. En verde se observa la tinción de p16 realizada con Alexa Fluor 488 y los núcleos se observan en azul, teñidos con Hoechst 33342. Fotomicrográficas representativas de la colocalización en (A) fibroblastos de ratón WT, 10x. (B, C) fibroblastos de ratón *Zmpste24*^{-/-}, 10x y 40x respectivamente.

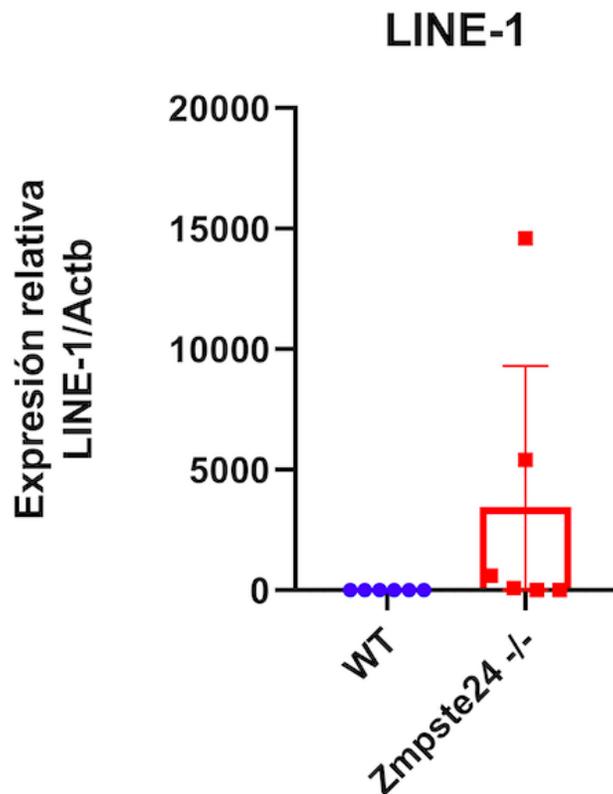


Figura 4. Expresión relativa de LINE-1 en fibroblastos de ratón wild type vs. ratón *Zmpste24*^{-/-}. Análisis de la expresión de LINE-1 utilizando beta actina como referencia, por medio de qPCR. La gráfica muestra n=6 repetido en tres experimentos independientes. Los datos se muestran en la gráfica como promedio \pm desviación estándar.

Algunas líneas de fibroblastos senescentes de ratón *Zmpste24* ^{-/-} presentan una alta expresión de LINE-1

Con el fin de comparar la expresión del elemento LINE-1 en fibroblastos de ratón WT y *Zmpste24* ^{-/-}, se realizó una RT-qPCR utilizando muestras de ambas poblaciones. Para ello, se extrajo RNA de los fibroblastos de ambos ratones, a partir del cual se sintetizó cDNA y finalmente se utilizó este material para llevar a cabo la PCR en tiempo real. Al comparar KO y WT, no se observaron diferencias significativas en la expresión de LINE-1. Se observó que en el caso del ratón *Zmpste24* ^{-/-}, los resultados son muy heterogéneos, ya que algunas de las muestras presentaron una alta expresión de LINE-1 mientras que en otras fue baja o nula. En contraste, ninguna de las muestras provenientes de ratón WT presentó la activación de LINE-1 (fig.4). De manera interesante los puntos con la expresión más alta correspondieron con aquellas muestras que presentaron mayor porcentaje de senescencia de acuerdo con el ensayo de SA- β -gal.

El elemento LINE-1 se encuentra principalmente en el epitelio pulmonar de ratón *Zmpste24* ^{-/-}

Con el objetivo de detectar la presencia del elemento LINE-1 en tejido pulmonar de ratón, se realizó la técnica de inmunohistoquímica en cortes de tejido pulmonar embebidos en parafina provenientes de ratones WT y ratones KO *Zmpste24* ^{-/-}, utilizando un anticuerpo para la proteína ORF-1 de LINE-1 de ratón. Se encontró que la presencia del elemento LINE-1 está localizada principalmente en las células epiteliales del tejido pulmonar de los ratones KO, mientras que en el tejido de los ratones WT no se observó tinción, por lo que no se detectó su presencia (fig.5). Comparando los resultados entre las muestras de ratón KO joven y KO viejo, se puede observar que hubo una mayor tinción en las muestras de ratón KO viejo, sugiriendo una mayor activación del elemento LINE-1 con la edad (fig. 5 b,c & d).

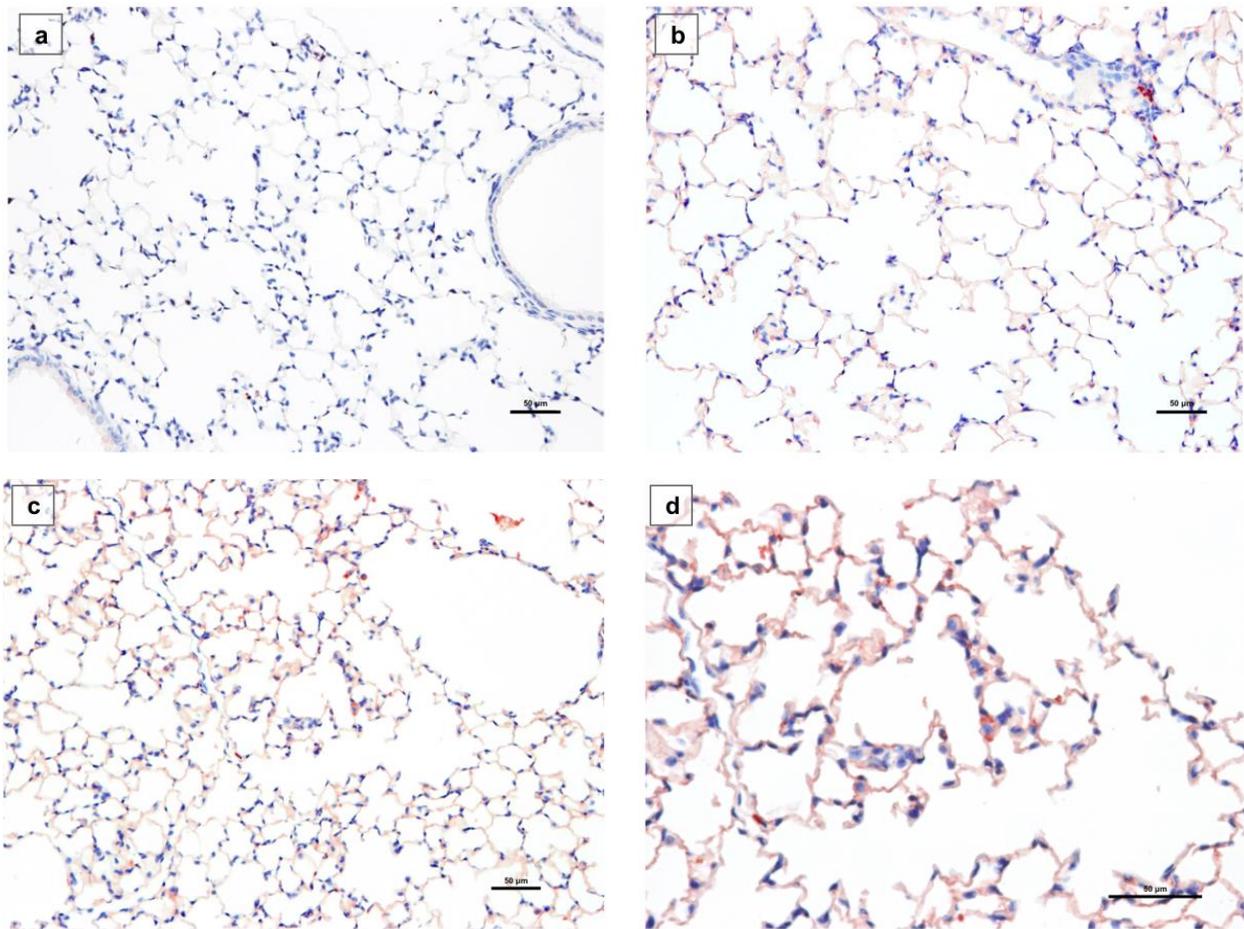


Figura 5. Detección inmunohistoquímica del elemento LINE-1 en tejido pulmonar derivado de ratón wild type, ratón *Zmpste24* ^{-/-} joven, y ratón *Zmpste24* ^{-/-} viejo. La tinción de la proteína ORF1 de LINE-1 se visualiza en rojo. **a.** Tinción en una muestra de tejido WT, 20x. **b.** Tinción de LINE-1 en tejido pulmonar de ratón *Zmpste24* ^{-/-} joven, 20x. **c,d.** Tinción de LINE-1 en tejido pulmonar de ratón *Zmpste24* ^{-/-} viejo, 20x y 40x respectivamente.

El elemento LINE-1 está presente en tejido pulmonar con fibrosis pulmonar idiopática

Después de comprobar la relación entre LINE-1 y el modelo de envejecimiento, se decidió buscar la presencia del elemento LINE-1, esta vez en tejido pulmonar derivado de

pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. Para ello, se realizó un análisis inmunohistoquímico en cortes histológicos embebidos en parafina con dos muestras de pacientes con FPI y de tejido pulmonar normal como control, utilizando un anticuerpo para la proteína ORF-1 de LINE-1 de humanos. Al realizar estos experimentos se encontró una fuerte tinción positiva principalmente en el epitelio pulmonar de pacientes con FPI, indicando la expresión de LINE-1 (fig. 6 a-d). En contraste, no se observó tinción en las muestras de pulmón normal (fig. 6 e,f). El epitelio de los pacientes con FPI está caracterizado por células cuboidales anormales, que recubren los sitios de lesión donde se encuentran “focos de fibroblastos” que engrosan el intersticio con la secreción de proteínas de matriz extracelular. Es en este epitelio anormal donde se observó la mayor tinción para LINE-1.

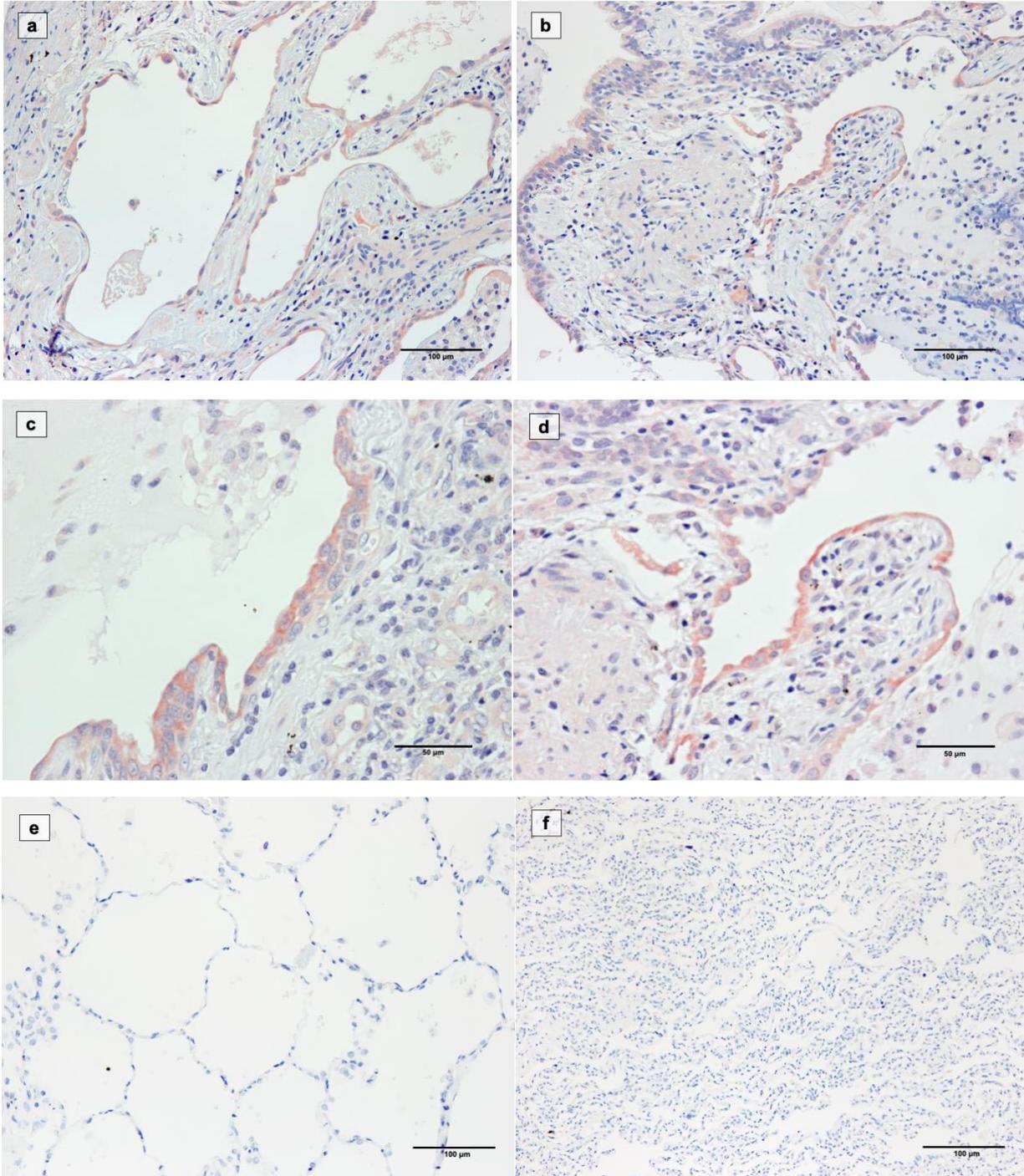


Figura 6. Detección inmunohistoquímica del elemento LINE-1 en tejido pulmonar derivado de pacientes con FPI y tejido pulmonar normal (control). a,b & c,d. Pulmón con FPI que muestra la tinción de la proteína ORF-1 de LINE-1, ubicada principalmente en las células epiteliales, 20x y 40x respectivamente. e,f. Tinción en tejido de pulmón normal, 20x.

DISCUSIÓN

El envejecimiento implica un declive progresivo de la integridad funcional que culmina en la disfunción tisular y en la insuficiencia orgánica. Asimismo, el envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo para múltiples patologías relacionadas con la edad avanzada (10). La senescencia celular forma parte de las características distintivas del envejecimiento, y la acumulación de las células senescentes que sucede con la edad está asociada al daño tisular y a numerosas enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como lo es la fibrosis pulmonar idiopática (2, 20, 49).

Los retrotransposones como LINE-1 se encuentran transcripcionalmente silenciados en las células, sin embargo, durante el envejecimiento y la senescencia celular, estos elementos se activan, evidenciado por un incremento en la expresión de RNA y movilización de retrotransposones en células senescentes. La actividad de LINE-1 puede causar daño al DNA, mutagénesis, e inestabilidad genómica, y la evidencia emergente sugiere que puede contribuir a diversas enfermedades relacionadas con el envejecimiento (33, 38, 44).

El modelo murino de envejecimiento acelerado *Zmpste24* ^{-/-} ha sido poco caracterizado en el contexto del pulmón. A diferencia de lo reportado en otros órganos del ratón *Zmpste24* ^{-/-} donde se observa distrofia muscular, lipodistrofia o fibrosis intersticial (63), el tejido pulmonar no tiene aspecto fibrótico, y no se observan diferencias morfológicas con respecto al tejido de ratones silvestres al analizarse con microscopía óptica (62). En el caso de los fibroblastos pulmonares, al momento de aislarlos y cultivarlos, no mostraron senescencia y crecen de forma similar a los WT. Sin embargo, los fibroblastos de ratón *Zmpste24* ^{-/-} alcanzaron la senescencia en pasajes más tempranos, y al cuantificar las células positivas en el mismo pasaje, se observó una proporción significativamente mayor de células senescentes en comparación con los de ratones WT ($p < 0.001$). A nivel de tejido, por medio de IHC se observó que el elemento LINE-1 se encuentra principalmente en el epitelio pulmonar en muestras de ratón *Zmpste24* ^{-/-}. Al comparar las muestras de ratón KO joven y ratón KO viejo, la inmunotinción se observó con mayor intensidad en

las muestras de ratón KO viejo, lo que sugiere un vínculo entre la activación de LINE-1 y la edad.

Al realizar una tinción secuencial de beta galactosidasa asociada a senescencia seguida de inmunofluorescencia para LINE-1 o el marcador de senescencia p16, se encontró que tanto la señal de p16 como del elemento LINE-1 es más abundante en fibroblastos pulmonares de ratón *Zmpste24* *-/-* que en fibroblastos de ratón WT. Si bien esta técnica fue empleada anteriormente por De Cecco y colaboradores en cortes de tejido hepático de ratón (46), a nuestro saber, esta es la primera vez que dicha técnica es implementada en fibroblastos aislados de ratón *Zmpste24* *-/-*. Notablemente, se observó que el elemento LINE-1 colocaliza con la actividad de beta-galactosidasa asociada a senescencia de forma similar a p16 en fibroblastos pulmonares de ratón *Zmpste24* *-/-*. Aunado a esto, se halló que en aquellas células donde la tinción de SA- β -gal se observa con mayor saturación, la señal fluorescente de LINE-1 también se observa con mayor intensidad. Estos resultados sugieren a la activación de LINE-1 como un componente importante del fenotipo senescente, de forma consistente con lo reportado en estudios previos realizados en otros modelos de estudio (57, 64).

Los datos obtenidos del análisis de la expresión relativa de LINE-1 en fibroblastos de ratón *Zmpste24* *-/-* por medio de RT-qPCR no mostraron diferencias significativas con respecto a los fibroblastos WT. Se observó que la expresión entre las muestras de *Zmpste24* *-/-* exhibieron alta heterogeneidad entre ellas, puesto que algunas de las muestras presentaron una alta expresión de LINE-1 mientras que en otras fue baja o nula. Esta heterogeneidad podría ser debido a que se ha reportado que la activación de los retrotransposones es un evento que ocurre en etapas muy tardías de la senescencia celular, de acuerdo con estudios previos donde, en modelos de senescencia replicativa en fibroblastos humanos, se alcanzan diferencias significativas en la expresión de LINE-1 hasta después de 3-4 meses de cultivo (44, 46, 57). Asimismo, se ha demostrado que en fibroblastos humanos, durante la senescencia tardía, la desregulación de los factores RB1, FOXA1 y TREX1 resulta en la desrepresión transcripcional del elemento LINE-1, reflejado por un aumento exponencial en la expresión de LINE-1 (46). Cabe resaltar que de forma interesante, al identificar las muestras que presentaron mayor expresión de

LINE-1 por RT-qPCR, se encontró que éstas correlacionan con las que presentaron el mayor índice de senescencia de acuerdo con la cuantificación de células positivas para SA- β -gal. En conjunto, estos resultados sugieren que, mientras que LINE-1 forma parte importante del fenotipo senescente y podría ser utilizado como marcador, se debe tomar en cuenta que su activación aparece en etapas tardías de la senescencia, a diferencia de otros marcadores como SA- β -gal.

Dado el vínculo entre la activación del elemento LINE-1, el envejecimiento y la senescencia, además de su posible papel en las enfermedades asociadas con el envejecimiento, se decidió analizar el elemento LINE-1 en el contexto de la fibrosis pulmonar idiopática. Notablemente, el análisis inmunohistoquímico en tejido pulmonar de pacientes con FPI reveló una fuerte tinción positiva para LINE-1 principalmente en el epitelio pulmonar. Estos resultados sugieren un posible papel de LINE-1 en la fibrosis pulmonar idiopática que aún no ha sido estudiado, y podría representar un nuevo enfoque para el estudio de dicha patología.

En el presente trabajo se demostró que el retrotransposón LINE-1 se localiza en células senescentes de ratón con envejecimiento acelerado, así como en el epitelio pulmonar de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, sugiriendo un estrecho vínculo entre la activación de LINE-1, el envejecimiento y la senescencia celular, además del potencial de LINE-1 como marcador de senescencia celular. Entre las ventajas de su utilización se encuentra el hecho de que LINE-1 no participa en procesos celulares normales, y no se expresa en tejidos somáticos normales, sin embargo, su activación ocurre en etapas muy avanzadas de la senescencia, por lo que se podría considerar como un marcador de senescencia tardía. Este proyecto también sienta los antecedentes para estudios posteriores sobre el retrotransposón LINE-1 en el contexto de la fibrosis pulmonar idiopática.

CONCLUSIONES

- Se llevó a cabo la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica en tejido pulmonar de ratón y humano.
- Se logró la estandarización de la técnica de tinción secuencial de beta galactosidasa asociada a senescencia seguida de inmunofluorescencia para la ORF1p de LINE-1 o el marcador de senescencia p16.
- Se determinó que los fibroblastos pulmonares de ratón *Zmpste24* *-/-* presentan mayor senescencia comparados con los silvestres.
- Se demostró la presencia de LINE-1 en fibroblastos senescentes de ratón.
- Se identificó la presencia de LINE-1 en tejido epitelial pulmonar en el modelo de envejecimiento *Zmpste24* *-/-* y en muestras de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática.

REFERENCIAS

1. Kubben N, Misteli T. Shared molecular and cellular mechanisms of premature ageing and ageing-associated diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017;18:595–609.
2. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell* 2013;153:1194–1217.
3. Melzer D, Pilling LC, Ferrucci L. The genetics of human ageing. *Nat Rev Genet* 2020;21:88–101.
4. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* 2023;186:243–278.
5. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, *et al.* Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* 2019;179:813–827.
6. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol* 2018;28:436–453.
7. Campisi J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu Rev Physiol* 2013;75:685–705.
8. Campisi J, d’Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:729–740.
9. Neurohr GE, Terry RL, Lengefeld J, Bonney M, Brittingham GP, Moretto F, *et al.* Excessive Cell Growth Causes Cytoplasm Dilution And Contributes to Senescence. *Cell* 2019;176:1083-1097.e18.
10. Song S, Lam EW-F, Tchkonja T, Kirkland JL, Sun Y. Senescent Cells: Emerging Targets for Human Aging and Age-Related Diseases. *Trends Biochem Sci* 2020;45:578–592.
11. Gasek NS, Kuchel GA, Kirkland JL, Xu M. Strategies for targeting senescent cells in human disease. *Nat Aging* 2021;1:870–879.
12. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 2011;192:547–556.

13. Wiley CD, Campisi J. The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention. *Nat Metab* 2021;3:1290–1301.
14. Helman A, Klochendler A, Azazmeh N, Gabai Y, Horwitz E, Anzi S, *et al.* p16Ink4a-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nat Med* 2016;22:412–420.
15. Adams PD. Healing and Hurting: Molecular Mechanisms, Functions, and Pathologies of Cellular Senescence. *Mol Cell* 2009;36:2–14.
16. Williams GC. Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution* 1957;11:398.
17. Kirkwood TBL, Austad SN. Why do we age? *Nature* 2000;408:233–238.
18. Campisi J. Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. *Cell* 2005;120:513–522.
19. Kumari R, Jat P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:645593.
20. Roger L, Tomas F, Gire V. Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence. *Int J Mol Sci* 2021;22:13173.
21. Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, Laberge R-M, Marquess D, Dananberg J, *et al.* Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov* 2017;16:718–735.
22. Coppé J-P, Desprez P-Y, Krtolica A, Campisi J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2010;5:99–118.
23. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, *et al.* A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* 2013;15:978–990.
24. Machado-Oliveira G, Ramos C, Marques ARA, Vieira OV. Cell Senescence, Multiple Organelle Dysfunction and Atherosclerosis. *Cells* 2020;9:2146.
25. Kale A, Sharma A, Stolzing A, Desprez P-Y, Campisi J. Role of immune cells in the removal of deleterious senescent cells. *Immun Ageing* 2020;17:16.

26. Pereira BI, Devine OP, Vukmanovic-Stejic M, Chambers ES, Subramanian P, Patel N, *et al.* Senescent cells evade immune clearance via HLA-E-mediated NK and CD8+ T cell inhibition. *Nat Commun* 2019;10:2387.
27. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol* 2018;217:65–77.
28. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:482–496.
29. van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature* 2014;509:439–446.
30. Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer* 2015;15:397–408.
31. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* 2009;4:1798–1806.
32. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 2000;113:3613–3622.
33. Hancks DC, Kazazian HH. Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mob DNA* 2016;7:9.
34. Kazazian HH, Moran JV. Mobile DNA in Health and Disease. In: Phimister EG, editor. *N Engl J Med* 2017;377:361–370.
35. Beck CR, Garcia-Perez JL, Badge RM, Moran JV. LINE-1 Elements in Structural Variation and Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2011;12:187–215.
36. Sookdeo A, Hepp CM, Boissinot S. Contrasted patterns of evolution of the LINE-1 retrotransposon in perissodactyls: the history of a LINE-1 extinction. *Mob DNA* 2018;9:12.
37. Hancks DC, Kazazian HH. Active human retrotransposons: variation and disease. *Curr Opin Genet Dev* 2012;22:191–203.

38. Luqman-Fatah A, Miyoshi T. Human LINE-1 retrotransposons: impacts on the genome and regulation by host factors. *Genes Genet Syst* 2022;22–00038.doi:10.1266/ggs.22-00038.
39. Richardson SR, Doucet AJ, Kopera HC, Moldovan JB, Garcia-Perez JL, Moran JV. The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes. In: Lambowitz A, Craig N, editors. *Microbiol Spectr* 2015;3:3.2.15.
40. Huang CRL, Burns KH, Boeke JD. Active Transposition in Genomes. *Annu Rev Genet* 2012;46:651–675.
41. Zhang X, Zhang R, Yu J. New Understanding of the Relevant Role of LINE-1 Retrotransposition in Human Disease and Immune Modulation. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:657.
42. Gorbunova V, Seluanov A, Mita P, McKerrow W, Fenyö D, Boeke JD, *et al.* The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated diseases. *Nature* 2021;596:43–53.
43. Kong L, Saha K, Hu Y, Tschetter JN, Habben CE, Whitmore LS, *et al.* Subfamily-specific differential contribution of individual monomers and the tether sequence to mouse L1 promoter activity. *Mob DNA* 2022;13:13.
44. De Cecco M, Criscione SW, Peckham EJ, Hillenmeyer S, Hamm EA, Manivannan J, *et al.* Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. *Aging Cell* 2013;12:247–256.
45. Zhang W, Qu J, Liu G-H, Belmonte JCI. The ageing epigenome and its rejuvenation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020;21:137–150.
46. De Cecco M, Ito T, Petrashen AP, Elias AE, Skvir NJ, Criscione SW, *et al.* L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature* 2019;566:73–78.
47. King TE, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet* 2011;378:1949–1961.
48. Liu R-M, Liu G. Cell senescence and fibrotic lung diseases. *Exp Gerontol* 2020;132:110836.
49. Selman M, López-Otín C, Pardo A. Age-driven developmental drift in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2016;48:538–552.

50. Selman M, Pardo A. The leading role of epithelial cells in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Signal* 2020;66:109482.
51. Schafer MJ, White TA, Iijima K, Haak AJ, Ligresti G, Atkinson EJ, *et al.* Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun* 2017;8:14532.
52. Álvarez D, Cárdenes N, Sellarés J, Bueno M, Corey C, Hanumanthu VS, *et al.* IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 2017;313:L1164–L1173.
53. Yanai H, Shteinberg A, Porat Z, Budovsky A, Braiman A, Zeische R, *et al.* Cellular senescence-like features of lung fibroblasts derived from idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Aging* 2015;7:664–672.
54. Cárdenes N, Álvarez D, Sellarés J, Peng Y, Corey C, Wecht S, *et al.* Senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Stem Cell Res Ther* 2018;9:257.
55. Rana T, Jiang C, Liu G, Miyata T, Antony V, Thannickal VJ, *et al.* PAI-1 Regulation of TGF- β 1-induced Alveolar Type II Cell Senescence, SASP Secretion, and SASP-mediated Activation of Alveolar Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2020;62:319–330.
56. Minagawa S, Araya J, Numata T, Nojiri S, Hara H, Yumino Y, *et al.* Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF- β -induced senescence of human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 2011;300:L391–L401.
57. Van Meter M, Kashyap M, Rezazadeh S, Geneva AJ, Morello TD, Seluanov A, *et al.* SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age. *Nat Commun* 2014;5:5011.
58. Peze-Heidsieck E, Bonnifet T, Znaidi R, Ravel-Godreuil C, Massiani-Beaudoin O, Joshi RL, *et al.* Retrotransposons as a Source of DNA Damage in Neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* 2022;13:786897.

59. Ponomaryova AA, Rykova EY, Gervas PA, Cherdyntseva NV, Mamedov IZ, Azhikina TL. Aberrant Methylation of LINE-1 Transposable Elements: A Search for Cancer Biomarkers. *Cells* 2020;9:2017.
60. Rodriguez-Martin B, Alvarez EG, Baez-Ortega A, Zamora J, Supek F, Demeulemeester J, *et al.* Pan-cancer analysis of whole genomes identifies driver rearrangements promoted by LINE-1 retrotransposition. *Nat Genet* 2020;52:306–319.
61. Simon M, Van Meter M, Ablaeva J, Ke Z, Gonzalez RS, Taguchi T, *et al.* LINE1 Derepression in Aged Wild-Type and SIRT6-Deficient Mice Drives Inflammation. *Cell Metab* 2019;29:871-885.e5.
62. Calyeca J, Balderas-Martínez YI, Olmos R, Jasso R, Maldonado V, Rivera Q, *et al.* Accelerated aging induced by deficiency of Zmpste24 protects old mice to develop bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Aging* 2018;10:3881–3896.
63. Pendás AM, Zhou Z, Cadiñanos J, Freije JMP, Wang J, Hultenby K, *et al.* Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet* 2002;31:94–99.
64. Wallace NA, Belancio VP, Deininger PL. L1 mobile element expression causes multiple types of toxicity. *Gene* 2008;419:75–81.