



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Potencial inhibición de la senescencia celular en fibroblastos de ratón con expresión heteróloga de un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina de ratopín.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Laura Marianna Cano Mateo

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Susana Castro Obregón, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez, Instituto de Fisiología Celular

Dr. Greco Hernández Ramírez, Instituto Nacional de Cancerología

Ciudad de México, Junio 2023



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.

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, bajo la tutoría de la Dra. Susana Castro Obregón. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de la beca CONACyT 1100122, del “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP), y del proyecto PAPIIT-UNAM IN209221 tanto para realizar los experimentos como para terminar esta tesis (beca 005423).

Agradecimientos Institucionales

A la Dra. Susana Castro Obregón por compartir su experiencia, por su asesoría, dirección y apoyo constante en la realización del proyecto. A la Dra. Beatriz Aguilar Maldonado por su ayuda en el área técnica y por su retroalimentación. A la Dra. Yazmín Rodrigo, y a Abraham Rosas y Ruth Rincón de la Unidad de Imagenología del IFC por su apoyo en la adquisición de fotografías de microscopía confocal. A la M. en C. Ana María Escalante y el Ing. Francisco Pérez la Unidad de Cómputo, así como a los ingenieros Aurey Galván Lobato y Manuel Martínez del Taller de Mantenimiento Electrónico, Eléctrico y Mecánico del Instituto de Fisiología Celular. A los Doctores Iván Velasco Velázquez y Greco Hernández Ramírez, miembros de mi comité tutor por su asesoría en el proyecto a lo largo de la maestría. A los Doctores Martín Gustavo Pedraza Alva, Clorinda Arias Álvarez, Lourdes Massieu Trigo, Marina Macias Silva y Sandra Cabrera Benítez, integrantes del jurado, por su retroalimentación en la parte escrita del proyecto.

Agradecimientos Personales

A mi familia, a mi mamá y mis hermanos Mibzi y Eduardo, por siempre estar ahí apoyándome en todo cada uno con su particular forma de ser, sin la ayuda de ellos no podría haberlo logrado, en particular sin toda la ayuda que mi hermano me brindó en todos los aspectos, gracias por todo siempre.

A la Dra. Susana Castro Obregón por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio y de realizar este proyecto bajo su tutoría. A mis compañeros y amigos de laboratorio, Bety, Bere, Pau, Lore, Pily, Giss, Braulio, Alfred y Antonio por todas las observaciones y los comentarios que permitieron un mejor desarrollo de este proyecto, y por su apoyo a lo largo de la maestría. Especial agradecimiento a Bere por todo el apoyo y la gran disposición siempre de ayudarme en cualquier cosa que llegué a necesitar a lo largo de la maestría, y a Pau, Bere y Lore por hacer mis días en el laboratorio divertidos, incluso los más difíciles.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	8
Resumen.....	9
1. Introducción.....	10
1.1 Gerociencia.....	10
1.2 Varían los perfiles de envejecimiento entre las especies.....	11
1.3 Definición del Envejecimiento.....	14
1.4 Senescencia Celular.....	15
1.4.1 <i>La desrepresión del locus INK4-ARF inhibe el ciclo celular e induce la senescencia</i>	16
1.4.2 <i>Las células senescentes alteran el tejido circundante</i>	20
1.4.3 <i>Las células senescentes tienen una respuesta al daño del DNA sostenida</i>	21
1.4.4 <i>Las células senescentes pierden proteostasis</i>	22
1.4.5 <i>Las células senescentes tienen cambios en la estructura de la cromatina</i>	23
1.4.6 <i>La quiescencia se distingue de la senescencia celular</i>	23
1.5 La acumulación progresiva de células senescentes causa envejecimiento y el desarrollo de múltiples enfermedades relacionadas con la edad.....	26
1.6 <i>Heterocephalus Glaber</i>	31
1.6.1 <i>El ratopín tiene envejecimiento nimio</i>	32
1.6.2 <i>El ratopín no acumula células senescentes con la edad</i>	35
2. Antecedentes.....	36
3. Hipótesis.....	37
4. Objetivo General.....	37
4.1 Objetivos particulares.....	38
Metas específicas:.....	38
Metas específicas:.....	38
5. Estrategia Experimental.....	39
6. Materiales y Métodos.....	40
6.1 Purificación del plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT.....	40
6.2 Análisis de restricción.....	40
6.3 Transfección de células HEK293 con Polietilimina (PEI).....	40
6.4 Obtención de extracto de proteínas total de células.....	41
6.5 Western Blot.....	41

6.6 Aislamiento de fibroblastos de piel de ratón neonato (MSFs)	41
6.7 Cultivo de fibroblastos de ratón (MEFs y MSFs)	42
6.8 Aislamiento y cultivo de fibroblastos de piel de ratopín neonato (NSFs).....	42
6.8.1 <i>Cultivo de fibroblastos de ratopín neonato (NSFs)</i>	43
6.9 Ensayo de actividad β -galactosidasa asociada a senescencia	43
6.10 Inmunofluorescencia	43
6.11 Extracción de RNA de tejidos y células adherentes	44
6.12 Síntesis de cDNA.....	44
6.13 PCR	44
6.14 Análisis Estadísticos	45
7. Resultados	45
1. Purificación y verificación de la identidad del plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT. ...	45
2. Fibroblastos de piel de ratopín son resistentes al establecimiento de senescencia celular inducida por daño al DNA con Etopósido.	47
3. La expresión heteróloga de FLAG-pALT en MSFs promueve la resistencia al establecimiento de senescencia celular inducida por daño al DNA.	55
3.1. <i>El tratamiento con etopósido 120 μM es subletal e inhibe la proliferación en MSFs transfectados con pcDNA3.1- o pcDNA3.1-FLAG-pALT.</i>	55
3.2. <i>La expresión de FLAG-pALT^{INK4a/b} disminuye la proliferación de MSFs</i>	57
3.3. <i>La expresión de FLAG-pALT en MSFs redujo el porcentaje de células con actividad SA-βgal.</i>	57
3.4. <i>Las alteraciones en la morfología nuclear de MSFs con daño al DNA son menores cuando expresan FLAG-pALT^{INK4a/b}</i>	59
4. pALT ^{INK4a/b} se expresa en fibroblastos de piel de neonato de ratopín.....	68
Discusión.....	69
Resumen Gráfico	73
Conclusión.....	74
Perspectivas.....	74
Bibliografía	75
Anexo 1	88
Purificación del plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT	88
Análisis de restricción	89
<i>Electroforesis de DNA</i>	90
Transfección de células HEK293 con PEI.....	90
Obtención de extracto de proteínas totales de células.....	91

Western Blot	92
<i>Electroforesis de gel de poliacrilamida</i>	92
Aislamiento de fibroblastos de piel de ratón neonato.....	93
Cultivo de fibroblastos de ratón (MEFs/MSFs).....	94
Aislamiento y cultivo de fibroblastos de piel de ratopín neonato.....	95
<i>Cultivo de fibroblastos de ratopín neonato</i>	95
Ensayo de actividad β -galactosidasa asociada a senescencia.....	96
Inmunofluorescencia.....	97
Extracción de RNA de tejidos y células adherentes.....	98
Anexo 2	100

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ANRIL	Antisense non-coding RNA in the INK4 locus
ATP	Adenosín Trifosfato
CDK	Cinasa Dependiente de Ciclina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DDR	DNA Damage Response, Respuesta al daño del DNA
D/V	Días in vitro
DNA	Deoxyribonucleic acid, Ácido Desoxirribonucleico
H3K9	Histona H3 lisina 9
HMTasa	Metiltransferasa de histona
HP1	Proteína heterocromatina 1
INEGI	Instituto Nacional de Geografía y Estadística
lncRNA	RNA largo no codificante
MDa	Mili daltons
MEFs	Fibroblastos embrionarios de ratón
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid, RNA mensajero
MSF	Fibroblastos de piel de ratón neonato
NK	Células Natural Killer
NSFs	Fibroblastos de piel de ratopín neonato
OMS	Organización Mundial de la Salud
PEI	Polietilimina
PRC1/2	Complejo represor Polycomb 1 y 2
RD	Dominio Regulatorio
RNA	Ribonucleic acid, Ácido Ribonucleico
ROS	Reactive Oxygen Species, Especies Reactivas de Oxígeno
SAHFS	Senescence Associated Heterocromatic Foci, Focos de heterocromatina asociados a la senescencia
SASP	Senescence-Associated Secretory Phenotype, Fenotipo Secretor Asociado a Senescencia
SA-β-gal	Senescence-Associated β-galactosidase, β-galactosidasa asociada a senescencia
SBB	Sudan Black B

Resumen

El envejecimiento es el principal factor de riesgo de la mayoría de las enfermedades asociadas a la vejez, pero los mecanismos fundamentales que lo impulsan siguen siendo en gran parte desconocidos, lo que ha impedido el desarrollo de intervenciones que podrían aumentar la esperanza de vida saludable y prevenir el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas.

El envejecimiento es un estado de degeneración progresivo que se acompaña, entre otras características, de la acumulación de células senescentes. La senescencia celular se define como un estado estable de inhibición del ciclo celular en el cual las células no responden a estímulos mitogénicos debido a la expresión de las proteínas inhibidoras de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a} y p21^{CIP/WAF}. Las células senescentes adquieren un fenotipo secretorio con el cual alteran el tejido circundante, lo que contribuye al envejecimiento y desarrollo de enfermedades crónicas, ya que la eliminación de células senescentes mejora la salud y reduce el envejecimiento.

El roedor más longevo, la rata topo desnuda o ratopín (*Heterocephalus glaber*), tiene una vida saludable de más de 30 años, no muestra enfermedades asociadas al envejecimiento como cáncer, neurodegeneración, enfermedades cardiovasculares entre otras, ni aumenta su tasa de mortalidad con el paso del tiempo. Estas características indican que ha desarrollado mecanismos anti-envejecimiento eficientes. Aunque la forma en que resisten los procesos de envejecimiento no se conoce, resalta el hecho de que no parece acumular células senescentes, y sus células son menos susceptibles a volverse senescentes por daño al DNA (por sus siglas en inglés, *Deoxyribonucleic acid*).

El locus *Ink4a/b* codifica para p16^{INK4a}, p15^{INK4b} y una proteína llamada p19^{Arf}. En el ratopín se produce, por procesamiento alternativo del mRNA (por sus siglas en inglés, *Messenger Ribonucleic Acid*), un producto adicional al que se le denominó pALT^{INK4a/b}. En este trabajo se planteó la hipótesis de que las células de ratopín son resistentes a la senescencia celular por la expresión y acción de pALT^{INK4a/b}. Para probar la hipótesis se expresó de manera heteróloga pALT^{INK4a/b} en fibroblastos de piel de ratón y se encontró efectivamente una reducción en el establecimiento de senescencia celular inducida por daño al DNA, concomitante con una mayor muerte celular. Estos resultados sugieren que la expresión de pALT^{INK4a/b} previene el establecimiento de la senescencia celular y en cambio favorece la reparación del DNA o muerte celular. Este estudio contribuye a entender por qué el ratopín no acumula células senescentes y es resistente al cáncer.

1. Introducción

A lo largo de la historia, el envejecimiento ha sido un tema que ha llamado la atención de científicos y filósofos, esto no es de extrañarse puesto que es un proceso universal del que ningún ser humano está exento. Una definición interesante y que ilustra la percepción que al menos la mayoría de los humanos tiene de este fenómeno, es de Giacomo Leopardi (1798-1837) "La vejez es el mal supremo, porque nos priva de todos los placeres, dejándonos sólo el apetito por ellos, y trae consigo todos los sufrimientos. Sin embargo, tememos la muerte y deseamos la vejez" (da Costa, J., et al., 2016).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) entre 2000 y 2050, la proporción de los habitantes del planeta mayores de 60 años se duplicará, pasando del 11% al 22%. En números absolutos, este grupo de edad pasará de 605 millones a 2000 millones en el transcurso de medio siglo (WHO, 2021). Los resultados del Censo de Población y Vivienda del 2020 realizado por el INEGI (Instituto Nacional de Geografía y Estadística), indican que en el país también se observa un gradual proceso de envejecimiento, que se ve reflejado en la edad mediana, que pasó de 26 a 29 años en la última década, y en el aumento del porcentaje de la población de 60 años y más, que pasó de 9.1% en 2010 a 12.0% en 2020 (INEGI, 2021).

La incidencia de enfermedades asociadas a la edad, como la enfermedad de Alzheimer, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer se duplica esencialmente cada 5 años después de los 60 años. En ausencia de nuevas estrategias médicas y de bienestar, el mundo experimentará una carga insostenible de enfermedades crónicas que ya se observa a nivel social y económico (Chakravarti, et al., 2020).

1.1 Gerociencia

La gerociencia es un campo de investigación basado en el abordaje conjunto de la biología del envejecimiento y la biología de las enfermedades relacionadas a la edad. Este abordaje surge debido a que el envejecimiento es el mayor factor de riesgo para muchas enfermedades crónicas y discapacidades que afectan a los humanos conforme envejecen. Los adultos mayores rara vez sufren de una sola enfermedad, por el contrario, con frecuencia experimentan múltiples morbilidades. Al tratar el envejecimiento y no solo las

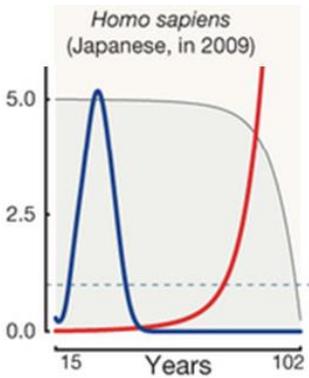
enfermedades relacionadas se busca prolongar la vida saludable mediante la reducción de la tasa de envejecimiento, logrando así retrasar la aparición de múltiples enfermedades a la vez. La gerociencia tiene como objetivo entender cómo el proceso de envejecimiento *per se* permite el desarrollo de enfermedades para utilizar ese conocimiento y desarrollar intervenciones factibles, prácticas y seguras que retrasen el envejecimiento, y con eso la aparición y progresión de las enfermedades relacionadas con la edad. Dichas intervenciones reducirían drásticamente los costos de atención médica y mejorarían significativamente la calidad de vida (AFAR, 2021).

A pesar de las numerosas teorías que se han propuesto para explicar el fenómeno del envejecimiento, hasta ahora ninguna ha sido capaz de explicar plenamente los mecanismos que impulsan los procesos fundamentales del envejecimiento. Una perspectiva que puede ayudar a entender los mecanismos de envejecimiento es la Biología Comparada, pues la tasa de envejecimiento es variable entre las especies, lo que permite saber que es posible desacoplar el envejecimiento de la longevidad. El estudiar cual es la de la variabilidad en la duración de la vida observada entre los animales y la diversidad de tasas de envejecimiento, puede ayudarnos a entender los mecanismos biológicos que retrasan o aceleran el envejecimiento (Wagner, et al., 2016).

1.2 Varían los perfiles de envejecimiento entre las especies

El entendimiento del envejecimiento es un reto clave en la investigación biológica básica y aplicada debido a que es un proceso complejo y multifactorial (Reichard M., 2017). A pesar de que existen vías que regulan la esperanza de vida que están conservadas en organismos que incluyen a la levadura, los nemátodos, la mosca de la fruta y el ratón, muchos taxones intermediarios en el árbol de la vida parecen no envejecer. Adicionalmente, existe gran variación en los mecanismos y patrones de envejecimiento, en ocasiones incluso entre especies muy cercanamente relacionadas (Cohen A., 2018). En general, la comparación del envejecimiento entre especies se realiza desde una perspectiva demográfica, así el envejecimiento puede ser definido como un incremento inexorable en la mortalidad con la edad. Es importante destacar que esta definición de envejecimiento se desacopla de la esperanza de vida, ya que existen organismos con alta mortalidad extrínseca que no envejecen, mientras que por otro lado hay organismos de larga vida que sí lo hacen. Otro

aspecto importante es que tanto las tasas como los patrones de envejecimiento demográficos dependen altamente de las condiciones ambientales, las cuales pueden afectar las tasas de mortalidad de diferentes especies. Por ejemplo, la hydra (*Hydra vulgaris*) tiene una elevada mortalidad extrínseca debido a depredadores, pero en cautiverio su mortalidad permanece constante a lo largo de su vida. A pesar de que hay limitaciones y retos en la adquisición detallada de datos demográficos para una gran variedad de taxones, los datos demográficos son la vía más prometedora para realizar comparaciones entre especies a lo largo del árbol de vida. Un descubrimiento interesante a partir de estos análisis es que el envejecimiento demográfico parece estar lejos de ser universal, las especies que no envejecen son en realidad comunes a lo largo del árbol de la vida. Un ejemplo interesante es la rata topo desnuda o ratopín (*Heterocephalus glaber*), ya que no presenta un incremento en la mortalidad conforme aumenta su edad, y tampoco tiene un pico de mortalidad evidente a ninguna edad en particular, como ocurre muy claramente en el perfil de envejecimiento del humano, en el que una vez pasado el pico de fertilidad la mortalidad comienza a incrementar de forma exponencial. En la tabla 1 se muestran algunos de los perfiles de envejecimiento que existen y ejemplos de organismos que pertenecen a cada tipo.

Perfil	Características	Organismos
<p data-bbox="245 1188 621 1220">Envejecimiento Hamiltoniano</p> 	<p data-bbox="660 1188 1066 1308">Incremento exponencial en la mortalidad después de la edad de la primera reproducción.</p>	<p data-bbox="1118 1188 1395 1352">Mayoría de mamíferos, aves, serpientes, nemátodos, plantas, mosca de la fruta.</p>
<p data-bbox="256 1682 610 1755">Semelparidad / Envejecimiento catastrófico</p>	<p data-bbox="660 1682 1066 1801">Una sola reproducción seguida de un deterioro fisiológico rápido y muerte.</p>	<p data-bbox="1118 1682 1411 1801">Salmón del pacífico, ratón marsupial, efímeras, plantas anuales.</p>

<p>Sin envejecimiento</p>	<p>Tasas de mortalidad invariables a lo largo de la vida adulta.</p>	<p>Hydra</p>
<p>Envejecimiento nimio</p>	<p>Las tasas de mortalidad son casi invariables o incluso disminuyen modestamente a lo largo de la vida adulta, pero son más variables que el perfil de no envejecimientos o no son lo suficientemente largos como para asegurar que el envejecimiento no aparecerá eventualmente.</p>	<p>Algunas tortugas, algunos anfibios, muchos invertebrados marinos, algunas algas marinas, algunos árboles, algunas plantas herbáceas, ratopín.</p>

Tabla 1. Existe una gran diversidad de tasas y patrones de envejecimiento a lo largo del árbol de la vida.

Se muestran algunos de los perfiles de envejecimiento que existen, así como ejemplos de los organismos que pertenecen a cada tipo de envejecimiento. Las gráficas muestran la mortalidad relativa (rojo) y fecundidad (azul) en función de la edad, desde la madurez hasta la edad en que sólo el 5% de la población adulta sigue viva; La mortalidad y la fecundidad se escalan en relación con sus medias. La supervivencia (en una escala logarítmica) desde la madurez se representa mediante las áreas sombreadas. Las líneas discontinuas, para trayectorias derivadas de matrices de proyección, comienzan a la edad en que las cohortes han convergido dentro del 5% de su distribución cuasi estacionaria. Puede observarse como la mortalidad y fertilidad varían mucho en algunos casos, no existe un patrón único. Modificada de Cohen A., 2018.

1.3 Definición del Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso fisiológico y dinámico que ocurre en el desarrollo individual de los organismos a través del tiempo (Dziechciaz, et al., 2014), aunque como ya mencionamos ocurre a diferente tasa en diferentes especies. Está caracterizado por la aparición procesos degenerativos que, a su vez, se sustentan en múltiples alteraciones y daños en las vías moleculares. Las alteraciones y daños finalmente comprometen las funciones celulares y tisulares. Estos cambios pueden ser la causa de que el envejecimiento sea el principal factor de riesgo de la mayoría de las enfermedades no transmisibles, como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la diabetes y las enfermedades neurodegenerativas (Wagner, et al., 2016). En 2013, López-Ortín y colaboradores propusieron nueve marcadores que se considera que contribuyen al proceso del envejecimiento, estos marcadores incluyen al daño genómico y al acortamiento telomérico, a alteraciones epigenéticas, a la desregulación de la proteostasis y el censado de nutrientes, a la disfunción mitocondrial, al agotamiento de la reserva de células troncales, al deterioro de la comunicación entre la células, y a la senescencia celular (López-Ortín et al., 2013). Sin embargo, en el 2022 en el simposio “New Hallmarks of Ageing” llevado a cabo en Dinamarca se acordó anexar cinco marcadores más, como la autofagia comprometida, la desregulación del *splicing* del RNA (por sus siglas en inglés, *Ribonucleic acid*), la inflamación, la pérdida de la integridad del citoesqueleto y la alteración del microbioma (Figura 1) (Schmauck, T., et al., 2022). Para definir que estas características llevan al envejecimiento deben cumplir con tres criterios: 1) deben manifestarse durante el envejecimiento normal, 2) su inducción en ensayos experimentales debe acelerar el envejecimiento, y 3) su atenuación en ensayos experimentales debe retardar el proceso normal de envejecimiento y por lo tanto incrementar la vida saludable (López-Ortín et al., 2023).

En este trabajo nos centramos en el estudio de la senescencia celular, ya que su eliminación disminuye las manifestaciones de diversas enfermedades y retrasa el envejecimiento, como se detalla a continuación.

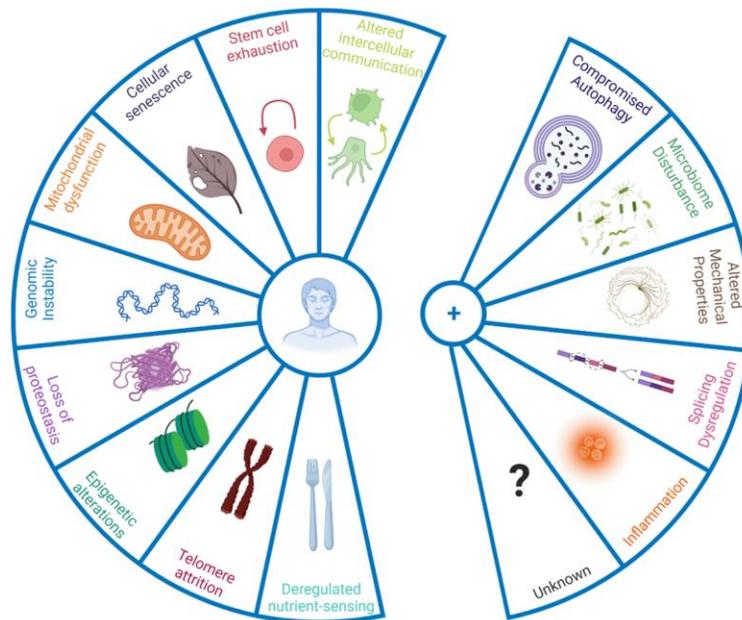


Figura 1. Los nuevos marcadores de envejecimiento. La figura muestra los marcadores de envejecimiento originales más los cinco nuevos marcadores propuestos. Para calificar como marcador el proceso debe de cambiar con la edad biológica no simplemente en una forma correlativa, sino que debe tener un rol causal. Tomada de Schmauck, T., et al., 2022.

1.4 Senescencia Celular

La senescencia es un estado celular que juega un papel fisiológico importante en el desarrollo embrionario, la reparación tisular, la supresión tumoral, la cicatrización de heridas y la secreción de insulina por las células pancreáticas. En estos procesos celulares la presencia de las células senescentes es transitoria, siendo eliminadas oportunamente por las células del sistema inmunológico como macrófagos y células *Natural Killer* (NK), una vez que desempeñaron su función de señalización (Mohamad-Kamal, N., et al, 2020). Sin embargo, la desrepresión del locus *Ink4*, el daño al DNA y el aumento del estrés oxidante, entre otros eventos que ocurren durante el envejecimiento, causan la acumulación de células senescentes persistentes que generan efectos deletéreos en múltiples órganos y en las funciones sistémicas. El término fue formalmente descrito en 1961 por Hayflick y colegas, derivado del latín *senex* que significa viejo (Amaya, M., et al., 2020). Las células senescentes se caracterizan por un arresto del ciclo celular prolongado y generalmente irreversible, una morfología aplanada y alargada, una resistencia a la apoptosis, la falta de respuesta a estímulos mitóticos, la alteración en la expresión génica y en la estructura de

la cromatina, la expresión de SA- β -gal (por sus siglas en inglés, *Senescence-Associated β -galactosidase*) como consecuencia del aumento del contenido lisosomal, el daño macromolecular, un metabolismo alterado y la adquisición de un fenotipo secretor conocido como SASP (por sus siglas en inglés, *Senescence-Associated Secretory Phenotype*). A continuación, se detallan algunas de estas características.

1.4.1 La desrepresión del locus INK4-ARF inhibe el ciclo celular e induce la senescencia

El arresto del ciclo celular que se genera en la fase G1 del ciclo celular en las células senescentes difiere del arresto celular observado en las células quiescentes y en la diferenciación terminal en que, por un lado, las células quiescentes presentan un arresto temporal con una proliferación reinstaurada por estímulos mitóticos, mientras que la diferenciación terminal es la adquisición de funciones celulares específicas acompañada de un arresto celular mediado por vías de señalización diferentes a las de la senescencia celular. En las células de mamífero, la familia de proteínas de retinoblastoma (RB) y p53 son importantes para establecer el arresto del ciclo celular. RB1 y los miembros de su familia p107 y p130 son fosforilados por cinasas dependientes de ciclina específicas, lo que reduce la habilidad de los miembros de la familia para reprimir la actividad del factor de transcripción E2F, requerido para la progresión del ciclo celular. En las células senescentes se acumulan las proteínas p21^{CIP1/WAF}, el inhibidor de CDK2 (Cinasa Dependiente de Ciclina 2) y p16^{INK4A}, el inhibidor de CDK4/6, de manera que esta acumulación resulta en la activación persistente de las proteínas de la familia de RB y en la inhibición de la transactivación de E2F, con el consecuente arresto del ciclo celular, el cual no puede ser revertido por la inactivación de las proteínas de la familia RB o de p53 (Simboeck, E., et al., 2011). En respuesta a daño al DNA p21^{CIP1/WAF} es responsable del arresto del ciclo celular inicial, en células con poco o moderado daño, previniendo la entrada a la fase S bajo condiciones poco favorables para la replicación, si el daño es reparado exitosamente las células pueden entrar nuevamente al ciclo celular, pero si el arresto es prolongado esto conduce a la activación de p16^{INK4A}, y una expresión prolongada de p16^{INK4A} resulta en un arresto del ciclo celular perdurable (Childs, B., et al., 2014).

El locus *INK4-ARF* es un regulador crítico de la senescencia celular. Este locus se localiza en la región cromosómica 9p21, incluye a los genes *CDKN2A* y *CDKN2B* y codifica tres productos génicos: p15^{INK4b}, p16^{INK4a} y p14^{ARF} en humano o p19^{ARF} en ratón (Figura 2). Las

proteínas codificadas en este locus se acumulan durante la inducción de la senescencia y conducen al arresto del ciclo celular. El estrés replicativo y oncogénico, así como los cambios epigenéticos que ocurren en el envejecimiento, desreprimen al locus *INK4-ARF* y conducen a la senescencia celular. Además, el locus tiene un papel esencial en la supresión tumoral, como se evidencia en el hecho de que alteraciones genéticas en este locus se han encontrado en aproximadamente el 50% de todos los cánceres humanos (Poi, M., et al., 2017).

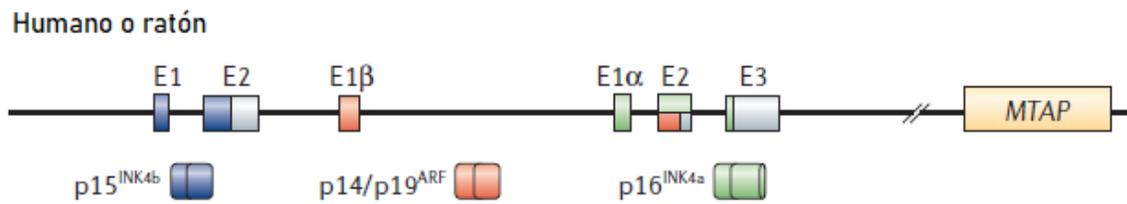


Figura 2. Organización de locus *INK4a/b* en humano y ratón. p14^{ARF} en humano y p19^{ARF} en ratón.
Modificada de Gil, J., et al., 2006.

Las proteínas p15^{INK4b} y p16^{INK4a} son inhibidoras de las cinasas dependientes de ciclina CDK4/6 que previenen la fosforilación de pRB y por lo tanto regulan la progresión del ciclo celular en la transición G1/S. La proteína p19^{ARF} activa la apoptosis o el arresto del ciclo celular mediado por p53, al evitar su degradación mediante la modulación negativa de su ligasa de ubiquitina E3, conocida como MDM2 (Simboeck, E., et al., 2011) (Figura 3).

Suz12 y Cbx7, las cuales reclutan al complejo represor Polycomb 1 y 2 (PRC1/2) al locus, conduciendo a la modificación de histonas y al silenciamiento del locus (Figura 4) (Gamell, C., et al., 2017).

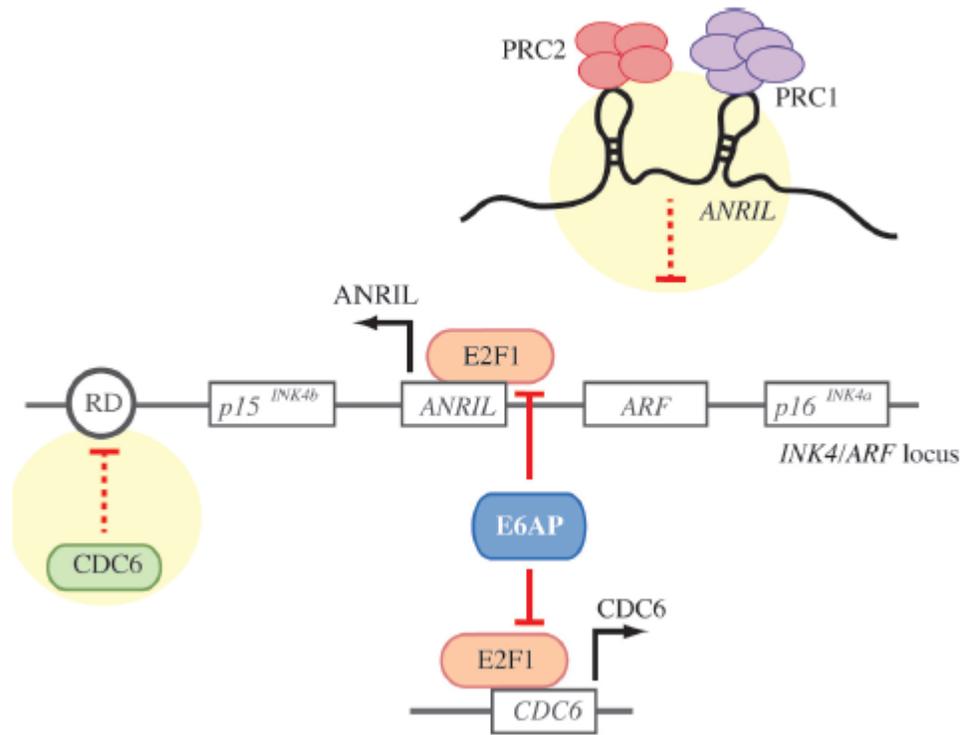


Figura 4. Modelo esquemático que ilustra la regulación de la expresión de genes del locus INK4a/b. El dominio regulador (RD) tiene una actividad de enhancer que impacta en la expresión de todos los productos del locus, la unión de CDC6 y BM11 a RD ocasiona el silenciamiento del locus, mientras que E6AP actúa como regulador positivo inhibiendo la expresión de CDC6 al interactuar con E2F1. ANRIL es un RNA largo no codificante que promueve la represión epigenética del locus mediante la interacción con el complejo represor Polycomb 1 y2. Modificada de Gamell, C., et al., 2017.

Una de las subunidades de PRC2 es EZH2, una metiltransferasa de histona (HMTasa) específica para la H3K27, a la cual trimetila (H3K27me3) y cuya modificación promueve el reclutamiento de PRC1. El complejo PRC1 contiene una proteína de dedos RING (RING1B), así como a las proteínas BM11, HPH y CBX, que orquestan la monoubiquitinación de H2AK119 (H2K119ub). Ambas marcas epigenéticas, H3K27me3 y H2K119ub, son represivas y desencadenan el silenciamiento mediante la compactación del DNA (Simboeck, E., et al., 2011). Las proteínas del grupo trithorax tienen una función importante en la activación del locus, específicamente el complejo SWI/SNF, que es un

complejo remodelador de la cromatina que utiliza al ATP (Adenosín Trifosfato) para repositonar a los nucleosomas y remodelar la cromatina, y la HMTasa de linaje mixto de leucemia 1 (MLL1), que trimetila la H3K4 (H3K4me3) y conduce a la activación epigenética del locus *INK4/ARF*, lo que induce la senescencia celular (Figura 5).

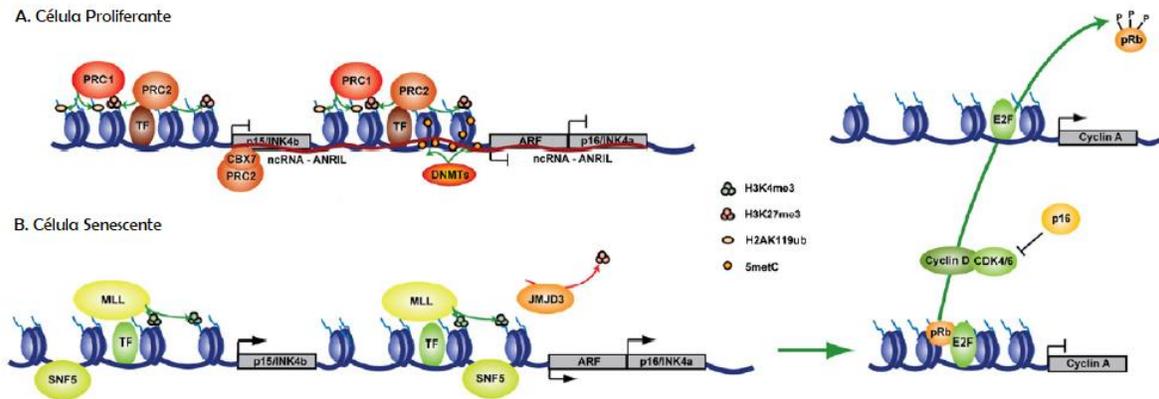


Figura 5. Representación esquemática del locus *INK4a/b*. A) Represión del locus *INK4a/b* en una célula proliferante controlada por interacción de moduladores de cromatina. B) Activación del locus *INK4a/b* en una célula senescente.

Modificada de Simboeck, E., et al., 2011.

En el envejecimiento hay una desrepresión de este locus, lo que resulta en la expresión de p16^{INK4a}. Por lo tanto, el locus *INK4-ARF* juega un papel fundamental en la promoción del envejecimiento, pues al limitar la proliferación y la autorrenovación en varios tejidos se induce senescencia celular. Estudios de asociación de todo el genoma en humanos han relacionado al locus *INK4-ARF* con una serie de enfermedades asociadas al envejecimiento y con la fragilidad en los seres humanos (Matheu, A et al., 2009).

1.4.2 Las células senescentes alteran el tejido circundante

Las células senescentes secretan una variedad de factores, que incluyen citocinas y quimiocinas proinflamatorias, moduladores del crecimiento, factores angiogénicos y metaloproteinasas de matriz (MMPs), lo que constituye un marcador de las células senescentes y media muchos de sus efectos fisiopatológicos, como el reforzamiento y la propagación de la senescencia de forma autócrina y parácrina, y activa respuestas inmunes que eliminan a las células senescentes en situaciones fisiológicas. En el envejecimiento ya

no son eliminadas las células senescentes y la constante secreción de citocinas y quimiocinas genera inflamación crónica (Mohamad-Kamal, N., et al, 2020) (Figura 6).

El fenotipo secretor tipo SASP, es regulado por el remodelamiento de *enhancers* y por la activación de factores de transcripción como NF- κ B, C/EBP β , GATA4, y de las vías de señalización mTOR y p38MAPK. Las señales que conducen a la activación de SASP, así como su composición y fuerza son múltiples y varían sustancialmente dependiendo de la duración de la senescencia, el origen del estímulo, y el tipo celular (Lopes, S., et al., 2019).

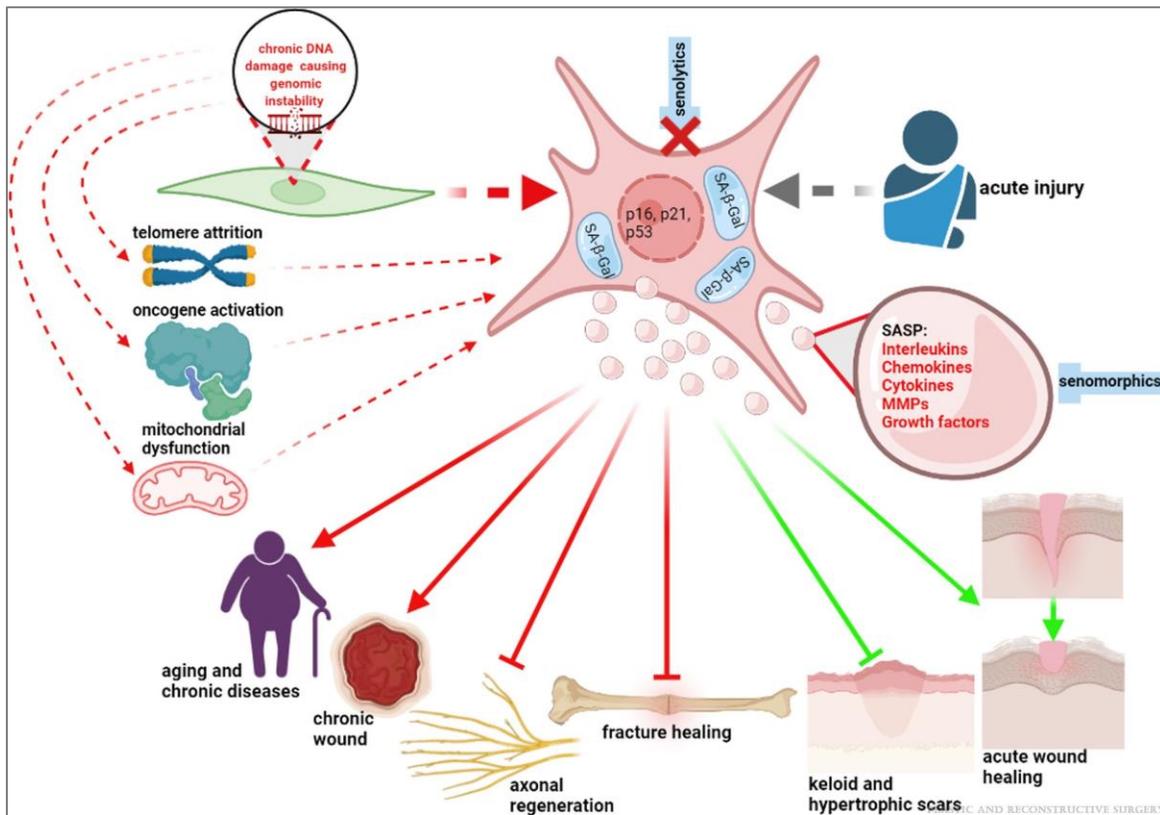


Figura 6. Papel fisiológico y efectos adversos del SASP. Las células senescentes son importantes en el desarrollo y en el cierre de heridas, sin embargo, en el envejecimiento y enfermedades crónicas el SASP puede promover efectos adversos para la salud. Tomada de Shvedova, M., et al., 2022.

1.4.3 Las células senescentes tienen una respuesta al daño del DNA sostenida

La primera característica molecular asociada con senescencia fue el acortamiento de telómeros como resultado de un problema de replicación de los extremos del DNA durante la acumulación de duplicaciones celulares, lo que activa la vía de respuesta al daño

del DNA (DDR por sus siglas en inglés, *DNA Damage Response*) conduciendo a la activación de las cinasas ATM o ATR, las cuales bloquean el ciclo celular estabilizando a p53, que lleva a la expresión del inhibidor de cinasa dependiente de ciclina p21^{CIP1/WAF}. Eventualmente este daño puede ser reconocido como ruptura de doble cadena, lo cual conduce a activación de las vías DDR y reparación del DNA. La activación de la vía DDR es revelada por la ocurrencia de focos de la histona fosforilada conocida como γ H2AX en sus alrededores, estos focos son característicos de células de animales viejos y células senescentes *in vitro* (Amaya, M., et al., 2020).

1.4.4 Las células senescentes pierden proteostasis

La proteostasis se refiere a la homeostasis de proteínas, que incluye la síntesis controlada, el plegamiento y la degradación de proteínas. Cuando este equilibrio se pierde resulta en proteotoxicidad, que es otro marcador de envejecimiento y senescencia celular. Una gran fuente de daño proteico son las especies reactivas de oxígeno, que oxidan a los residuos de metionina y cisteína, y alteran su correcto plegamiento y función, adicionalmente las especies reactivas de oxígeno en presencia de metales pueden carbonilar prolina, treonina, lisina y arginina, lo que ocasiona la exposición de superficies hidrofóbicas conduciendo al mal plegamiento y la agregación de las proteínas (Zhang, C., & Cuervo, A. M., 2008). El subsecuente entrecruzamiento con azúcares y lípidos forma agregados insolubles llamados lipofuscina. La contribución relativa de los principales componentes de la lipofuscina puede ser aproximada a dos tercios de proteína, y un tercio de lípidos, el hierro es el metal predominante en la lipofuscina (Gray, D. A., & Woulfe, J., 2005). Esta compleja mezcla de proteínas oxidadas y residuos de la degradación de lípidos pueden visualizarse en lisosomas por microscopía de fluorescencia, ya que autofluoresce. Adicionalmente la lipofuscina también puede ser identificada mediante la tinción Sudan Black B (SBB), una tinción histoquímica lipofílica. SBB es un colorante ligeramente básico soluble en grasas como esteroides, triglicéridos neutros y fosfolípidos debido a que se une a los grupos ácidos presentes en ellos, por lo tanto, durante la tinción el SBB deja el solvente en el que se encuentra en solución (Buffer de fenol generalmente) como resultado de que tiene una mayor solubilidad en los lípidos que en el solvente (Georgakopoulou, E. et al., 2013).

1.4.5 Las células senescentes tienen cambios en la estructura de la cromatina

Otra característica de las células senescentes, asociada con los cambios en la morfología de la cromatina, son los focos de heterocromatina (SAHFs, por sus siglas en inglés), que pueden visualizarse como focos densos cuando se tiñen los núcleos con el marcador fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), y se encuentran enriquecidos con la proteína heterocromatina 1 (HP1). La senescencia también correlaciona con una pérdida global de la proteína de unión H1. Es importante resaltar que la presencia de SAHFs parece ser específica del tejido y dependiente del estímulo, ya que no se observa en todas las células senescentes. Una baja cantidad de lámina B1, el principal componente de la lámina nuclear es otra característica que se ha encontrado en las células senescentes, y correlaciona con un cambio en las marcas epigenéticas, así como con SAHFs. Su reducción ocurre predominantemente en regiones ricas en H3K9me3, un proceso que parece liberar a la H3K9me3 de la lámina nuclear promoviendo un re-arreglo espacial de la H3K9me3 en la heterocromatina para formar SAHFs (Gorgoulis, V., et al., 2019).

Actualmente no existe un único marcador con absoluta especificidad de células senescentes. La especificidad de los marcadores varía dependiendo del tipo celular, el estado del desarrollo del organismo, la especie, entre otros factores. Sin embargo, algunos marcadores tienen una mayor validez universal, mientras que otros están relacionados a tipos específicos de senescencia. Por lo tanto, generalmente se utiliza un enfoque que combine la detección de varias características para estudiar a las células senescentes.

1.4.6 La quiescencia se distingue de la senescencia celular

Es importante distinguir entre senescencia y quiescencia, pues además de que en ambos estados celulares se detiene el ciclo celular e incrementa la actividad de SA- β gal (Alessio, N., et al., 2021), por lo que es necesario el análisis de varios marcadores que en conjunto permitan la correcta identificación del estado senescente. La quiescencia es definida como un paro de la proliferación celular temporal que es reversible. La reversibilidad es una característica que define a la quiescencia celular, a diferencia de las células en otros estados no proliferantes, incluyendo la diferenciación terminal y la senescencia, ya que solo las células quiescentes normalmente retienen la habilidad de reanudar la proliferación celular si existe un estímulo mitótico. También existen varios niveles de quiescencia que

pueden ser descritos dependiendo de las actividades celulares, por ejemplo, los fibroblastos una vez que entran en quiescencia continúan exhibiendo una gran actividad de varias vías metabólicas, mientras que otras células reducen drásticamente su metabolismo general y entran en latencia, una especie de forma extrema de quiescencia (Jones S., & Lennon J., 2010). En general, la quiescencia comprende un gran número de situaciones celulares que dependen del tipo celular y del nicho ambiental. A través de la evolución, la aparición de organismos multicelulares está muy asociada con la adquisición de la capacidad de entrar en quiescencia, incluso en condiciones en que las células se encuentran en ambientes ricos en nutrientes. En organismos complejos, el cese de la proliferación en el lugar y tiempo justos es crítico durante el desarrollo. Un balance controlado entre la proliferación y la quiescencia es crucial para la regeneración de tejidos después de alguna herida, para la hematopoyesis, la respuesta inmune, la renovación de los epitelios y en general para el mantenimiento del organismo completo. El establecimiento y la salida de la quiescencia mediante la regulación de la proliferación celular, debe estar altamente controlada para evitar situaciones patológicas como la depleción de células troncales y tumorigénesis. Cada vez existen más evidencias de que la composición y las propiedades físicas del microambiente juegan un papel central en la regulación de la quiescencia (Sagot, I., & Laporte, D., 2019).

Es de gran relevancia conocer a las vías de señalización que regulan el destino celular, ya sea hacia la senescencia o hacia la quiescencia. El destino celular depende de la expresión espacio-temporal de moléculas clave, como genes supresores de tumores, proto-oncogenes, genes reguladores del ciclo celular, entre otros. p53 es uno de los principales reguladores del destino celular, inhibiendo la proliferación y conduciendo a la senescencia o a la apoptosis. MDM2 es una de las proteínas reguladoras que controla el recambio de p53, cuando los niveles de p53 incrementan, p53 induce la transcripción de MDM2 y después, MDM2 inicia la ubiquitinación y degradación proteolítica de p53 bajo condiciones normales. Se ha reportado que la geroconversión (transición de quiescencia a senescencia) después del arresto del ciclo celular vía la inhibición de CDK4, ocurre solo después de la degradación proteolítica de MDM2, que se presume es promovida por la activación de ATRX. mTOR es una molécula clave en el cambio de quiescencia a senescencia, favoreciendo la senescencia sobre la quiescencia en un arresto del ciclo celular inducido por p21^{CIP1/WAF}. Con esto de base, mientras que la máxima activación de p53 bloquea a mTOR y conduce a la quiescencia, una activación parcial de p53 causa

preservación de mTOR y una subsecuentemente senescencia. Las células senescentes no paran de crecer debido a mTOR funcional y a otros factores de crecimiento, mientras que las células quiescentes dejan de crecer sin perder su potencial proliferativo (Demidenko, Z., & Blagosklonny, M., 2008). (Figura 7).

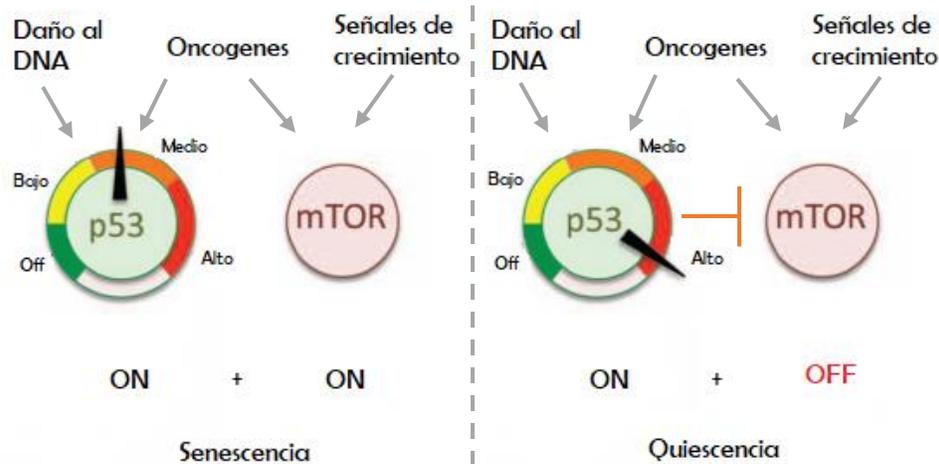


Figura 7. La actividad de p53 cambia el destino celular de senescencia a quiescencia.
Modificada de Serrano, M., 2010.

Comparada con la quiescencia, la principal diferencia importante con el fenotipo senescente es la continua actividad de mTOR que regula el crecimiento celular, la autofagia y otras actividades como el metabolismo lisosomal. En un experimento de cultivo *in vitro* se demostró que las células cambian su fenotipo de senescencia a quiescencia cuando se inhibe mTOR (Serrano, M., 2010).

Un rol aún más importante en el mantenimiento de la quiescencia esta dado por la proteína HES1, la cual es suficiente para prevenir la senescencia asociada con la expresión ectópica de p21^{CIP1/WAF}, así como la diferenciación terminal de fibroblastos inducida por MYOD, mientras que su inactivación ocasiona que las células entren en un estado irreversible de senescencia (Sang, L., et al., 2008). Los mecanismos moleculares por los cuales HES1 regula la expresión génica incluyen la modificación de histonas, lo que afecta la conformación de la cromatina. HES1 es miembro de una subfamilia de proteínas básicas helix-loop-helix (bHLH) relacionadas con *Hairy*, altamente conservada en vertebrados originalmente descritas en *Drosophila melanogaster*.

1.5 La acumulación progresiva de células senescentes causa envejecimiento y el desarrollo de múltiples enfermedades relacionadas con la edad

Existe evidencia abundante que demuestra que la acumulación progresiva de células senescentes está asociada con el envejecimiento y con el desarrollo de múltiples enfermedades relacionadas con la edad. La profunda influencia que la acumulación de células senescentes tiene en un organismo ha sido comprobada eliminando a las células senescentes utilizando distintos enfoques genéticos. Un trabajo pionero fue la utilización de un modelo de ratón transgénico que permite la eliminación específica de células que se vuelven senescentes (Las células senescentes desreprimen al locus *INK4-ARF* y expresan *Cdkn2a* [el gen que codifica para p16^{INK4A}]). Esto se logró al poner bajo el control del promotor de *Cdkn2a* una construcción que tiene la caspasa 8 fusionada a un fragmento de la proteína FKBP (a donde se une una molécula dimerizante), así al administrar la molécula dimerizante se induce la activación de la caspasa 8, esto resulta en la apoptosis de estas células. Con este modelo se observó el incremento de la esperanza de vida y una disminución de la incidencia y retraso en la progresión de diversas características del envejecimiento, y de patologías como el cáncer (Baker, D., et al, 2011). Posteriormente, se ha corroborado la contribución de la senescencia celular tanto al envejecimiento como a diversas enfermedades asociadas a la vejez por métodos genéticos y farmacológicos (Borghesan, M., et al., 2020). También en humanos las células senescentes están involucradas en el desarrollo de muchas enfermedades relacionadas con la edad, como se resume en la figura 8.

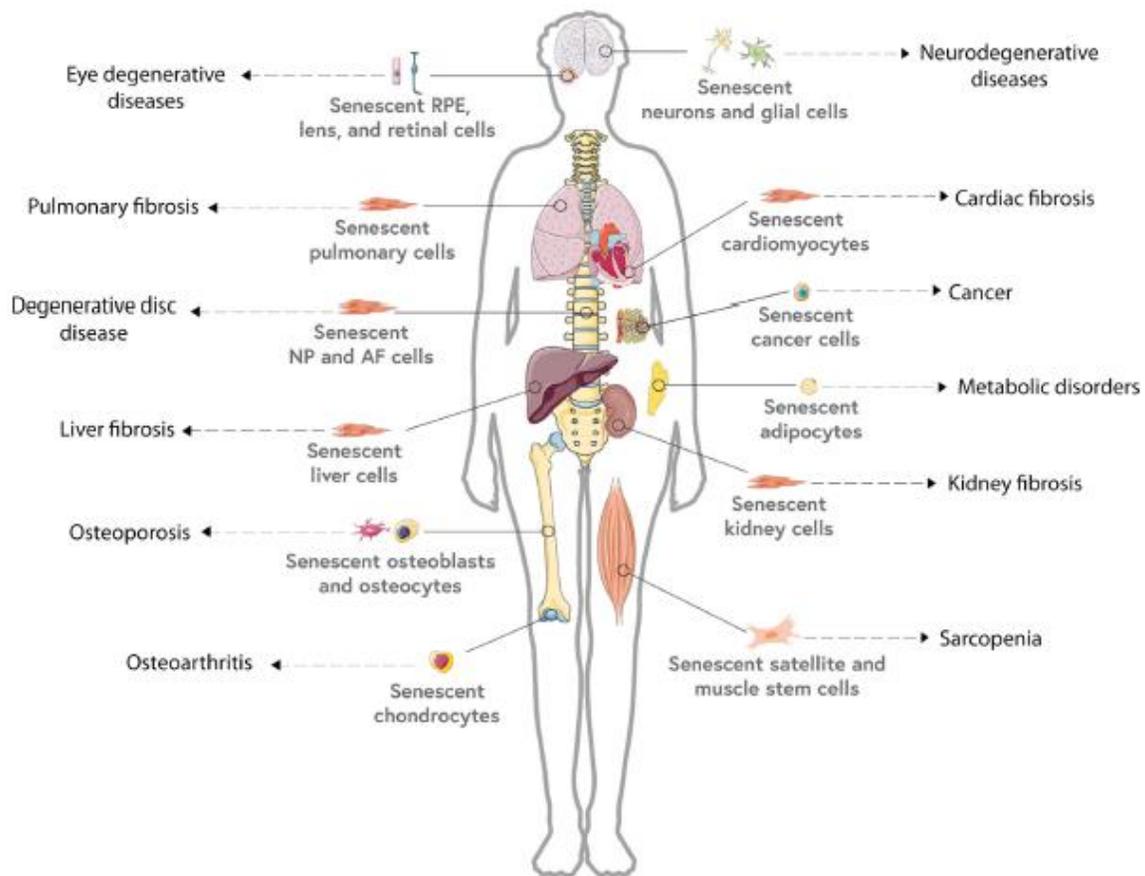


Figura 8. Evidencia experimental muestra que la senescencia celular contribuye a las enfermedades asociadas con la edad indicadas.

Tomada de Borghesan, M., et al., 2020.

Estudios preclínicos han mostrado que la eliminación específica de las células senescentes mediante el uso de senoterapéuticos, puede aliviar las disfunciones asociadas a la edad y la fragilidad (Amaya, M., et al., 2020). Los senoterapéuticos son moléculas que tienen como blanco a las células senescentes, pueden clasificarse en senolíticos que permiten la eliminación específica de las células senescentes mediante la muerte celular y los senomórficos o senostáticos que modulan el fenotipo secretor asociados a senescencia sin inducir la muerte celular. En la tabla 2 se muestran algunos senoterapéuticos y sus blancos moleculares (Borghesan, M., et al., 2020).

Fármaco	Función	Blancos moleculares	Aplicación	Referencias
Desatinab + quercetin	Senolítico	Inhibidor de vía PI3K/AKT	Osteoporosis, degeneración de discos intervertebrales, obesidad, glaucoma, fragilidad, AD, fibrosis pulmonar	Zhu, Y. et al., 2015. Farr, J.N. et al., 2017. Chandra, A. et al., 2020
Navitoclax (ABT-263)	Senolítico	Inhibidor de Bcl-2/Familia Bcl-x	AD, cáncer, rejuvenecimiento de células troncales, fibrosis pulmonar, regeneración de hígado	Schafer, M.J. et al., 2017. Childs, B.G. et al., 2016. Chang, J. et al., 2016. Pan, J. et al., 2017.
ABT-737	Senolítico	Inhibidor de Bcl-2/Familia Bcl-x	Función pulmonar, envejecimiento acelerado, regeneración de hígado	Yosef, R. et al., 2016. Ovadya, Y. et al., 2018. Ritschka, B. et al., 2020.
PZ15227	Senolítico	Inhibidor de Bcl-x	Pérdida de hueso	He, Y. et al., 2020.
A1331852	Senolítico	Inhibidor de Bcl-2/Familia Bcl-x	En líneas celulares HUVEC, IMR90	Zhu, Y. et al., 2017.

				elimina células senescentes.	
A1155463	Senolítico	Inhibidor de Bcl-2/Familia Bcl-x	En líneas celulares HUVEC, IMR90	eliminación de células senescentes.	Zhu, Y. et al., 2017.
UBX0101	Senolítico	Inhibidor de interacción p53/mdm2	Osteoartritis		Jeon, O.H. et al., 2017.
Fenofibrates	Senolítico	Agonista PPAR α	Osteoartritis		Nogueira-Recalde, U. et al., 2019.
AT-406	Senolítico	Inhibidores IAP1/2/XIAP	Osteoartritis		Peilin, W. et al., 2019.
FOXO4-DRI	Senolítico	Inhibidor de interacción de p53/foxo4	Fragilidad, nefropatía, envejecimiento natural		Baar, M.P. et al., 2017.
Cardiac glycosides	Senolítico	Inhibidor de Bomba Na ⁺ /K ⁺	Cáncer, fibrosis pulmonar		Guerrero, A. et al., 2019. Triana-Martinez, F. et al., 2019.
Fisetin	Senolítico	Inhibidor de familia Bcl-2/Bcl-x/PI3K/AKT	Osteoartritis, envejecimiento		Zheng, W. et al., 2017. Yousefzadeh, M.J. et al., 2018.

Piperlongumine	Senolítico	Inhibidor de familia Bcl-2/Bcl-x/PI3K/AKT	Fibroblastos senescentes de pulmón	Wang, Y. et al., 2016.
Curcumin	Senolítico	Inhibidor de amplio espectro (BCL-2, NF-KB)	Degeneración del disco intervertebral	Cherif, H. et al., 2019.
17-DMAG	Senolítico	Inhibidor de HSP-90	Fragilidad, vida saludable	Fuhrmann-Stroissnigg, H. et al., 2017.
Rapamycin	Senomórfico	Inhibidor de mTOR	Osteoartritis, sarcopenia	Garcia-Prat, L. et al., 2016. Yousefzadeh, M.J. et al., 2018.
Metformin	Senomórfico	Activador de AMPK	Osteoartritis, degeneración del disco	Chen, D. et al., 2016. Li, J. et al., 2020.
Ruxolitinib	Senomórfico	Inhibidor de JAK1/2	Osteoporosis, fragilidad	Farr, J.N. et al., 2017. Xu, M. et al., 2015.
NBD peptide/mimetics	Senomórfico	Inhibidor de NF-KB	Envejecimiento, osteoporosis	Tilstra, J.S. et al., 2012.

Tabla 2. Senoterapéuticos y sus blancos moleculares.

Modificada de Borghesan, M., et al., 2020.

Sin embargo, aún hace falta aumentar la especificidad de los senoterapéuticos. El estudio de los mecanismo moleculares que llevan al establecimiento del fenotipo senescente permitirá el desarrollo de nuevas terapias para combatir de manera eficiente las enfermedades relacionadas con la edad y así lograr una mejor y más prolongada calidad de vida.

1.6 *Heterocephalus Glaber*

El ratopín fue descrito por primera vez en Etiopía en 1842 por el naturalista Alemán Eduard Rüppell. Pertenece al suborden *hystricognathi* del orden *Rodentia*, los miembros de este suborden son caracterizados por el esmalte de los incisivos multiseriales, membranas fetales y *sacculus urethralis* similares, huesos del yunque y del martillo fusionados en el oído y la falta de una arteria carótida interna. El suborden incluye caviomorfos (por ejemplo, conejillos de indias), hystricidae (por ejemplo, puercoespines) y fiomorfos (por ejemplo, ratas topo, ratas de roca y ratas de caña). Los ratopines pertenecen a la familia *Bathyergidae*, que incluye seis géneros y más de 15 especies (Deuve et al. 2008). *Heterocephalus* es un género monotípico con un número de cromosomas fijo de 60 y sin variación morfológica. Una característica importante es que son animales eusociales, que viven en colonias de cientos de individuos con una estricta división de labores y con la presencia de una sola hembra reproductora (en general, a veces hay dos) y de uno a tres machos reproductores. La hembra reproductora o reina se encuentra dentro de los animales con mayor rango dentro de la colonia, lleva a cabo poco trabajo aparte de la reproducción y patrullaje de la colonia, su dominancia social se expresa empujando a los miembros de la colonia, durmiendo en la cima del grupo en el nido y pasando sobre otros miembros dentro del sistema de túneles. Se cree que este tipo de dominancia física es importante para mantener la supresión reproductiva en miembros no reproductores, debido a la falta de evidencia de una feromona cebadora urinaria (Holmes, M., & Goldman, B., 2021). Los ratopines viven en regiones áridas y semiáridas del noreste de África, en un ambiente oscuro y húmedo, ya que viven en túneles de profundidad de aproximadamente dos metros. Evidencia fósil ha revelado que los ratopines han ocupado un nicho subterráneo desde el Mioceno, 24 millones de años atrás, por lo que no es de sorprender que hayan desarrollado una serie de adaptaciones que les permiten vivir en ese ambiente, como son la tolerancia a la deficiencia de vitamina D, metabolismo mineral eficiente en ausencia de luz solar,

independencia de fuentes de agua libre y digestión de alimentos de baja calidad dependiente de microorganismos con liberación de ácidos grasos como fuente de energía y microorganismos como fuente de proteína. Como la mayoría de los habitantes endotérmicos subterráneos el ratopín tiene tasas bajas de metabolismo basal y tasas altas de conductancia térmica. No se han realizado mediciones de oxígeno ni dióxido de carbono en las madrigueras de los ratopines, sin embargo, se hipotetiza que las condiciones son altamente hipóxicas e hipercápnicas, debido a la combinación de su vida subterránea con el hecho de que viven en colonias altamente pobladas en las cuales el oxígeno es consumido y el dióxido de carbono se acumula como resultado de la respiración de los ratopines. (Braude, S., et al., 2021). Se sabe que los ratopines pueden tolerar la hipoxia extrema (Larson, J. & Park, T., 2009) e incluso la anoxia (Park, T., et al., 2017), y muestran adaptaciones relacionadas con la hipoxia y la hipercapnia como la utilización de fructuosa en la glucólisis anaerobia, con la cual se evita el punto de control que la PFK1 (Fosfofructoquinasa-1) ejerce al utilizar glucosa como fuente de carbono (Reznick, J., Park, T. J., & Lewin, G. R., 2021). Tienen degeneración visual y gran dependencia del sistema somatosensorial (Edrey, Y., et al., 2011). Exhiben una esperanza de vida máxima de más de 30 años, por lo que se les considera como los roedores más longevos (Ma, S., & Gladyshev, V., 2017).

1.6.1 El ratopín tiene envejecimiento nimio

En cautividad la tasa de mortalidad del ratopín en su primer mes de vida es la más alta, y generalmente se atribuye a un cuidado maternal inadecuado, al canibalismo por los hermanos y a una pobre flora y fauna gastrointestinal (Smith M, y Buffenstein R, 2021) No se ha encontrado una tasa de mortalidad específica en alguna edad particular, pero se ha observado que existe una distribución aleatoria de muertes por causas naturales en todos los grupos de edad. Los ratopines no muestran la típica aceleración en el riesgo de mortalidad asociado a la edad, que caracteriza a casi todos los mamíferos para los que hay disponibilidad de datos detallados de supervivencia (Ruby, et al., 2018) (ver figura 9).

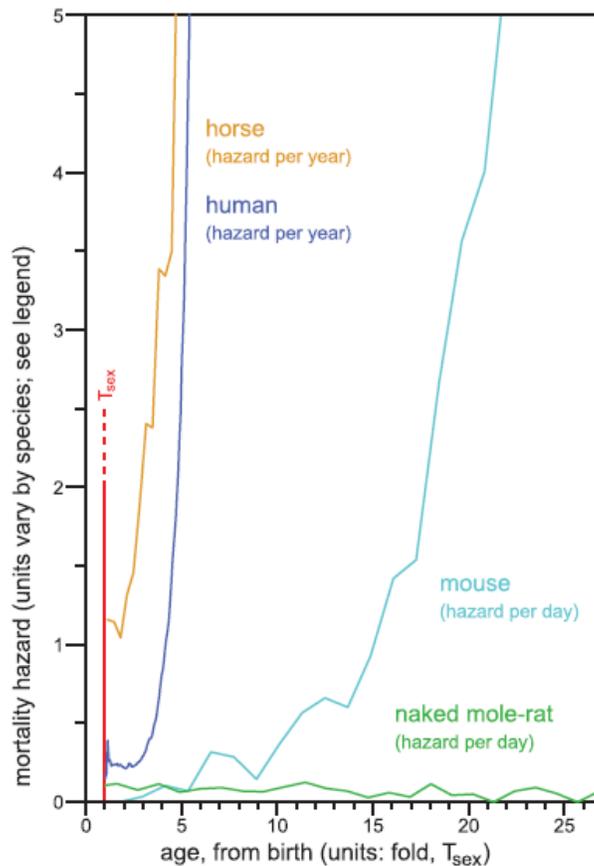


Figura 9. El riesgo de muerte no aumenta con el paso del tiempo en el ratopín, como sí sucede en humanos, caballos y ratones. La gráfica muestra el riesgo de muerte y como este cambia con la edad a partir de la madurez sexual. Tomada de Ruby, et al., 2018.

Además de su extrema longevidad, los ratopines exhiben otras características excepcionales que incluyen alta fertilidad, incluso en reinas de más de 30 años, envejecimiento poco significativo y resistencia al cáncer mediada en parte por el ácido hialurónico, un componente de la matriz extracelular de muy alto peso molecular (6–12 MDa [Mili daltons]) que desencadena una hipersensibilidad a la inhibición de proliferación celular por contacto (Tian, X., et al., 2015). También estos roedores son resistentes a la generación de diabetes, de enfermedades neurodegenerativas y de muchas otras patologías relacionadas con la edad (Saldmann, F., et al., 2019).

La teoría evolutiva del soma desechable establece que los animales gastan más energía en el mantenimiento somático o en procesos reproductivos, por lo tanto, tienen un mayor rendimiento reproductivo durante un período más corto y, debido a que sus tejidos no se mantienen adecuadamente, mueren jóvenes. Adicionalmente, los animales que no

se reproducen inmediatamente, sino que reparan y mantienen su soma, viven más. En el ratopín esto no se cumple, puesto que la gran mayoría de los individuos en la colonia nunca se reproducen, y en cautividad aquellos que lo hacen no muestran diferencia en la esperanza de vida con aquellos que no. Tampoco se ha observado un declive en la fertilidad, por el contrario, en las colonias en cautividad se ha encontrado que tiene más crías con la edad, indicando que existe una fertilidad sostenida con el aumento de edad. Esto es más sorprendente cuando se toman en cuenta las demandas energéticas asociadas con el embarazo, pues las hembras reproductoras se reproducen continuamente, aproximadamente cada 3 meses desde que se convierten en reproductoras hasta que mueren, su masa corporal se duplica al final de la gestación lo que se traduce en un incremento de 1.5 veces en su tasa metabólica (incluso más cuando se encuentran lactando) y un aumento en el estrés oxidativo concomitante. A pesar de que las hembras reproductoras consumen gran parte de su energía en la reproducción, mantienen adecuadamente sus tejidos somáticos por mucho más tiempo que los pequeños mamíferos, por lo que la teoría del envejecimiento del soma desechable no parece coincidir con lo que se observa en el ratopín (Buffenstein R., 2008). De igual forma, los datos disponibles de este organismo no apoyan la teoría del envejecimiento por estrés oxidativo, ya que se ha encontrado que el ratopín produce cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés, *Reactive Oxygen Species*) comparables a las de especies con una vida corta como el ratón, y no muestran cambios significativos en su masa ni metabolismo mitocondrial a lo largo de su vida, e incluso algunos tejidos como las arterias producen una mayor cantidad de ROS comparados con los tejidos de animales de vida corta (Saldmann, F., et al., 2019). Adicionalmente, los niveles de antioxidantes no se encuentran significativamente elevados en los ratopínes comparados con los de especies de vida corta, lo que apoya la idea de que la presencia de defensas antioxidantes incrementadas no son un componente esencial para la longevidad. En cuanto a la teoría del acortamiento de telómeros, el ratopín constituye también un caso interesante. El acortamiento de los telómeros es considerado un biomarcador del envejecimiento y esta teoría del envejecimiento establece que el largo de los telómeros correlaciona con la esperanza de vida máxima de una especie. De igual forma, la actividad de la telomerasa, enzima responsable de replicar los telómeros también debería jugar un papel importante en la longevidad. Sin embargo, los estudios en el ratopín no revelan una correlación entre el largo de los telómeros y la actividad de la telomerasa con la esperanza de vida máxima

(Buffenstein, R., 2005). En realidad, los telómeros relativamente cortos del ratopín son similares en tamaño a los de los adultos jóvenes humanos, y la actividad de su telomerasa, a pesar de que es débilmente detectada en fibroblastos, generalmente está limitada a células de tejidos en constante división, como testículos, pulmón y piel, y con muy bajos niveles de actividad (Seluanov, A., et al., 2007).

1.6.2 El ratopín no acumula células senescentes con la edad.

A pesar de que el ratopín puede experimentar senescencia fisiológica en el desarrollo, las células son menos sensibles a la senescencia inducida por oncogenes y por daño al DNA, en comparación con las células de ratón (Zhao, Y., et al., 2018), y además no parecen acumularse células senescentes en los tejidos de ratopines de edad avanzada, como sí se observa en otros roedores como en el ratón (Kawamura, Y., et al., 2020) y en mamíferos en general como en el humano. Es importante destacar que en este último estudio únicamente se analizaron biopsias de piel de ratopines de edad avanzada, no se ha estudiado la presencia de células senescentes en otros tejidos y órganos. Estas observaciones sugieren que las células del ratopín tienen mecanismos moleculares únicos que evitan que se vuelvan senescentes fuera de contexto fisiológico. Recientemente se descubrió que el locus *Ink4-Arf*, un regulador crítico de la senescencia celular, en el ratopín genera un mRNA adicional por *splicing* alternativo, que consiste en el exón 1 de p15^{INK4b} y los exones 2 y 3 de p16^{INK4a} denominado pALT^{INK4a/b} (Figura 10). Esta isoforma no se encuentra en células humanas ni de ratón, y se ha sugerido que puede contribuir a la resistencia al cáncer y a la longevidad que posee el ratopín (Tian, X., et al., 2015).

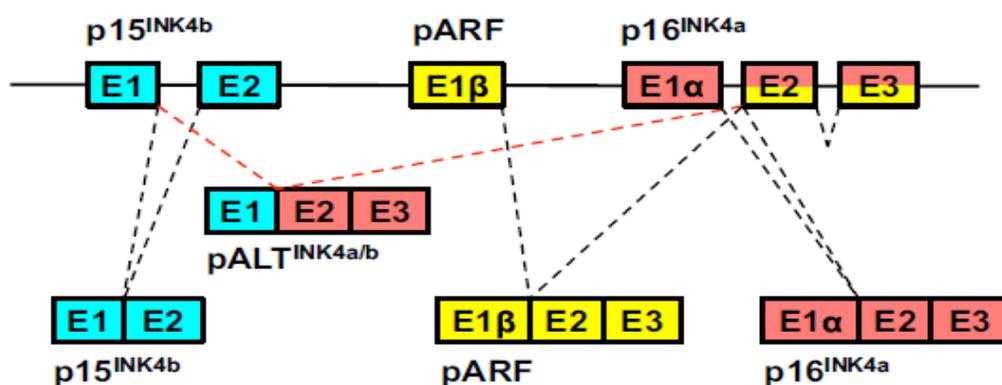


Figura 10. Estructura del locus *INK4a/b* del ratopín. Se muestran los mRNA generados por splicing alternativo. Tomada de Tian, X., et al., 2015.

2. Antecedentes

En nuestro grupo de investigación se planteó la hipótesis de que la expresión de la variante de mRNA $pALT^{Ink4a/b}$ de ratopín previene el establecimiento de la senescencia celular en respuesta a agentes estresantes como el daño al DNA, tal vez favoreciendo que se detenga el ciclo celular para permitir la reparación del DNA o induciendo la muerte celular, originando que casi no se acumulan células senescentes en el adulto. Esto se sustenta por diversos estudios en los que se ha encontrado que las células de ratopín son resistentes a la transformación tumoral. Cuando son tratadas con agentes que dañan al DNA, ya que tienden a detener el ciclo celular y a reparar el DNA o a morir, antes que transformarse (Kawamura, Y., et al., 2020). Además, se ha encontrado que, en comparación con los fibroblastos de piel de ratón, los fibroblastos de piel de ratopín expuestos a daño al DNA mediante radiación o agentes intercalantes del DNA, parecen ser resistentes a la senescencia pues es necesario exponerlas a dosis mayores de daño para observar los mismos niveles de senescencia celular (ver figura 11) (Zhao, Y., et al., 2018).

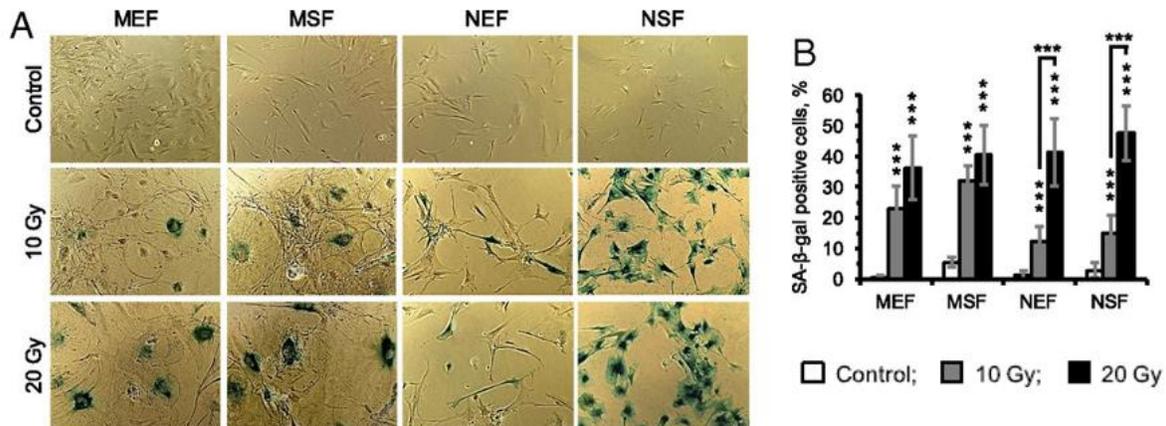


Figura 11. Los fibroblastos de ratopín son resistentes al establecimiento de senescencia celular inducida por daño al DNA. A) Fotos representativas de tinción SA-βgal de fibroblastos de ratón y de ratopín. B) Cuantificación de células con actividad SA-βgal. Nótese que menos células de ratopín (10-15%) tratadas con 10Gy se vuelven senescentes en comparación con las células de ratón (25-30%), y que hay menos células por campo. MEF: Fibroblastos embrionarios de ratón, MSF: Fibroblastos de piel de ratón, NEF: Fibroblastos embrionarios de ratopín, NSF: Fibroblastos de piel de ratopín, Gy: Gray, unidades de radiación ionizante. Datos tomados de Zhao, Y., et al., 2018.

Para estudiar la función de $pALT^{Ink4a/b}$, en un trabajo previo del laboratorio se clonó el cDNA de $pALT^{INK4a/b}$ en un vector de expresión para células de mamífero, y dado que no hay anticuerpos disponibles para detectar a $pALT^{INK4a/b}$, se le agregó la secuencia FLAG para

poder distinguirlo del p16^{INK4a} endógeno, y se verificó su secuencia (tesis de Maestría de Del Ángel, M., 2019).

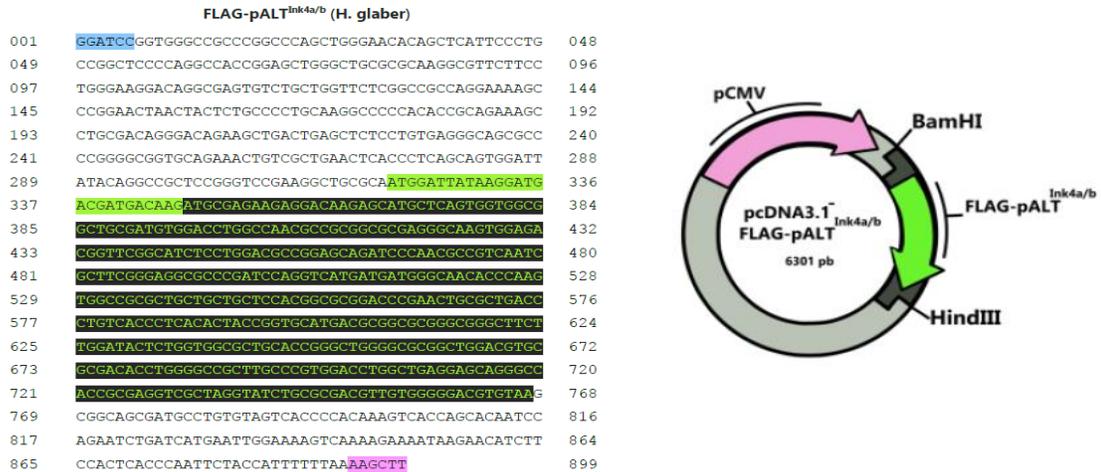


Figura 12. A) Secuencia de FLAG-pALT^{INK4a/b}. La secuencia se encuentra flanqueada por sitios de restricción para las enzimas BamHI (azul) y HindIII (rosa). En verde se muestra la secuencia que codifica para el epítipo FLAG, y el ORF de pALT^{INK4a/b} se muestra en fondo negro. B) Mapa del vector de expresión pcDNA3.1⁺ indicando los sitios de clonación de FLAG-pALT^{INK4a/b}. Tomada de la tesis de Maestría de Del Ángel, M., 2019.

Los resultados reportados en esa tesis nos llevaron a investigar si en las células de ratopín la función de pALT^{INK4a/b} es incrementar el umbral de daño al DNA para el establecimiento de la senescencia, entonces al expresar de forma heteróloga a pALT^{INK4a/b} en las células de ratón, podría adquirirse una resistencia a la senescencia inducida por daño al DNA.

3. Hipótesis

La expresión heteróloga de pALT^{INK4a/b} promueve la resistencia al establecimiento de senescencia inducida por daño al DNA en fibroblastos de piel de ratón.

4. Objetivo General

Determinar si los fibroblastos de ratopín son resistentes al establecimiento de senescencia inducida por daño al DNA con etopósido en comparación con fibroblastos de ratón, y si la

expresión heteróloga de pALT^{INK4a/b} en los fibroblastos de ratón les confiere dicha resistencia.

4.1 Objetivos particulares

1. Evaluar si los fibroblastos de piel de ratopín neonato son resistentes al establecimiento de la senescencia celular inducida por el daño al DNA en comparación con los fibroblastos de piel de ratón.

Metas específicas:

- Determinar si la dosis subletal de etopósido que induce senescencia en los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) es la misma en los fibroblastos de piel de ratón neonato (MSF). Esto porque el protocolo está montado para fibroblastos embrionarios de ratón, pero dado que se estudiarán fibroblastos de piel de neonato de ratopín (NSF), no embrionarios, decidimos comparar con fibroblastos de neonato de ratón.
 - Analizar si la misma dosis de etopósido subletal que induce senescencia en los fibroblastos de piel de ratón neonato, es o no suficiente para inducir senescencia en los fibroblastos de piel de ratopín neonato.
2. Estudiar si la expresión heteróloga de FLAG-pALT^{INK4a/b} en los fibroblastos de piel de ratón neonato reduce la inducción de senescencia por daño al DNA.

Metas específicas:

- Expresar heterológamente FLAG-pALT^{INK4a/b} en fibroblastos de ratón.
- Determinar si al exponer a los fibroblastos de ratón que expresan FLAG-pALT^{INK4a/b} a la dosis de etopósido subletal que normalmente induce senescencia, se reduce el establecimiento de senescencia.

5. Estrategia Experimental

Obtener cultivos primarios de fibroblastos de piel de ratón y de ratopín neonatos. Para el objetivo uno, una vez establecidas las condiciones de inducción de senescencia por daño al DNA en fibroblastos de ratón, se trataron a las células de ratopín de la misma manera para evaluar el porcentaje de células que se volvieron senescentes. Por otra parte, para el objetivo dos del proyecto se electroporaron fibroblastos de piel de neonato de ratón con el plásmido que codifica para FLAG-pALT^{INK4a/b} o con el vector vacío y posteriormente se sometieron a daño al DNA con la misma dosis de etopósido y tiempo establecidos en el objetivo uno. La senescencia celular se determinó mediante el análisis de: el paro de la proliferación, el incremento en la actividad de SA-βGal, la detección de lámina B, y el análisis de la morfología nuclear detectando a lámina A/C.

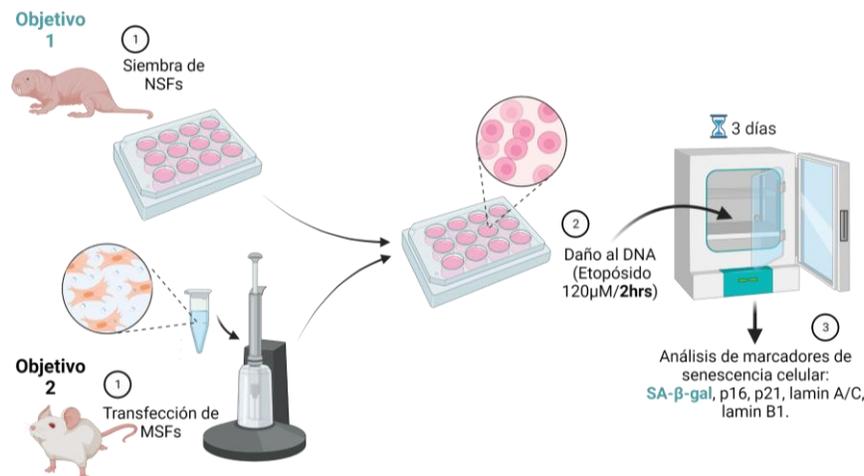


Figura 13. Metodología del proyecto separada por objetivos. El proyecto consta de dos objetivos principales, el primero se realizará en fibroblastos de ratopín y el segundo en fibroblastos de ratón electroporados con pcDNA3.1-FLAG-pALT, el modelo de inducción de daño y el análisis de características senescentes será el mismo para ambos objetivos.

Created with BioRender.com

6. Materiales y Métodos

6.1 Purificación del plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT

Se transformaron bacterias quimiocompetentes con 10 ng del plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT o pcDNA3.1. Posteriormente las bacterias transformadas se sembraron en medio Agar LB suplementado con ampicilina, y se incubaron por 16 h a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se inocularon 250 ml de Medio LB líquido suplementado con Ampicilina con una colonia de bacterias transformadas. Se cultivó a 37°C por 14 a 16 h en agitación vigorosa. Para purificar el plásmido se utilizó el kit "Plasmid Plus Maxi Kit" (No. Cat. 12965, Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido purificado se resuspendió en agua Milli-Q estéril a una concentración de 1µg/µl. El protocolo completo se encuentra en Anexo 1.

6.2 Análisis de restricción

Para verificar la identidad del plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT se hizo un análisis de restricción con las enzimas HindIII, BamHI y SmaI. Para las reacciones de digestión se incubaron 200 ng de plásmido con las enzimas de restricción y el buffer de restricción apropiado, de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un volumen final de 20 µl. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con 0.01% de Sybr Green en Buffer TAE con las muestras digeridas del DNA.

El protocolo completo se encuentra en Anexo 1.

6.3 Transfección de células HEK293 con Polietilimina (PEI)

Se sembraron 3.5×10^5 células por pozo en una caja de 6 pozos en medio suplementado sin antibióticos, al día siguiente de transfectaron células HEK293T con PEI-DNA utilizando una relación 4:1 (4µg PEI por µg de DNA). Se transfectaron 2 pozos con plásmido pQBI-50 (GFP) para comprobar la eficiencia de transfección, 2 pozos con el plásmido pcDNA3.1-, y 2 pozos con el plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT. Se comprobó la eficiencia de transfección

mediante la expresión de GFP al tomar fotografías en el microscopio de fluorescencia Nikon ECLIPSE Ti-U y calcular la eficiencia de transfección ((Células GFP+/Células totales) x 100). El protocolo completo se encuentra en Anexo 1.

6.4 Obtención de extracto de proteínas total de células

Se utilizó Buffer de Lisis RIPA para lisar a las células y se sonicó en frío con 20 pulsos, se centrifugó a 4°C a 3.9 rfcpor 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificaron las proteínas totales utilizando el DC™ Protein Assay Kit II (Biorad, No. Catálogo 5000112). El protocolo completo se encuentra en Anexo 1.

6.5 Western Blot

Se preparó un gel de poliacrilamida al 15%, las muestras se corrieron a 150 V por 2 h. Se transfirió por aproximadamente 1 h a 400 miliamperes a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore # IPVH00010) pre-activada en metanol al 100%. La membrana se bloqueó con leche descremada Bio-RAD No. Cat. 1706404 al 3% en TBST durante 30 min en agitación. Se incubó con anticuerpo primario (1:1000) diluido en 2 ml de TBST durante toda la noche en agitación a 4°C. Posteriormente se incubó 1 h en agitación a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (1:5000 en TBST), protegido de la luz. Se reveló en foto documentador Odyssey CLX® a una λ de 700 u 800 nm. El protocolo completo se encuentra en Anexo 1.

6.6 Aislamiento de fibroblastos de piel de ratón neonato (MSFs).

Los ratones CD1 neonatos se obtuvieron del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los ratones fueron mantenidos en cuartos a 22°C con ciclos de luz oscuridad de 12h y con disponibilidad *ad libitum* de alimento y agua. El cuidado y experimentación fue hecho respetando la legislación para el manejo de animales de laboratorio. Los protocolos

fueron aprobados por el Comité Interno del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en el protocolo CICUAL IFC-SCO174-21.

Se sacrificó al ratón neonato por decapitación. Posteriormente se cortó la colita, se lavó la colita en PBS con antibiótico y antimicótico, y utilizando el kit de disección se cortó la colita en pedazos pequeños. Estos trozos de tejido se incubaron 30 min a 37°C en 500 µl de tripsina, se inactivó la tripsina con 3.5 ml de medio de cultivo y se sembraron en una caja de 6 cm con gelatina al 0.1%. El tejido se incubó a 37°C con 5% CO₂, 21% de O₂ y una humedad relativa de 98%. El protocolo completo se encuentra en Anexo 1.

6.7 Cultivo de fibroblastos de ratón (MEFs y MSFs)

Para realizar los experimentos se utilizaron fibroblastos embrionarios (MEFs) o neonatos (MSFs) de ratón según fuera el caso, almacenados a -195°C en Nitrógeno líquido que fueron descongelados en baño maría a 37°C por 2 min. Una vez resuspendidos en medio de cultivo nuevo, 2x10⁶ fibroblastos se sembraron en una caja de 10 cm de diámetro, de la cual posteriormente se tomaron las células necesarias para realizar los experimentos. Las células se mantuvieron a 37°C con 5% CO₂ y una humedad relativa de 98%.

6.8 Aislamiento y cultivo de fibroblastos de piel de ratopín neonato (NSFs).

Los ratopines neonatos se obtuvieron de colonias reproductoras que se mantienen en un cuarto acondicionado para ellos en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los ratopines fueron mantenidos a 28°C-30°C, con una humedad mayor al 50%, en oscuridad y con disponibilidad *ad libitum* de alimento. El cuidado y experimentación fue hecho respetando la legislación para el manejo de animales de laboratorio. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Interno del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en el protocolo CICUAL IFC-SCO174-21.

Se sacrificó al ratopín neonato por decapitación. Posteriormente se cortó la colita, se lavó la colita en PBS con antibiótico y antimicótico, y utilizando el kit de disección se cortó la colita en pedazos pequeños. Estos trozos de tejido se incubaron 30 min a 33°C en 500 µl de tripsina, se inactivó la tripsina con 3.5 ml de medio de cultivo y se sembraron en una caja de 6 cm con gelatina al 0.1%. El tejido se incubó a 33°C con 5% CO₂, 3% O₂ y una humedad

relativa de 98%. Los fibroblastos de ratopín neonato se expandieron y congelaron cuando se encontraban máximo en el pase 2 a una densidad celular de 1×10^6 células/ml de medio de congelación. El protocolo completo se encuentra en Anexo 1.

6.8.1 Cultivo de fibroblastos de ratopín neonato (NSFs)

Para realizar los experimentos se utilizaron NSFs almacenados a -195°C en Nitrógeno líquido que fueron descongelados en baño maría a 37°C por 2 min. Una vez resuspendidos en medio de cultivo nuevo, aproximadamente 1×10^6 fibroblastos se sembraron en una caja de 10 cm de diámetro, de la cual posteriormente se tomaron las células necesarias para realizar los experimentos. Las células se mantuvieron a 33°C con 5% CO_2 , 3% O_2 y una humedad relativa de 98%.

6.9 Ensayo de actividad β -galactosidasa asociada a senescencia

Para realizar la tinción SA- β gal se sembraron fibroblastos sobre cubreobjetos estériles en cajas de 12 pozos. Los pozos fueron lavados con PBS y posteriormente fijados 5 min a temperatura ambiente con solución de fijación para SA- β gal, se dieron los lavados con PBS y se agregó 1 ml de solución de tinción por pozo. La solución de tinción se incubó toda la noche a 37°C (De 12 a 16 h máx.). Posteriormente se dieron dos lavados con PBS y un lavado con 500 μl de metanol, se dejó secar al aire libre. Los núcleos de las células se tiñieron con 500 μl de DAPI (1 mg/ml) durante 2 min. Las células se observaron en microscopio de fluorescencia Nikon ECLIPSE Ti-U, se tomaron fotos en campo claro (Tinción SA- β gal) y a 460 nm (DAPI). Se calculó el porcentaje de células con actividad SA- β gal por campo, contando el número de células β gal+ y el número total de células por campo (Núcleos teñidos con DAPI). El protocolo completo se encuentra en Anexo 1.

6.10 Inmunofluorescencia

Para realizar la inmunofluorescencia se sembraron fibroblastos sobre cubreobjetos estériles en cajas de 12 pozos. Los pozos fueron lavados con PBS y posteriormente fijados con PFA 4% durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente las células se permeabilizaron con PBS/Tritón 0.5% por 5 min a temperatura ambiente. Las células se bloquearon durante

30 min con PBS/BSA 5% y después fueron incubadas con 130 µl de anticuerpo primario diluido en PBS/BSA 2% a 4° C toda la noche en cámara húmeda. Posteriormente se incubó con 130 µl de anticuerpo secundario Alexa Fluor® diluido en PBS/BSA 2% (1:500) a temperatura ambiente por 1 h protegido de la luz, los núcleos fueron teñidos con DAPI durante 2 min. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con una gota de Fluoromont, y se dejaron secar en la oscuridad por un mínimo de 2 h. Las fotografías de inmunofluorescencias se tomaron utilizando un microscopio confocal LSM 710. El protocolo completo se encuentra en Anexo 1.

6.11 Extracción de RNA de tejidos y células adherentes

Se extrajo RNA de células HEK292T y NSF's y de pulmón de ratopín utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, No. Catálogo 15596026) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido se disolvió en 20 µl de agua libre de RNasas, se incubó la solución 10 min a 55-60°C, y finalmente se almacenó a -20°C.

6.12 Síntesis de cDNA

Se utilizó el Kit de transcripción inversa de cDNA de gran capacidad (Applied Biosystems, No. Cat. 4368814) para realizar la síntesis de cDNA siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.13 PCR

A partir del cDNA sintetizado se llevó a cabo una PCR de 30 ciclos en un termociclador Veriti 96 well de Applied Biosystems. Las secuencias de los primers utilizados para amplificar parte del mRNA de pALT^{INK4a/b} y β-actina se encuentran en el Anexo. La concentración final de los primers en la reacción de PCR fue de 0.66 µM.

6.14 Análisis Estadísticos

Para realizar todas las pruebas estadísticas se utilizó R^[1]. para elaborar las gráficas se utilizó GraphPad Prism versión 8.4.3 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com.

Todos los análisis estadísticos pueden ser consultados en el siguiente enlace:

https://rpubs.com/Lau_Cano/1026437

[1] R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

7. Resultados

1. Purificación y verificación de la identidad del plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT.

En primer lugar, se transformaron bacterias competentes con el plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT (Figura 14A), de las cuales se purificó el plásmido. Posteriormente para verificar la identidad del plásmido se realizó un análisis de restricción, se eligieron las enzimas BamHI, HindIII y SmaI. Como se puede ver en la figura 15B en el carril 1 se cargó el plásmido digerido con la enzima de restricción BamHI, la cual al tener solo un sitio de corte en el plásmido ocasiona la linealización de éste, generando un solo fragmento de un peso molecular de 6301pb; en el segundo carril se cargó el plásmido digerido con la enzima de restricción HindIII, con la cual se genera también un solo fragmento de 6301 pb porque solo corta en un sitio del plásmido; en el carril 3 se cargó el plásmido digerido con la enzima de restricción SmaI que tiene dos sitios de corte y genera dos fragmentos, uno de 4569 pb y otro de 1732 pb; en el carril 4 se cargó el plásmido digerido con las enzimas BamHI y HindIII, con lo que se producen dos fragmentos, uno de 5409 pb y otro de 892 pb; finalmente, en el último carril se cargó el plásmido sin digerir, en este último carril se observan varias bandas, esto se debe a que los plásmidos pueden superenrollarse y de esta forma migrar un poco

más rápido y también pueden concatenarse varios plásmidos y por esta razón hay bandas con un peso molecular mayor al del plásmido individual.

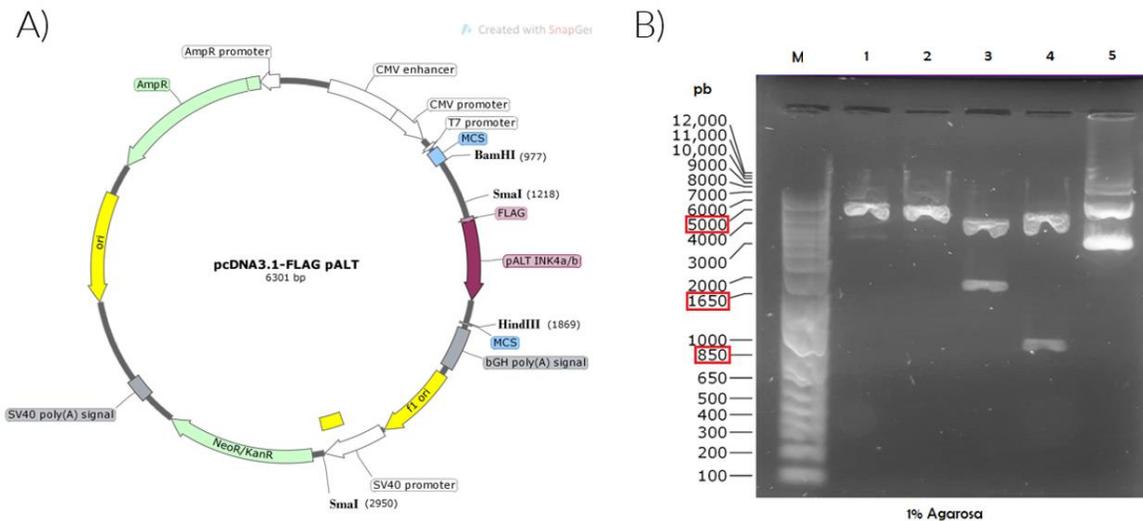


Figura 14. Análisis de restricción de plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT. **A)** Plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT. Se encuentran seleccionados los sitios de corte de enzimas de restricción de interés. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de digestión enzimática de pcDNA3.1-FLAG-pALT. M: marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder, 1: pcDNA3.1-FLAG pALT digerido con la enzima BamHI (genera un fragmento de 6301 pb), 2: pcDNA3.1-FLAG pALT digerido con enzima HindIII (genera un fragmento de 6301 pb), 3: pcDNA3.1-FLAG pALT con la enzima SmaI (genera dos fragmentos, uno de 4569 pb y otro de 1732 pb), 4: pcDNA3.1-FLAG pALT digerido con las enzimas BamHI y HindIII (genera dos fragmentos, uno de 5409 pb y otro de 892 pb), 5: pcDNA3.1-FLAG pALT sin digerir (se observa el plásmido super enrollado).

Una vez verificada la identidad del plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT se verificó la expresión de la proteína FLAG-pALT. Para esto se transfectaron de forma transitoria con PEI células HEK293T (porque son de fácil transfección) con el plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT o con el vector vacío (pcDNA3.1) y se realizó un Western blot utilizando un anticuerpo primario anti-FLAG. Como se puede observar en la figura 15, incluso desde 10 µg de extracto de proteína total es posible observar la expresión de la proteína FLAG-pALT con un peso esperado de 16 kDa. Se detectó a la proteína α -Tubulina como referencia de una proteína constitutiva para mostrar que la cantidad de proteína cargada en cada carril fue la misma entre las réplicas. Se verificó la eficiencia de transfección y la integridad comparable de las muestras al teñir la membrana con rojo de Ponceau (Figura 15 B). Con este experimento se demuestra que la proteína FLAG-pALT se expresa en células transfectadas con el plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT.

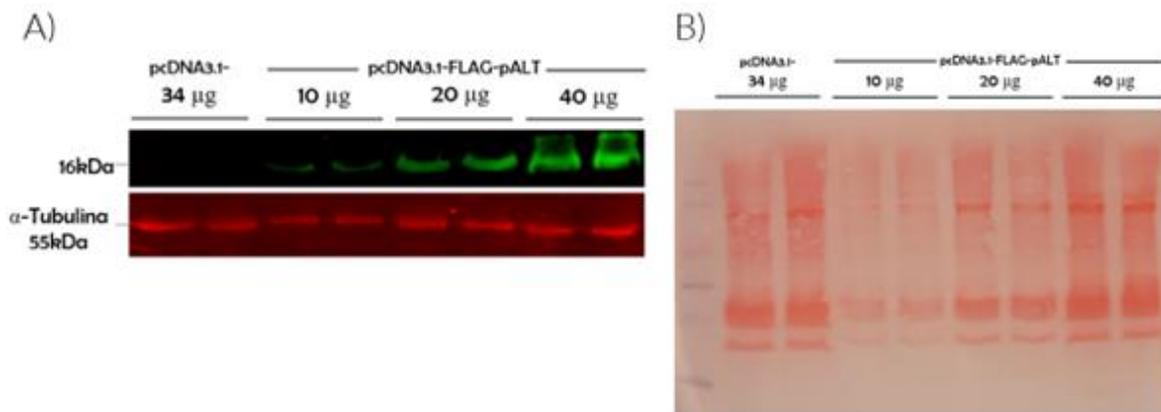


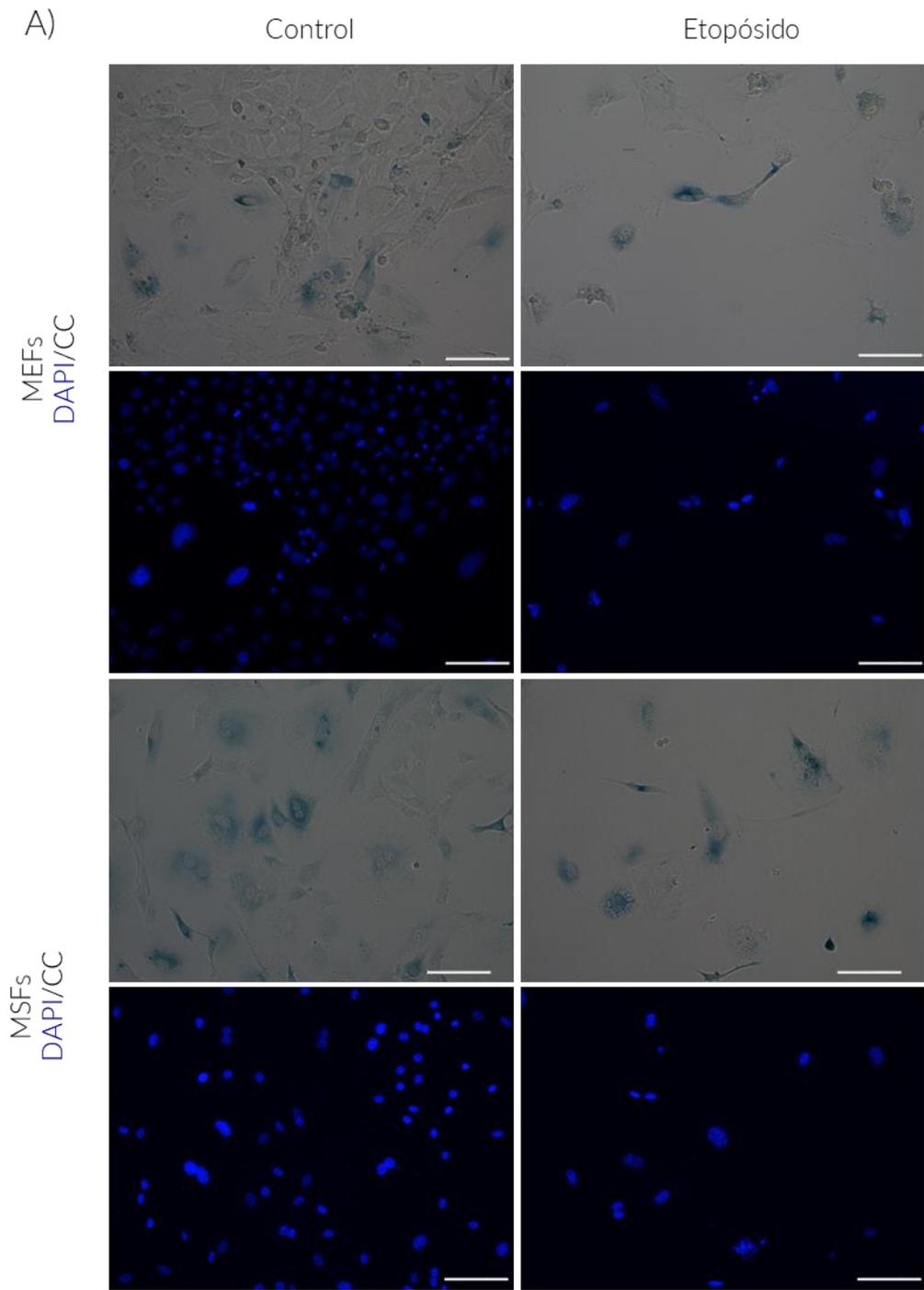
Figura 15. FLAG-pALT se expresa en células HEK293T transfectadas con plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT. A) Western blot de FLAG-pALT y α -Tubulina a partir de extracto proteico de células HEK293T transfectadas con plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT. B) Tinción con Rojo de Ponceau. Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color (BioRad, No. Catálogo 1610374).

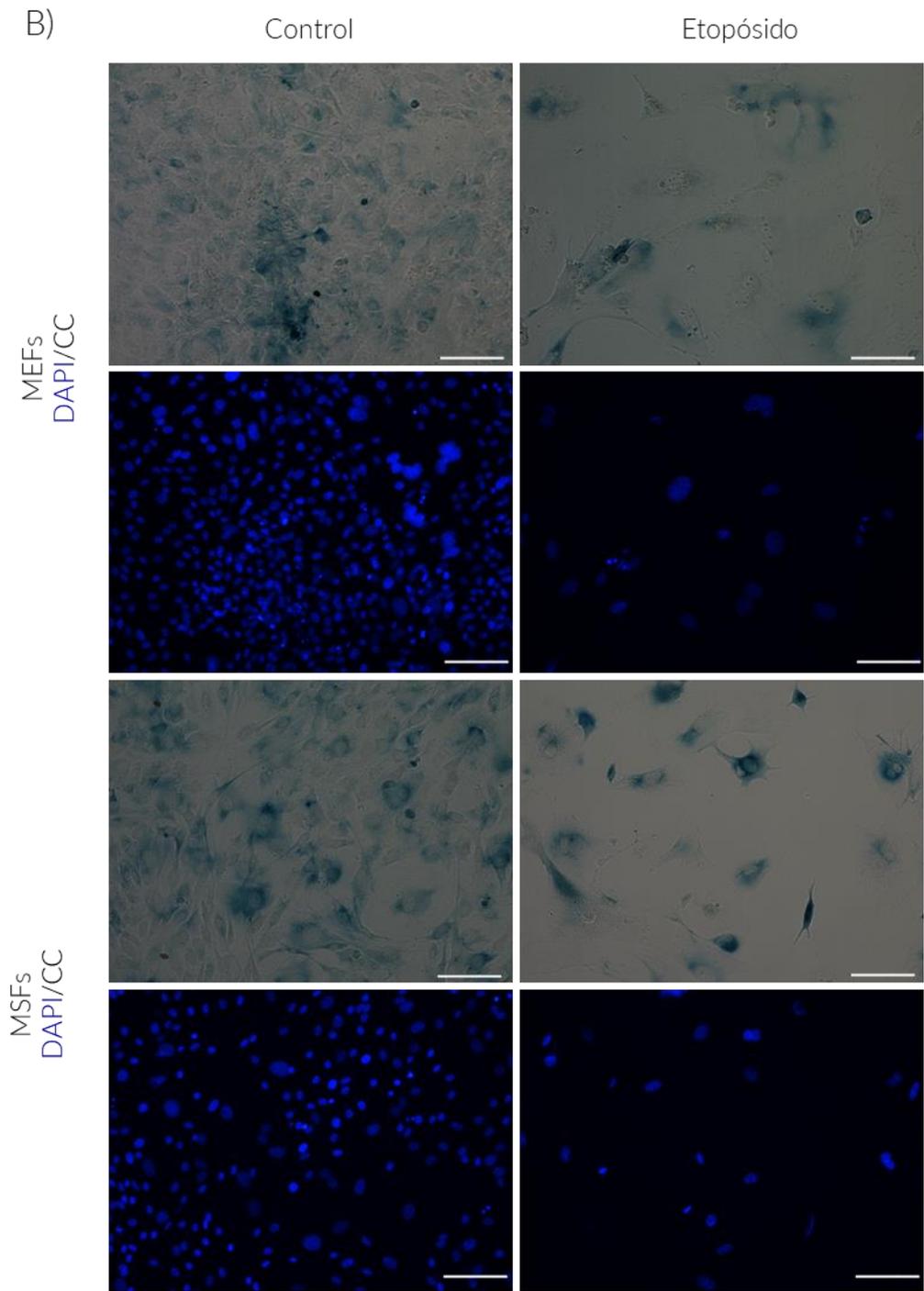
2. Fibroblastos de piel de ratopín son resistentes al establecimiento de senescencia celular inducida por daño al DNA con Etopósido.

En estudios previos se determinó que fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, por sus siglas en inglés) se vuelven senescentes después de 5 días de haber sido tratados por 2 h con 120 μ M de etopósido, un agente que se une covalentemente a la Topoisomerasa, causando rupturas de doble cadena al DNA. Dado que en este trabajo se estudiaron fibroblastos de piel de ratopín neonato (NSF, por sus siglas en inglés), fue necesario verificar que los fibroblastos de piel de ratón neonato (ya no embrionarios) también se vuelven senescentes con el mismo tratamiento de Etopósido.

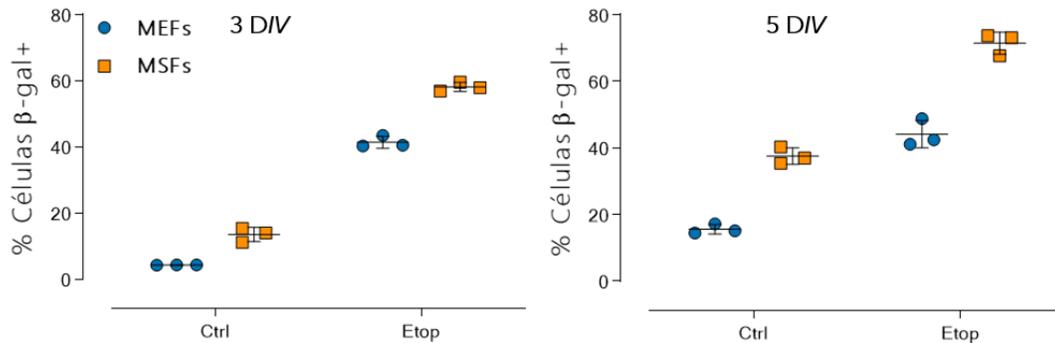
Se estudiaron tanto NSF como MEFs como control positivo y se indujo daño al DNA con un tratamiento con etopósido 120 μ M por 2 h. Se retiró el Etopósido y se dejó a las células recuperarse para analizarlas a los 3 y 5 días posteriores al daño, para comparar el porcentaje de células senescentes, identificadas por tener actividad de β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β gal) (Figura 16). Se obtuvo un porcentaje similar de células con actividad SA- β gal a partir de los 3 días; sin embargo, se puede apreciar que a los 5 días *in vitro* posterior al daño el número de células β gal en el control incrementa significativamente, por lo que a los tres días se aprecia una diferencia mayor entre las

células tratadas con etopósido y las que no fueron tratadas (Figura 16 C). Adicionalmente se evaluó la subletalidad del tratamiento con etopósido mediante la contabilización de los núcleos apoptóticos observados en cada condición. Se encontró que tanto después de 3 como de 5 días *in vitro* (DIV) posterior al daño, las células dañadas con etopósido tienen un porcentaje de núcleos apoptóticos de alrededor del 15 %, indicando que el tratamiento es subletal (Figura 16 D) y es eficiente en inducir el establecimiento de senescencia celular (Figura 16 C). Debido a que 3 días *in vitro* son suficientes para obtener alrededor del 80 por ciento de células β gal positivas en la condición de daño con menos del 20 % de células β gal positivas en el control, se decidió usar estas condiciones para realizar los siguientes experimentos.





C) Actividad SA-βGal



D) Subletalidad de tratamiento

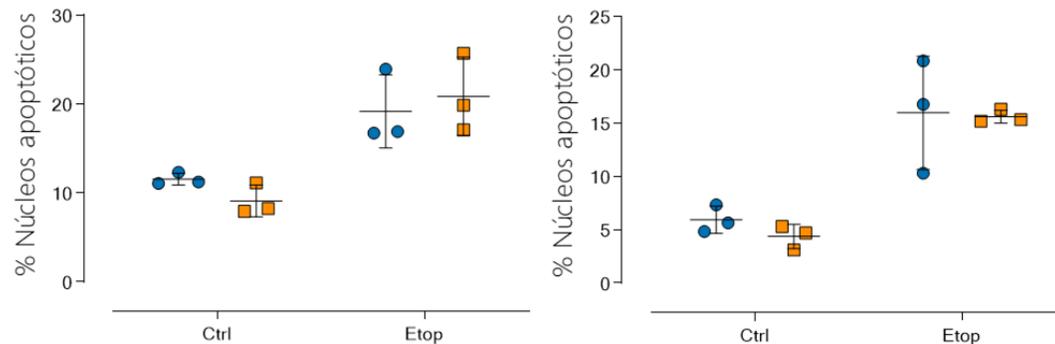
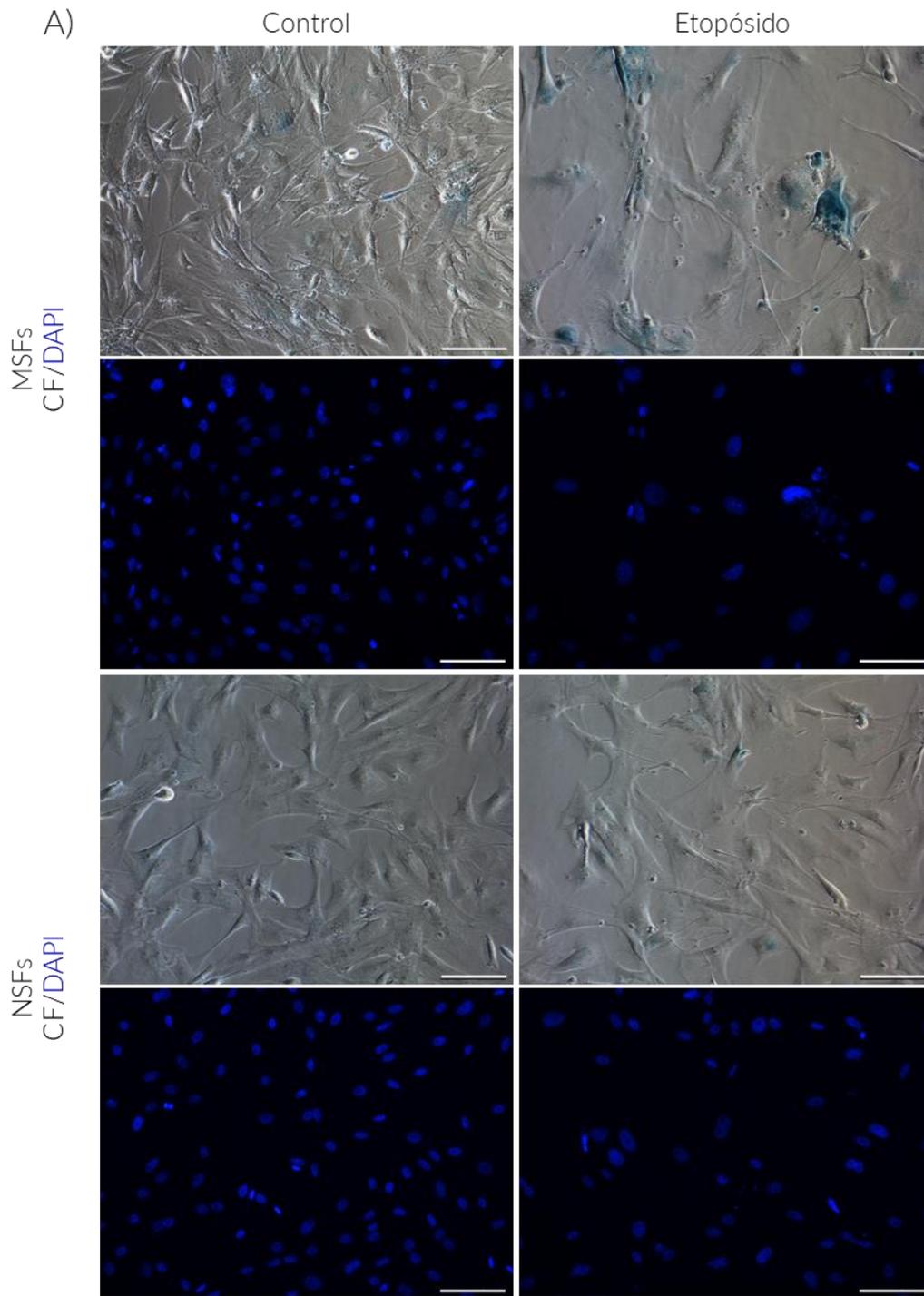


Figura 16. Los fibroblastos de piel de ratón neonato responden de forma similar a los fibroblastos embrionarios de ratón ante el tratamiento con etopósido 120 μ M. Fotos representativas de la tinción para detectar la actividad SA-βgal en MEFs y MSFs con 3 A) y 5 B) DIV post daño. Se muestran células en campo claro y núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala, 100 μ m. C) Cuantificación de células SA-βgal positivas en las condiciones indicadas. D) Subletalidad del tratamiento. Porcentaje de núcleos apoptóticos por condición. Un experimento realizado por triplicado, de cada triplicado se tomaron 15 campos, se contabilizaron más de 150 células por triplicado de cada condición. La barra de error representa la desviación estándar de la media.

Una vez demostrado que los fibroblastos de ratón neonato son igual de susceptibles que los MEFs al tratamiento de etopósido para inducir senescencia celular, entonces se comparó la respuesta con los fibroblastos de ratopín neonato.

Para comprobar que el tratamiento con etopósido previamente probado en MSFs tuviera un efecto significativamente menor en NSF, se indujo daño al DNA con 120 μ M de etopósido por 2 h y se analizó a los 3 DIV posteriores al daño el porcentaje de células con actividad SA-βgal. Se cuantificó el número de núcleos totales por campo y posteriormente con este dato se calculó el número de núcleos por cm^2 , finalmente también se cuantificaron los núcleos apoptóticos por campo y se calculó el porcentaje de núcleos apoptóticos por

condición (Figura 17). Se encontró que mientras que los fibroblastos de piel de ratón exhibieron alrededor del 80 % de células SA- β gal positivas después de inducir daño al DNA, únicamente el 20 % de los fibroblastos de piel de ratopín dañados con etopósido se volvieron SA- β gal positivos, porcentaje significativamente menor que incluso lo observado en la condición control de los fibroblastos de ratón (Figura 17 A, B).



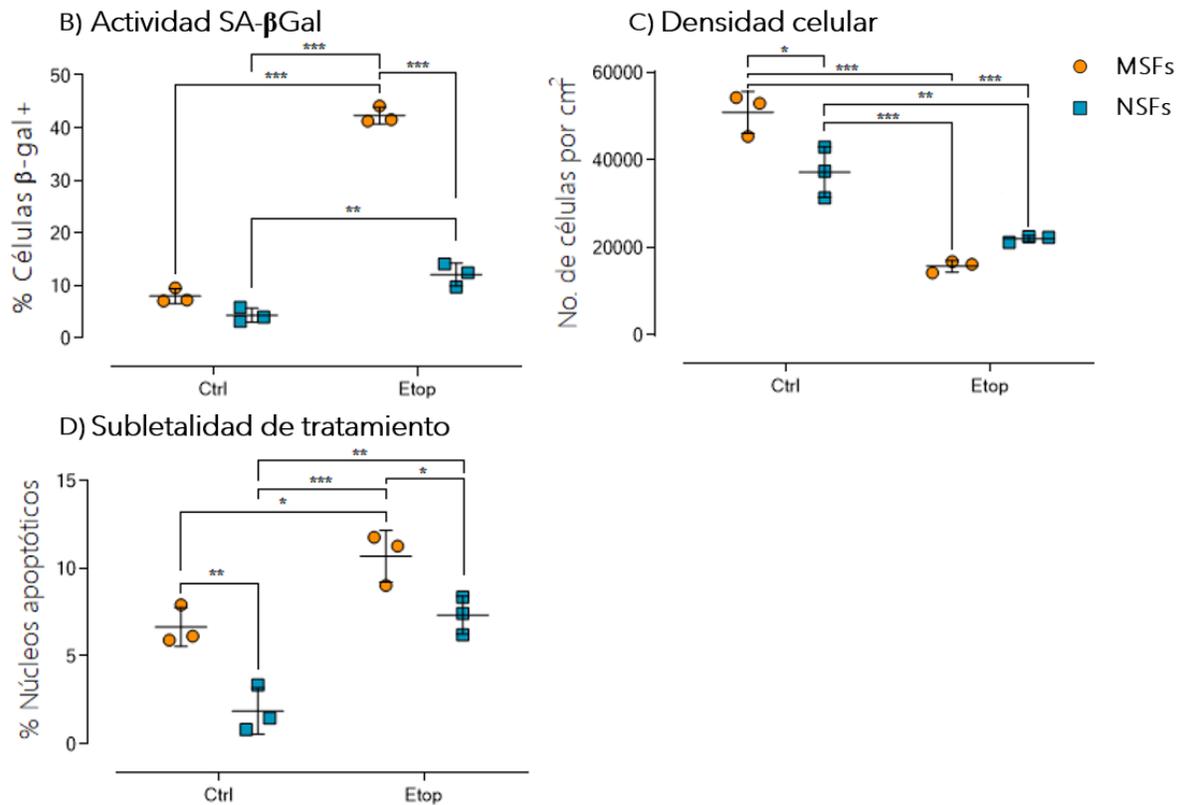


Figura 17. Los fibroblastos de piel de neonato de ratopín son resistentes al establecimiento de senescencia celular inducida por daño al DNA con etopósido 120 μ M detectada por actividad SA- β gal e inhibición de la proliferación. A) Fotos representativas de tinción SA- β gal en MSFs y NSFJs con inducción de daño al DNA con etopósido. Barra de escala, 100 μ m. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. B) Cuantificación de células β gal positivas. C) Gráfica del número promedio de células por cm^2 por condición. D) Porcentaje de núcleos apoptóticos por condición. La barra de error representa la desviación estándar de la media. Se realizó ANOVA de dos vías con prueba post hoc TUKEY. “**” $P < 0.0005$, “***” $P < 0.005$, “**” $P < 0.05$, “ ” $P > 0.05$. Experimento realizado en colaboración con M. en C. Berenice Franco Juárez.**

Estos resultados muestran que los fibroblastos de piel de ratopín son menos susceptibles al establecimiento de senescencia, evaluada por actividad SA- β gal, por lo tanto, el modelo de inducción de senescencia por daño al DNA con etopósido aquí utilizado es eficiente en inducir senescencia en fibroblastos de ratón, pero no así en fibroblastos de ratopín.

3. La expresión heteróloga de FLAG-pALT en MSFs promueve la resistencia al establecimiento de senescencia celular inducida por daño al DNA.

Para comprobar si pALT^{INK4a/b} tiene un efecto sobre el establecimiento de la senescencia celular, se electroporaron MSFs, ya sea con el vector vacío (plásmido pcDNA3.1) o el vector de expresión de pALT^{INK4a/b} (pcDNA3.1-FLAG-pALT) para después inducir daño al DNA con el modelo previamente estandarizado y posteriormente analizar si su expresión evita que los fibroblastos de piel de ratón se vuelvan senescentes. La eficiencia de transfección por electroporación que se obtuvo fue del 20 al 40 %. Se estudiaron varias características de la senescencia celular, incluida la inhibición de la proliferación, alteraciones en la morfología nuclear, actividad SA-βgal y alteraciones en las láminas A/C y lámina B1). Adicionalmente se estimó la viabilidad.

3.1. El tratamiento con etopósido 120 μM es subletal e inhibe la proliferación en MSFs transfectados con pcDNA3.1- o pcDNA3.1-FLAG-pALT.

Una de las características que se analizó después de la electroporación y la inducción de daño al DNA fue la subletalidad del tratamiento, ya que el proceso de transfección podría hacer a las células más sensibles al tratamiento con etopósido, se estudió la letalidad mediante la cuantificación de núcleos apoptóticos. Como puede apreciarse en la Figura 18 B, de forma interesante se observó que las células sometidas a daño al DNA con etopósido y que expresan a FLAG-pALT tienen un porcentaje de células muertas mayor (determinado por identificación de núcleos apoptóticos) comparados con los fibroblastos transfectados con el vector vacío, mientras que los fibroblastos de la condición control exhiben aproximadamente el mismo porcentaje de muerte celular sin importar la expresión de FLAG-pALT (Figura 18 B).

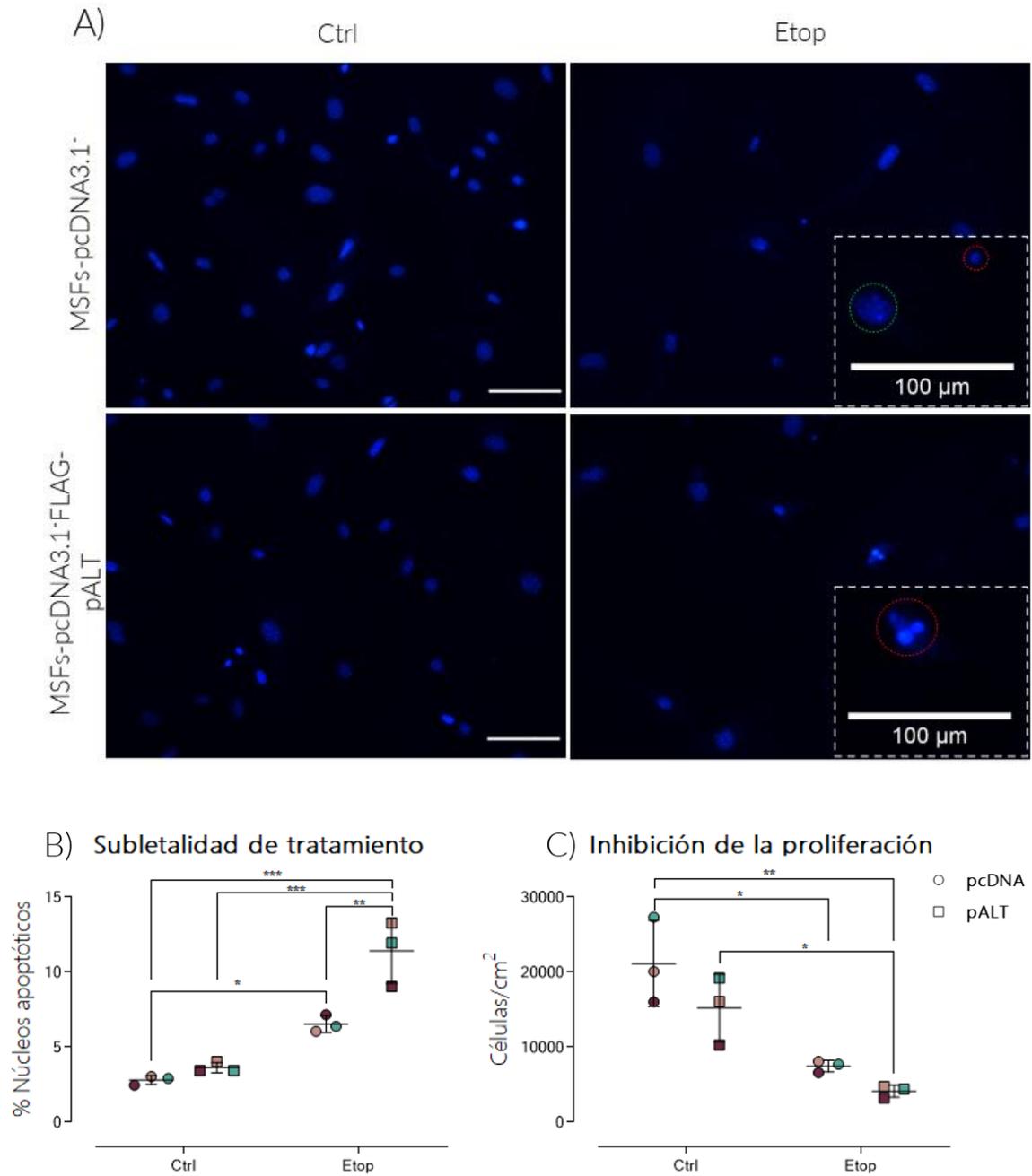


Figura 18. La expresión heteróloga de pALT^{INK4a/b} en fibroblastos de piel de ratón incrementa el porcentaje de núcleos apoptóticos y disminuye la proliferación celular. A) Fotos representativas de núcleos de MSFs electroporados con pcDNA3.1⁻ o pcDNA3.1⁻FLAG-pALT con o sin inducción de daño al DNA con etopósido teñidos con DAPI. Se señala con líneas punteadas rojas núcleos apoptóticos, mientras que en verde se muestra un núcleo sano. Barra de escala 100μm. B) Gráfica de porcentaje de núcleos apoptóticos. C) Gráfica del número de células promedio por cm² por condición. Cada punto representa un experimento independiente, se muestra únicamente el conjunto de los tres experimentos tomando la media de cada experimento independiente para graficar y llevar a cabo los análisis estadísticos. La barra de error representa la desviación estándar de la media.

Cada experimento independiente se realizó por triplicado. Se tomaron 25 campos por cada triplicado de cada experimento y se contabilizaron al menos 150 células por triplicado. Se realizó ANOVA de dos vías con prueba post hoc TUKEY. “****” $P < 0.0005$, “***” $P < 0.005$, “**” $P < 0.05$, “ ” $P > 0.05$.

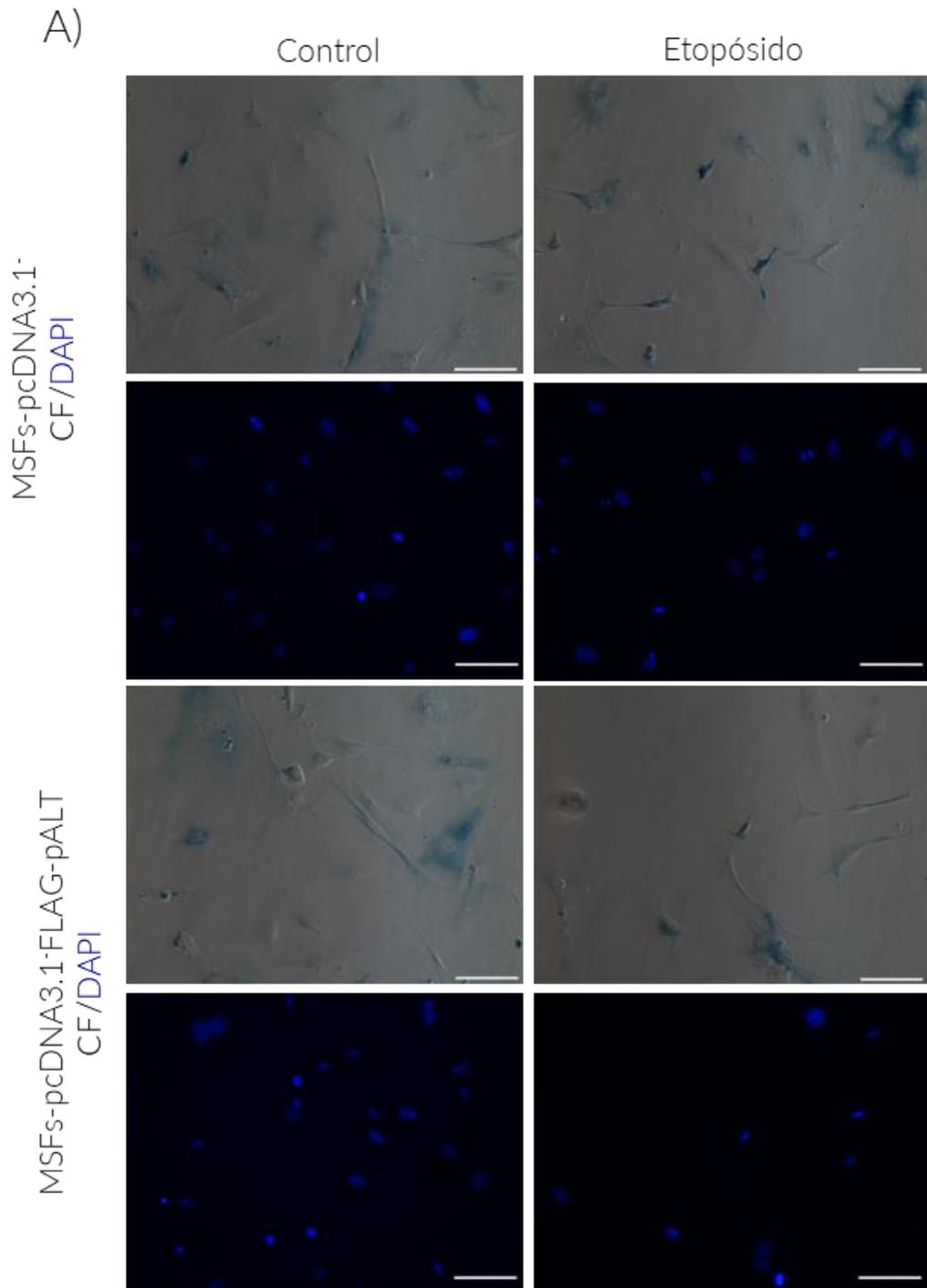
3.2. *La expresión de FLAG-pALT^{INK4a/b} disminuye la proliferación de MSFs*

Como medida de la proliferación celular se contabilizaron las células en cada uno de los campos tomados y posteriormente se calculó con este dato el número promedio de células por cm^2 que se muestra en la gráfica del panel C de la figura 18. Se observó que los fibroblastos que expresan a FLAG-pALT^{INK4a/b} muestran una menor proliferación celular en ambas condiciones (control y daño) comparados con los fibroblastos transfectados con el vector vacío. Esto no es de extrañarse pues se sabe que pALT^{INK4a/b} inhibe el ciclo celular (Tian, X., et al., 2015) por lo tanto, la disminución en la proliferación observada podría deberse a esto. Adicionalmente se encontró que la inducción de daño al DNA con etopósido disminuyó también la proliferación celular en los fibroblastos sin importar si expresan o no a FLAG-pALT. Este resultado era esperado, ya que al inducir daño al DNA con etopósido se vuelven senescentes los fibroblastos de ratón, y hay que recordar que una característica de la senescencia celular es un arresto del ciclo celular, que puede traducirse en una menor densidad celular.

3.3. *La expresión de FLAG-pALT en MSFs redujo el porcentaje de células con actividad SA-βgal.*

Como parte del análisis de características de la senescencia celular se cuantificó el porcentaje de células con actividad SA-βgal, uno de los marcadores más utilizados al estudiar senescencia celular. En la Figura 20 se puede observar que los fibroblastos sometidos a daño al DNA mostraron un incremento en el número células con SA-βgal comparado con células sin tratamiento; sin embargo, los que expresaron a FLAG-pALT^{INK4a/b} mostraron un menor número de células con actividad SA-βgal que los transfectados con el vector vacío. A pesar de no encontrarse una diferencia estadísticamente significativa si se observa una tendencia a la baja en cada uno de los tres experimentos independientes, pero de forma interesante no se encontró una diferencia significativa estadísticamente entre los fibroblastos que expresan FLAG-pALT

INK4a/b dañados con etopósido y los fibroblastos control electroporados con el vector vacío (Figura 19 B).



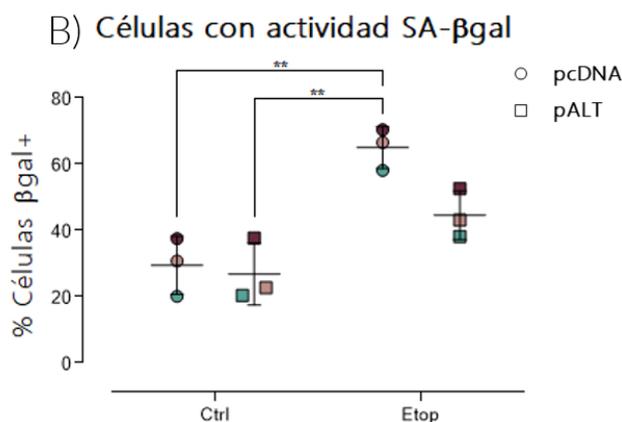


Figura 19. La expresión de FLAG-pALT^{INK4a/b} en fibroblastos de piel de ratón disminuye la actividad SA-βgal al ser sometidos a daño al DNA. A) Fotos representativas de MSFs electroporados con pcDNA3.1- o pcDNA3.1-FLAG-pALT con y sin inducción de daño al DNA con etopósido con tinción para detectar SA-βgal y núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala 100µm. B) En la gráfica se presenta el porcentaje de células βgal positivas. Cada punto representa un experimento independiente, se muestra únicamente el conjunto de los tres experimentos tomando la media de cada experimento independiente para graficar y llevar a cabo los análisis estadísticos. La barra de error representa la desviación estándar de la media. Cada experimento independiente se realizó por triplicado. Se tomaron 25 campos por cada triplicado de cada experimento y se contabilizaron al menos 150 células por triplicado. Se realizó ANOVA de dos vías con prueba post hoc TUKEY. “****” P < 0.0005, “***” P<0.005, “**” P < 0.05, “ ” P>0.05.

3.4. Las alteraciones en la morfología nuclear de MSFs con daño al DNA son menores cuando expresan FLAG-pALT^{INK4a/b}.

Una característica de las células senescentes es la presencia de alteraciones en la morfología nuclear, generadas en parte por una pérdida de la lámina B1 y una estabilización de las láminas A/C. Para determinar si los fibroblastos de piel de ratón que fueron electroporados con pcDNA3.1-FLAG-pALT mostraron una morfología nuclear sana, se analizó la morfología nuclear y se cuantificaron las alteraciones encontradas. En primer lugar, se observó que la inducción de daño en fibroblastos de ratón incrementa el porcentaje de células con núcleos con deformidades comparado con el control. Además de obtener una menor cantidad de células con actividad SA-βgal, se encontró un porcentaje menor de células con núcleos con alteraciones morfológicas en los fibroblastos de ratón sometidos a daño que expresaron FLAG-pALT^{INK4a/b} (Figura 20). Es importante destacar que hubo una gran variación en uno de

los experimentos independientes; sin embargo, en los tres experimentos se observa una tendencia a la disminución del porcentaje de alteraciones en la morfología nuclear en los fibroblastos tratados con etopósido y que expresan FLAG-pALT^{INK4a/b}.

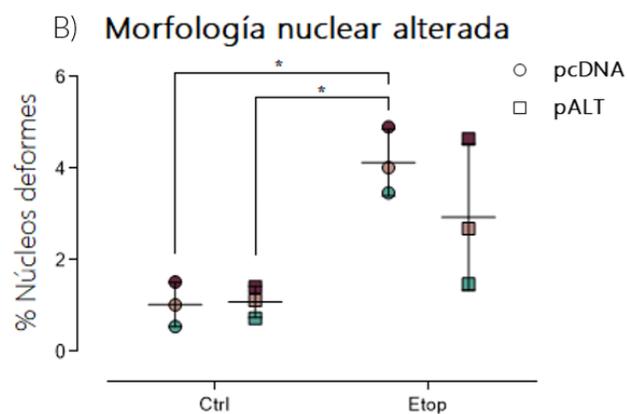
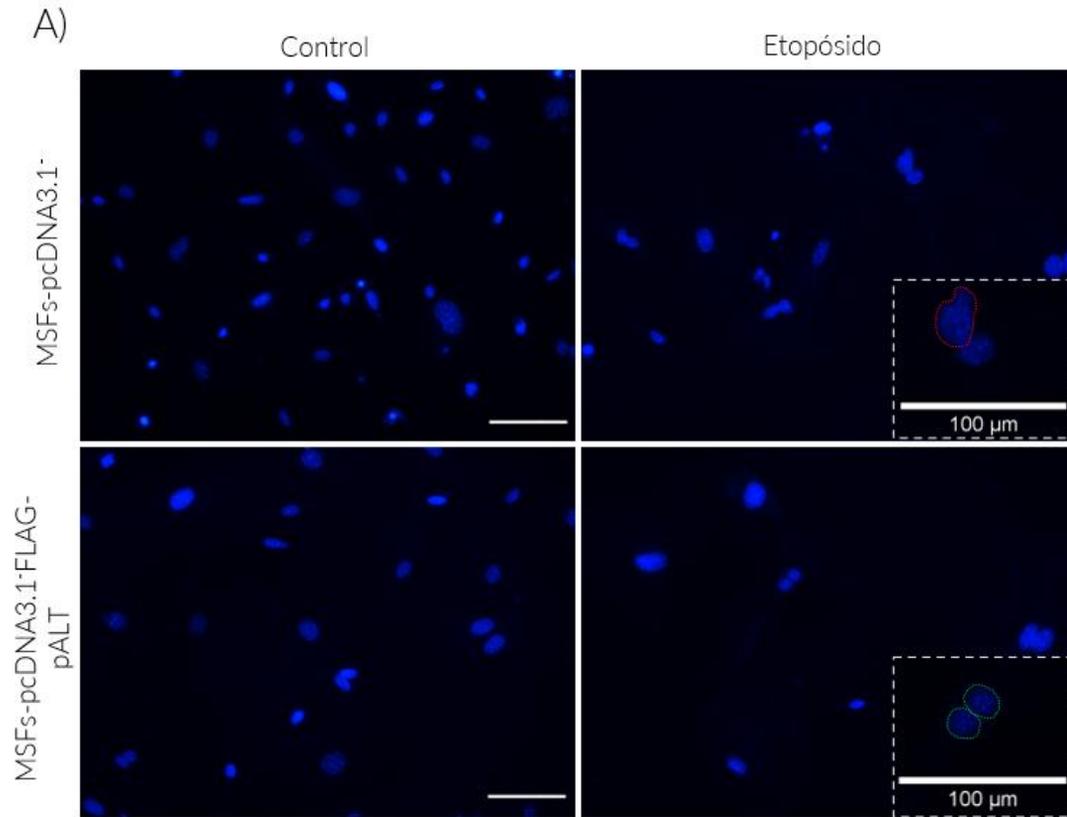
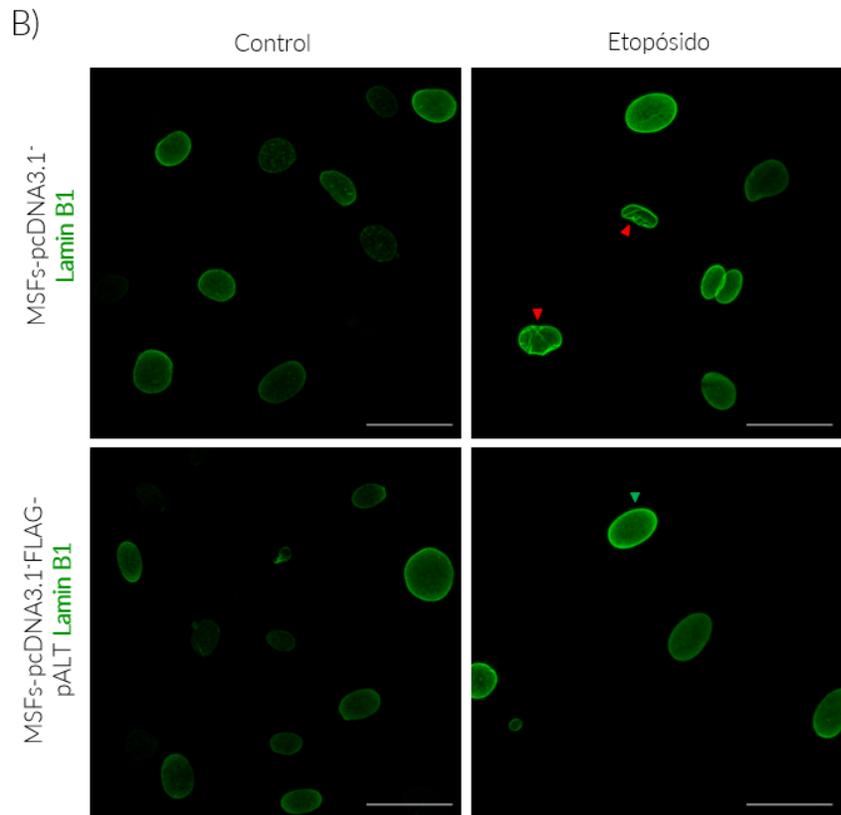
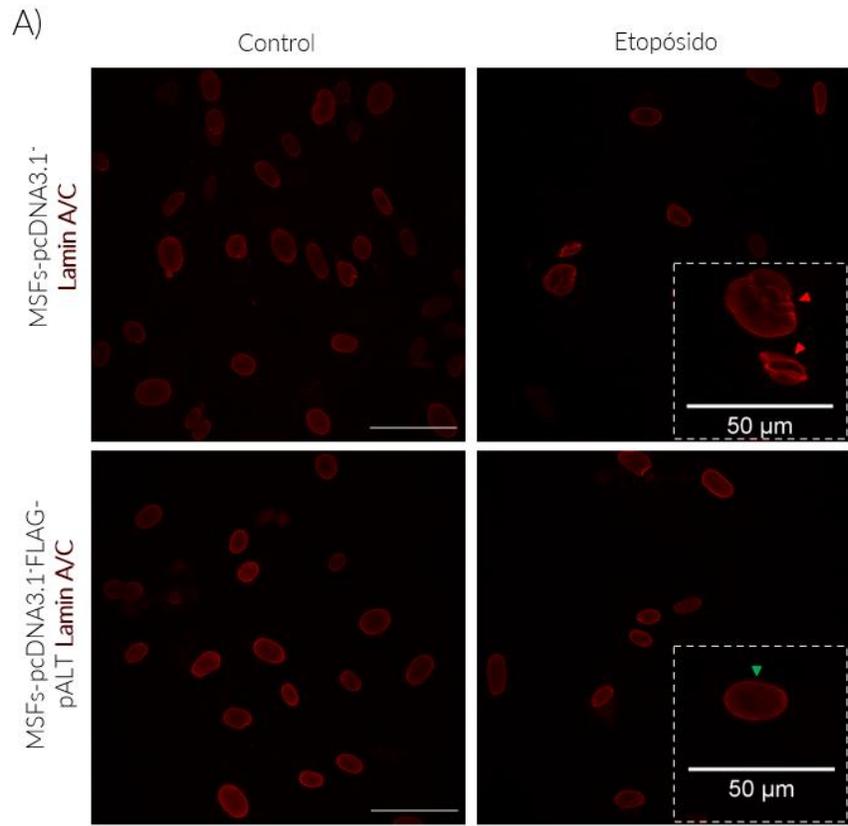


Figura 20. La expresión de FLAG-pALT^{INK4a/b} en MSFs dañados con etopósido muestran una **disminución en alteraciones de la morfología nuclear.** A) Fotos representativas de núcleos de MSFs electroporados con pcDNA3.1 o pcDNA3.1-FLAG-pALT con y sin inducción de daño al DNA con etopósido cuyos núcleos fueron teñidos con DAPI. Se contornea en rojo un núcleo con morfología alterada y en verde dos núcleos con morfología normal. Barra de escala 100μm. B) Gráfica de porcentaje de núcleos deformes

por condición. Cada punto representa un experimento independiente, se muestra únicamente el conjunto de los tres experimentos tomando la media de cada experimento independiente para graficar y llevar a cabo los análisis estadísticos. La barra de error representa la desviación estándar de la media. Cada experimento independiente se realizó por triplicado. Se tomaron 25 campos por cada triplicado de cada experimento y se contabilizaron al menos 150 células por triplicado. Se realizó ANOVA de dos vías con prueba post hoc TUKEY. “***” $P < 0.0005$, “**” $P < 0.005$, “*” $P < 0.05$, ” “ $P > 0.05$.

Como parte del análisis de la morfología nuclear se realizó inmunofluorescencia contra las láminas A/C y debido a que una de las características de las células senescentes en el envejecimiento es una disminución de la lámina B1, también se hizo una inmunofluorescencia para detectar a la lámina B1 y determinar el cambio en la expresión de ésta en los distintos tratamientos. De forma interesante se encontró que la expresión de FLAG-pALT^{INK4a/b} en los fibroblastos sometidos a daño al DNA disminuyó las alteraciones en la envoltura nuclear, si bien no cambió la intensidad de la fluorescencia de las láminas A/C (Figura 21 D). Adicionalmente se encontró que la expresión de FLAG-pALT^{INK4a/b} no generó un cambio significativo en la intensidad de fluorescencia de la lámina B1 como resultado del tratamiento con etopósido, aunque hubo variación en los resultados. En dos de los tres experimentos independientes realizados se observó que la intensidad de fluorescencia de los fibroblastos que fueron transfectados con el vector vacío y tratados con etopósido mostraron un nivel de intensidad de fluorescencia muy similar con aquellos que fueron transfectados con el plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT, así como con los demás grupos experimentales analizados, mientras que en el tercero los fibroblastos que fueron transfectados con el vector vacío y tratados con etopósido mostraron una intensidad de fluorescencia muy elevada comparados con los fibroblastos de los otros grupos, esto pudo deberse a una variación experimental no detectada al momento de realizar el experimento. Con el fin de consolidar el efecto que la expresión de FLAG-pALT tiene sobre la intensidad de fluorescencia de lámina B1, es necesario realizar experimentos adicionales.



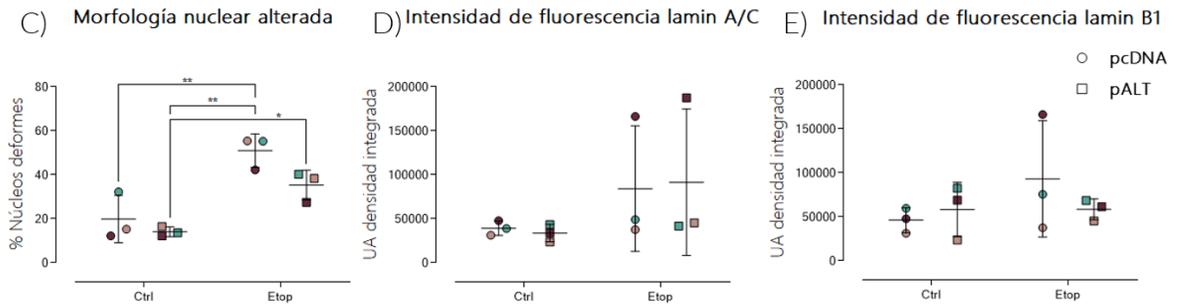


Figura 21. Los fibroblastos de piel de ratón tratados con etopósido que expresan FLAG-pALT^{INK4a/b} tienen menos alteraciones en la envoltura nuclear. A) y B) Inmunofluorescencia contra lámina A/C y lámina B1 respectivamente de MSFs electroporados con pcDNA3.1⁺ o pcDNA3.1⁺FLAG-pALT con y sin inducción de daño al DNA con etopósido. Reconstrucción SD de Z-Stack. Se señala con punta de flecha roja dos núcleos con invaginaciones en la envoltura nuclear, mientras que con punta de flecha verde se muestra el patrón de expresión de lamin A/C en un núcleo sano. Barra de escala: 50µm. C) Gráfica de porcentaje de deformidades en lamin A/C. Se realizó ANOVA de dos vías con prueba post hoc TUKEY. D) y E) Gráfica de intensidad de fluorescencia por núcleo de inmunofluorescencia contra lámina A/C y lámina B1 respectivamente. Se realizó prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis para D y ANOVA de dos vías para E. Se realizaron tres experimentos independientes, se muestra únicamente el conjunto de los tres experimentos tomando la media de cada experimento independiente para graficar y llevar a cabo los análisis estadísticos. Cada experimento independiente se realizó por triplicado. De cada triplicado se analizaron 150 células, se calculó la intensidad de fluorescencia, así como las anomalías nucleares. “***” P < 0.0005, “**” P < 0.005, “*” P < 0.05, “ ” P > 0.05.

Debido a que la eficiencia de transfección de los fibroblastos primarios es relativamente baja (20-40%) es posible que el efecto de la expresión de FLAG-pALT^{INK4a/b} en los fibroblastos sometidos a daño al DNA se enmascare en los experimentos descritos anteriormente, ya que se analizó la población celular total, sin distinguir a las células transfectadas de las que no. Tal vez por esta razón no se observaron diferencias estadísticamente significativas en algunos experimentos; sin embargo, es importante enfatizar que sí se observaron tendencias claras que indican que la expresión de FLAG-pALT^{INK4a/b} disminuyó la senescencia celular. Con el fin de comprobar inequívocamente que la expresión de FLAG-pALT^{INK4a/b} disminuye la senescencia celular, se repitieron los análisis identificando mediante inmunofluorescencia a las células que expresan FLAG-pALT^{INK4a/b}, tomándose como control a las células que no fueron transfectadas en la misma caja de cultivo.

En primer lugar, se realizó una tinción SA- β gal de fibroblastos electroporados con pcDNA3.1-FLAG-pALT y posteriormente se llevó a cabo una inmunofluorescencia contra FLAG para identificar las células que expresan la proteína FLAG-pALT. Se realizó un único experimento por triplicado y se contabilizaron 50 células por condición. De forma interesante se encontró que los fibroblastos que fueron positivos para FLAG y que por lo tanto expresan pALT^{INK4a/b} mostraron un porcentaje mucho menor de células con actividad SA- β gal en todas las condiciones comparadas con las células que no expresan pALT^{INK4a/b} (Figura 22 B), así como una disminución significativa de alteraciones en la morfología nuclear (Figura 22 D). Adicionalmente se encontró que la muerte celular incrementa en los fibroblastos que expresan FLAG-pALT^{INK4a/b} y que las alteraciones en la morfología nuclear disminuyen significativamente (Figura 22 C).

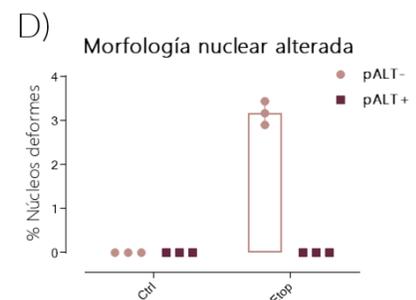
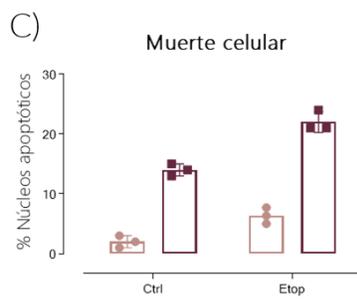
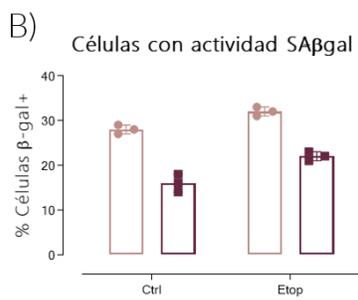
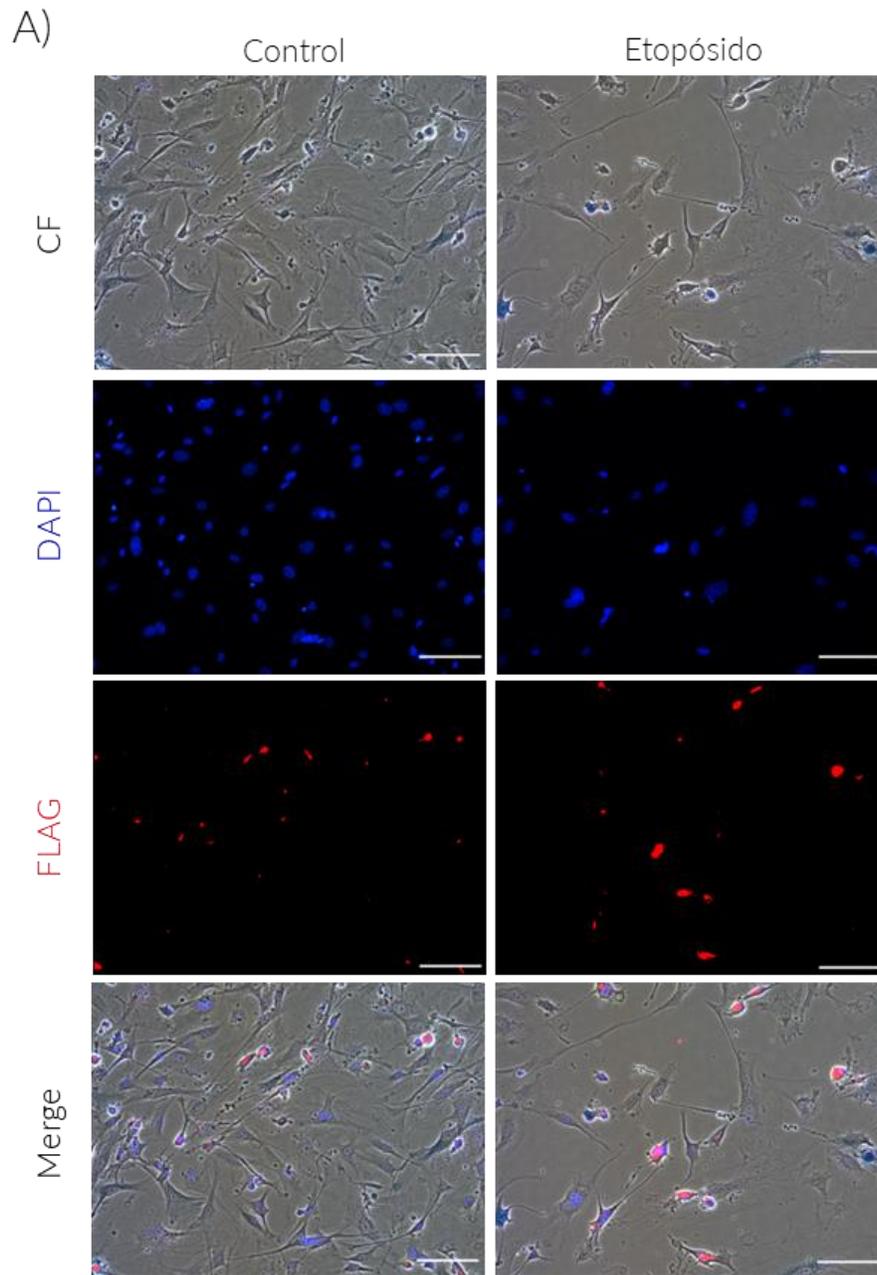
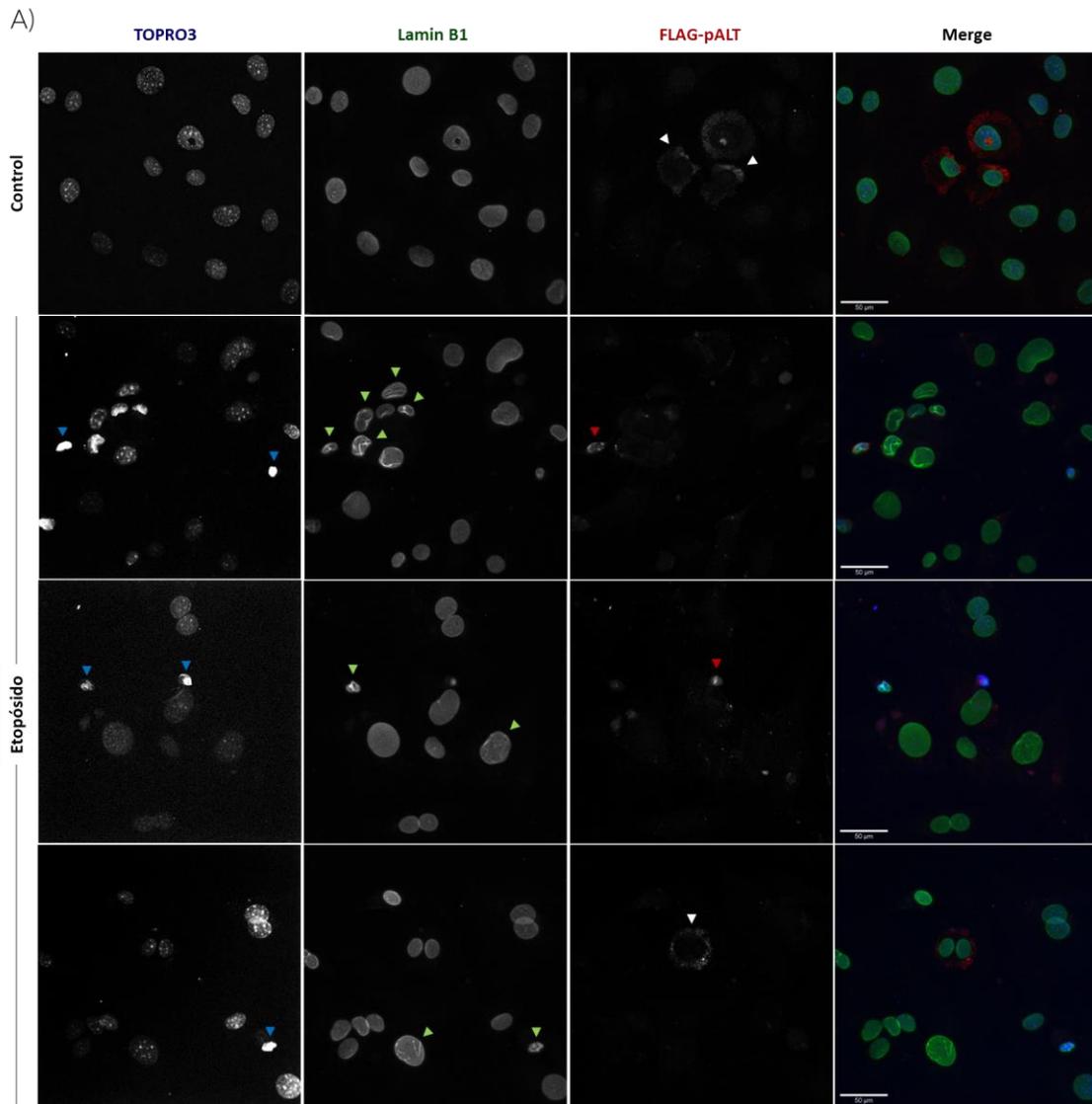


Figura 22. La expresión de FLAG- pALT^{INK4a/b} en fibroblastos de piel de ratón disminuye el número de células con actividad SA-βgal, alteraciones en la morfología nuclear y promueve la muerte celular. A) Fotos representativas de tinción para detectar actividad SA-βgal e inmunofluorescencia contra FLAG en fibroblastos de piel de ratón electroporados con pcDNA3.1-FLAG-pALT con o sin inducción de daño al DNA con etopósido. Barra de escala: 100 μm. B) Cuantificación de células con actividad SA-βgal. C) Gráfica de porcentaje de núcleos apoptóticos. D) Cuantificación de núcleos con morfología alterada. Se realizó un experimento independiente por triplicado, se analizaron 50 células con expresión de FLAG-pALT^{INK4a/b} y 50 células sin expresión de la proteína por cada triplicado.



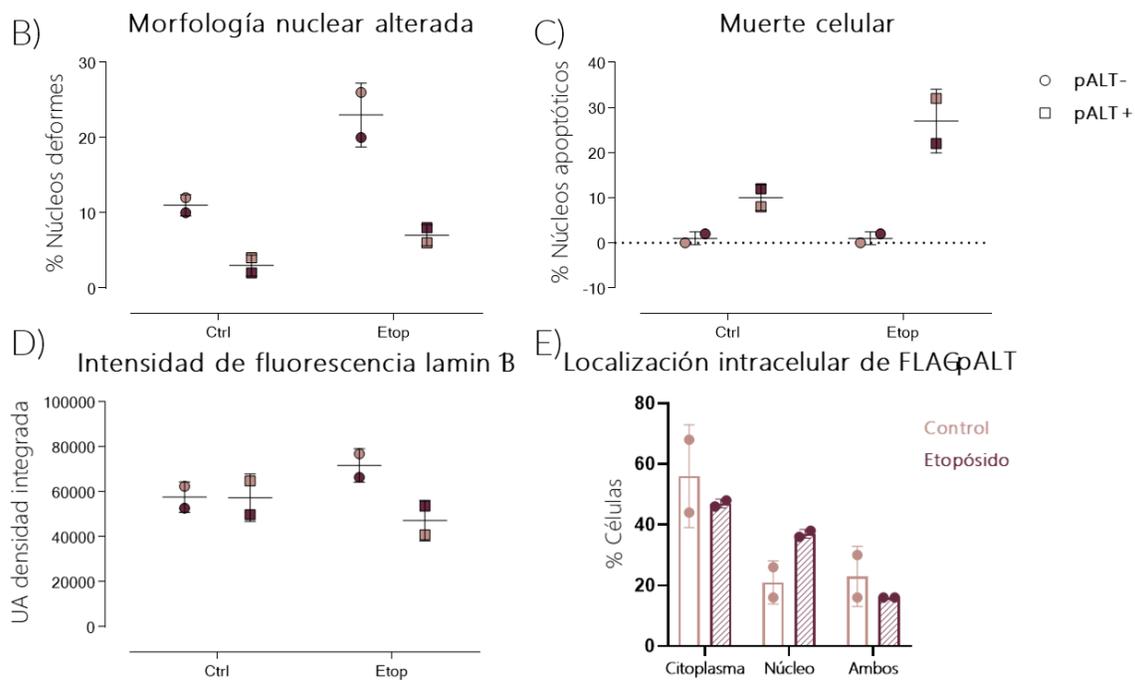


Figura 23. La expresión de FLAG-pALT^{INK4a/b} en fibroblastos de piel de ratón disminuye las alteraciones en la morfología nuclear y su localización en núcleo correlaciona con células en proceso de muerte celular. A) Fotos representativas de inmunofluorescencia contra lámina B1 y FLAG en MSFs electroporados con pcDNA3.1-FLAG-pALT con o sin inducción de daño al DNA con etopósido. Reconstrucción SD de Z-Stack. Barra de escala: 50µm. Se señala con punta de flecha blanca la localización intracelular de FLAG-pALT^{INK4a/b} citoplasmática, mientras que con punta de flecha roja se señala una localización nuclear, las puntas de flecha azules muestran núcleos apoptóticos y las verdes señalan núcleos con alteraciones en la envoltura nuclear. B) Cuantificación de núcleos deformes por condición. C) Gráfica de porcentaje de núcleos apoptóticos. D) Intensidad de fluorescencia de lámina B1. E) Gráfica de porcentaje de células con la localización intracelular de FLAG-pALT^{INK4a/b} indicada. Se realizaron dos experimentos independientes por triplicado. En total se analizaron 50 células con expresión de FLAG-pALT^{INK4a/b} y 50 células que no expresaron esta proteína por experimento.

Continuando con el análisis de características senescentes se realizaron dos experimentos independientes en los que se llevó a cabo una doble inmunofluorescencia para detectar a FLAG y a la lámina B1 simultáneamente (Figura 23). Se puede observar, contrario a lo esperado, que en ambos experimentos los fibroblastos que no expresan FLAG-pALT^{INK4a/b} sometidos a daño al DNA muestran un ligero aumento en la intensidad de fluorescencia correspondiente a la detección de la lámina B1 comparados con los fibroblastos que si expresan FLAG-pALT^{INK4a/b} (Figura 23 D); sin embargo, las alteraciones en la morfología nuclear muestran una marcada disminución en las células que expresan FLAG-pALT^{INK4a/b}

(Figura 23 B). De forma muy interesante se observa que el porcentaje de núcleos deformes en las células con daño al DNA que expresan FLAG-pALT^{INK4a/b}, es incluso menor que en los fibroblastos sin daño que no expresan esta proteína, lo cual nos habla de una clara actividad protectora de la morfología nuclear de la proteína pALT^{INK4a/b}.

Se encontró también que cuando los fibroblastos expresan FLAG-pALT^{INK4a/b} el porcentaje de núcleos apoptóticos aumenta significativamente cuando los fibroblastos son dañados (Figura 23 C), lo cual puede deberse a un mecanismo de evasión de la senescencia celular en el que pALT^{INK4a/b} parece promover la muerte celular para prevenir la acumulación de células senescentes. Una observación interesante a lo largo de los experimentos anteriores fue que la localización de FLAG-pALT^{INK4a/b} cambió al inducir daño al DNA, encontrándose más en el núcleo (Figura 23 E). A pesar de haber variaciones en la localización subcelular en la condición control, cuando los fibroblastos se sometieron a daño al DNA el único compartimento subcelular en el que se incrementa la expresión de la proteína FLAG-pALT^{INK4a/b} fue en el núcleo.

4. pALT^{INK4a/b} se expresa en fibroblastos de piel de neonato de ratopín.

Como parte de las perspectivas del proyecto, con el fin de comprobar que pALT^{INK4a/b} previene el establecimiento de la senescencia celular en el ratopín se planea silenciarlo en fibroblastos de piel de neonato de ratopín utilizando un siRNA, inducir senescencia con el modelo de daño al DNA con etopósido y evaluar la presencia de células senescentes. Para esto en primer lugar se comprobó la expresión de pALT^{INK4a/b} en fibroblastos de piel de neonato de ratopín, tanto en condición control como en condición de daño con etopósido 120 μ M (Figura 24). Se realizó una PCR con cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de: pulmón de ratopín neonato como control positivo, debido a que se ha reportado que pALT^{INK4a/b} se expresa en este órgano (Tian, X., et al., 2015); fibroblastos de piel de neonato en condición control y dañados con etopósido; así como de células HEK293T, pues se sabe que pALT^{INK4a/b} no se encuentra en humano.

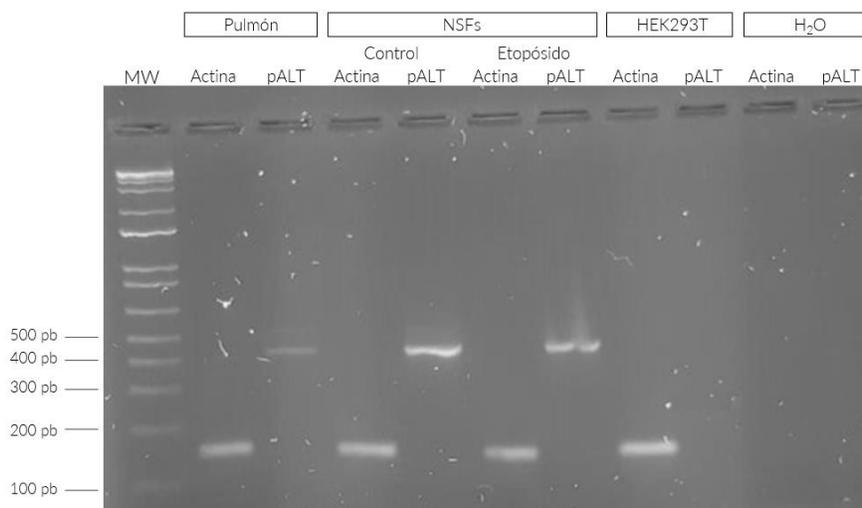


Figura 24. pALT^{INK4a/b} se expresa en fibroblastos de piel de ratopín neonato. Para comprobar que pALT^{INK4a/b} se expresa en fibroblastos de piel de ratopín y de esta forma asegurar su posible papel en la regulación de la senescencia en estas células, se extrajo RNA de pulmón de ratopín para utilizar como control positivo pues Tian y colaboradores (Tian, X., et al., 2015) reportaron que pALT^{INK4a/b} se expresa en este órgano, RNA de NSFs control y tratados con etopósido, así como RNA de células HEK293T como control negativo. Se realizó una PCR de pALT^{INK4a/b} y β -actina de cDNAs sintetizados a partir de las muestras antes mencionadas. Gel de agarosa al 2%. Las secuencias de primers utilizados se encuentran en el Anexo 2.

Discusión

El envejecimiento lejos de ser universal es un proceso muy variable entre las especies, habiendo especies que tienen un envejecimiento muy distinto al que como humanos experimentamos, llegando incluso a existir ejemplos de organismos que no envejecen en absoluto. Es importante también resaltar que es un proceso que varía en la tasa en que se lleva a cabo, así pues, es posible que existan organismos de distintas especies con una forma de envejecimiento similar pero que envejecen a ritmos distintos, es decir, una especie envejece más rápido que otra, pero manteniendo el mismo patrón de envejecimiento. Como se mencionó en la introducción, el ratopín es un organismo que tiene un envejecimiento muy particular sobre todo porque envejece de una forma muy saludable, sin desarrollar la mayoría de las enfermedades relacionadas con la edad que afectan a muchos mamíferos incluido el humano. Algo interesante es que no parecen acumular células senescentes conforme envejecen (Kawamura, Y., et al., 2020). En este punto es importante recordar que las células senescentes cumplen funciones muy importantes en diversos procesos

biológicos en el organismo como lo son el desarrollo embrionario, el cierre y cicatrización de heridas, así como en la regeneración celular. Las células senescentes tienen un papel destacado en la señalización necesaria para el correcto funcionamiento de cada uno de los procesos biológicos mencionados, y se encuentra muy bien regulada su presencia, siendo eliminadas por las células del sistema inmune de forma eficiente. El daño al DNA es el principal inductor de senescencia celular en el organismo adulto, en algunas especies como el ratón y el humano la acumulación de células senescentes conlleva a la manifestación del envejecimiento y enfermedades asociadas a la vejez. Las células senescentes se acumulan debido a que conforme los organismos envejecen ya no son eliminadas eficientemente por el sistema inmunológico, y también debido a que expresan proteínas antiapoptóticas que las hacen resistentes a la muerte por apoptosis (Galluzzi, L., et al., 2018).

En este trabajo propusimos que posiblemente uno de los mecanismos particulares que evita que el ratopín acumule células senescentes conforme avanza la edad, es la resistencia que tienen sus células a entrar en senescencia. Probablemente pALT^{INK4a/b} tiene una función regulatoria de los productos del locus *INK4*, debido a que se encuentra codificado en este locus, que es un regulador clave de la senescencia celular. El hecho de que esta isoforma no se haya encontrado en otras especies al momento, pero sí en ratopín, con el antecedente de que este organismo no acumula células senescentes conforme incrementa su edad, y que sus células en cultivo son resistentes al establecimiento de la senescencia, nos hace pensar que pALT^{INK4a/b} le permite tener un control adecuado de la senescencia celular, manteniendo las funciones fisiológicas de la senescencia celular, y evitando la adquisición del fenotipo senescente fuera de contextos fisiológicos y su progresiva acumulación. El objetivo de este trabajo fue estudiar si la isoforma pALT^{INK4ab}, promueve esta resistencia a desarrollar senescencia celular. Para responder esta pregunta se expresó heterológamente pALT^{INK4ab} en fibroblastos de piel de ratón y se encontró que la misma exposición a etopósido que induce senescencia celular en fibroblastos de ratón, induce senescencia en un porcentaje menor de fibroblastos de ratón que expresan heterológamente pALT^{INK4ab}, determinado por la actividad de SA-βgal (Figura 19), así como anomalías en la morfología nuclear y en la envoltura nuclear (Figura 20 - Figura 21). Un posible mecanismo mediante el cual pALT^{INK4ab} disminuye el número de células senescentes podría ser resultado de la competencia de unión a CDKs entre p16^{INK4a} y pALT^{INK4ab}, pues p15^{INK4B} específicamente mediante su región amino terminal (región presente en pALT^{INK4ab}) se une de forma más eficiente a CDKs que p16^{INK4a} (Xia, Y., et al., 2021), lo cual podría desplazar

a p16^{INK4a} y promover su degradación, disminuyendo así la expresión del SASP (Buj, R., et al., 2021), y la formación de SAHF (Lu, Y., et al., 2017).

Una observación desconcertante fue que la expresión de la lámina B1 no disminuyó en las células tratadas con etopósido independientemente del plásmido con el cual fueron transfectadas, ya que se ha reportado que los niveles de la lámina B1 disminuyen en fibroblastos de ratón en senescencia replicativa o inducida por activación de un oncogén, así como en fibroblastos derivados de pacientes con progeria, con síndrome de envejecimiento acelerado y en la piel humana cronológicamente envejecida (He, S. & Sharpless., 2017). Sin embargo, es importante mencionar que la expresión de la lámina B1 en las células senescentes se ha observado principalmente en modelos de envejecimiento, son pocos los estudios en los que se ha observado una disminución en la expresión de esta proteína en modelos de senescencia prematura inducida por estrés (Wang, A. et al., 2017) (Saito, N., et al., 2019). Notamos que en uno de los tres experimentos aumentó la lámina B1 en los fibroblastos transfectados con el vector vacío y tratados con etopósido, esto pudo deberse a una diferencia metodológica en el proceso de realización de las inmunofluorescencias de cada réplica experimental, se utilizó el mismo anticuerpo y las mismas condiciones así como los mismos parámetros al tomar las fotografías en el microscopio confocal, por lo tanto lo único que podría explicar la diferencia observada entre experimentos independientes es una mayor penetración del anticuerpo. Haría falta realizar más experimentos de inmunofluorescencia o realizar un Western blot de los fibroblastos tratados para concluir con mayor seguridad si la expresión de la lámina B1 disminuye, aumenta o no cambia. Sin embargo, resultó interesante observar que en la senescencia inducida por etopósido sí se genera un cambio en la morfología nuclear, ya que las invaginaciones se observaron tanto con inmunofluorescencias para detectar a la lámina B1 y a las láminas A/C como únicamente con tinción de núcleos con DAPI. Las alteraciones en la envoltura nuclear que ocurren durante la senescencia celular causan cambios globales en la estructura de la cromatina, que implican una modificación de la expresión génica que fortalece el fenotipo senescente, llevando a la expresión de genes antiapoptóticos, anti-mitóticos y de moléculas integrantes del SASP (Diao, Z., et al., 2021). La expresión de pALT^{INK4ab} previno las malformaciones de la envoltura nuclear y como consecuencia de esto podría prevenir los cambios de expresión génica que refuerzan el fenotipo senescente, y de esa forma disminuir el establecimiento de la senescencia celular. Finalmente, se observó de manera muy interesante que pALT^{INK4ab} cambia su localización subcelular a ser

predominantemente nuclear cuando se induce daño al DNA. Este dato es interesante pues nos habla del hecho de que pALT^{INK4ab} requiere estar en el núcleo para llevar a cabo su función cuando existe daño al DNA.

Algo que llama la atención también es el aumento en el número de células apoptóticas en los fibroblastos que expresan FLAG-pALT^{INK4ab}, esto ya se había esbozado en los experimentos en los que se analizó a la población completa de células y no solo a las que expresaron FLAG-pALT^{INK4ab}, pero al estudiarse únicamente la población celular efectivamente transfectada se observó un claro incremento en la muerte celular cuando se induce daño al DNA. Esto puede implicar un papel importante de pALT^{INK4ab} en la regulación de la muerte celular para evitar la senescencia celular, un resultado muy interesante puesto que una de las características de las células senescentes es la resistencia a la apoptosis mediada por la expresión de proteínas anti-apoptóticas. Este resultado concuerda con lo propuesto por Kawamura y colaboradores (Kawamura, Y., et al., 2020). En ese estudio se propone que las células senescentes de ratopín, a diferencia de las células senescentes de otros organismos, no son resistentes a la apoptosis, por el contrario, experimentan muerte celular, lo cual podría resultar en la baja cantidad de células senescentes identificadas en el ratopín conforme incrementa su edad, así como en sus células en cultivo al inducirse senescencia. Estudios adicionales de la expresión de proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas son requeridos para corroborar que efectivamente la expresión de pALT^{INK4ab} en células sometidas a daño al DNA, promueve la muerte celular evitando así la acumulación de células senescentes. Por otro lado, de forma interesante la región amino terminal de p15^{INK4B} que se encuentra en pALT^{INK4ab} también, tiene un papel importante en la regulación de la glucólisis debido a que se une e inhibe a la enolasa (Xia, Y., et al., 2021). Se sabe que las células senescentes presentan un aumento en la glucólisis (Sabbatinelli, J., et al., 2019), por lo tanto, tener una proteína adicional que interactúe con moléculas importantes en la glucólisis y como resultado de esta interacción se inhiba esta vía metabólica, podría promover la muerte celular de las células senescentes, pues se ha reportado que la administración de moléculas que inhiben la glucólisis como la 2-deoxiglucosa, en células senescentes, promueve su eliminación (Yao, G., et al., 2017).

En resumen, los hallazgos del presente proyecto apuntan a un papel de pALT^{INK4a/b} en la disminución de la senescencia, y un aumento en la muerte celular en un modelo de inducción de senescencia mediante daño al DNA con etopósido (Figura 25).

Resumen Gráfico

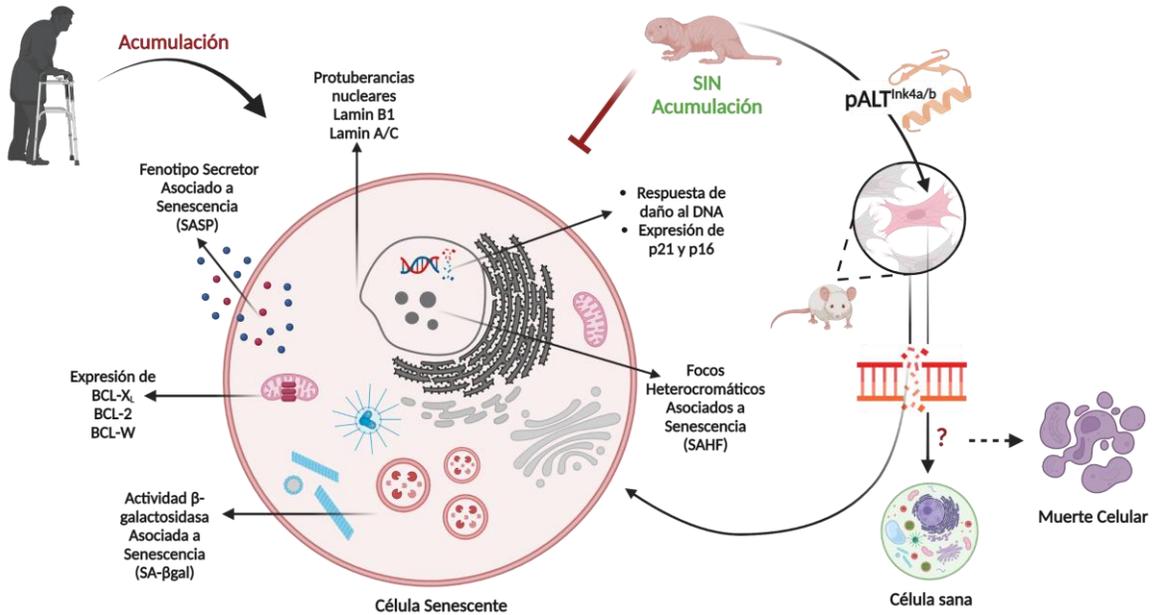


Figura 25. La expresión heteróloga de pALT^{Ink4a/b} en fibroblastos de piel de ratón sometidos a daño al DNA promueve la resistencia al establecimiento de senescencia celular. Una de las características del envejecimiento en humanos y la mayoría de los mamíferos es una acumulación de células senescentes, sin embargo, en el ratopín se ha visto que esto no ocurre. Adicionalmente en cultivo sus células se muestran resistentes ante estímulos de inducción de senescencia celular. De forma interesante el locus *Ink4* del ratopín expresa una isoforma denominada pALT^{Ink4a/b} que no se ha encontrado en ningún otro mamífero estudiado a la fecha. Aquí se observó que la expresión heteróloga de pALT^{Ink4a/b} en fibroblastos de piel de ratón sometidos a daño al DNA disminuye el número de células senescentes e incrementa la muerte celular. La expresión de pALT^{Ink4a/b} podría modular el destino celular, favoreciendo la muerte celular sobre la senescencia celular cuando el daño al DNA no puede ser reparado. SA-βgal (Senescence Associated β-galactosidase), SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype), SAHF (Senescence Associated Heterochromatin Foci). Creado con BioRender.com

Conclusión

En conjunto los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los fibroblastos de piel de ratopín neonato son más resistentes que los fibroblastos de ratón neonato a la senescencia inducida por daño al DNA (con etopósido), asociado con la función de la proteína pALT^{Ink4a/b}, y que ésta al ser expresada de manera heteróloga en fibroblastos de ratón neonato, ocasiona una disminución en el número de células senescentes así como una aumento en la muerte celular cuando existe daño inducido por etopósido.

Perspectivas

Para determinar en qué medida pALT^{Ink4a/b} contribuye a la resistencia al establecimiento de la senescencia celular en el ratopín, se podría realizar una curva de dosis-respuesta utilizando concentraciones de etopósido, y encontrar la dosis de etopósido que induzca un porcentaje de células senescentes similar a lo observado al utilizar una dosis de 120 µM en los fibroblastos de ratón. Adicionalmente, para determinar si efectivamente pALT^{Ink4a/b} evita la senescencia celular en células de ratopín, se tendría que inhibir su expresión, y evaluar si se vuelven sensibles de manera semejante a las células de ratón. Esto podría lograrse mediante un siRNA específico para el sitio de empalme de los exones de p15 y p16 característicos de pALT^{Ink4a/b}. Finalmente se podría evaluar si pALT^{Ink4a/b} promueve la muerte celular favoreciendo la expresión de proteínas pro-apoptóticas o inhibiendo la acción de proteínas anti-apoptóticas, así como mediante la realización de ensayos de apoptosis. También será interesante identificar moléculas con las que interactúe en el núcleo en respuesta al daño al DNA, e incluso estudiar si la proliferación celular se ve afectada frente a un estímulo mitogénico, o si al igual que las células senescentes del ratón, son incapaces de proliferar al inducirse daño al DNA con etopósido. La realización de todos estos experimentos nos permitiría comprender de una manera más completa, el papel de pALT^{Ink4a/b} en las diversas características que definen a las células senescentes.

Bibliografía

Alessio, N., Aprile, D., Cappabianca, S., Peluso, G., Di Bernardo, G., & Galderisi, U. (2021). Different Stages of Quiescence, Senescence, and Cell Stress Identified by Molecular Algorithm 75ase don the Expression of Ki67, RPS6, and Beta-Galactosidase Activity. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3102. <https://doi.org/10.3390/ijms22063102>

Amaya-Montoya, M., Pérez-Londoño, A., Guatibonza-García, V., Vargas-Villanueva, A., & Mendivil, C. O. (2020). Cellular Senescence as a Therapeutic Target for Age-Related Diseases: A Review. *Advances in therapy*, 37(4), 1407–1424. <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01287-0>.

American Federation for Aging Research (2016). Theories of Aging. *Biology of Aging*. Recuperado el 28 de marzo de 2021 de <https://www.afar.org/learn>.

American Federation for Aging Research (2021). Recuperado el 15 de noviembre de 2021 de <https://www.afar.org/what-is-geroscience>.

Baker, D., Wijshake, T., Tchkonja, T. et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232–236 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature10600>.

Berger, J. H., & Bardeesy, N. (2007). Modeling INK4/ARF tumor suppression in the mouse. *Current molecular medicine*, 7(1), 63–75. <https://doi.org/10.2174/156652407779940477>.

Bernardes de Jesus, B., Vera, E., Schneeberger, K., Tejera, A. M., Ayuso, E., Bosch, F., & Blasco, M. A. (2012). Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO molecular medicine*, 4(8), 691–704. <https://doi.org/10.1002/emmm.201200245>

Demidenko, Z. N., & Blagosklonny, M. V. (2008). Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(21), 3355–3361. <https://doi.org/10.4161/cc.7.21.6919>.

Diao, Z., Ji, Q., Wu, Z., Zhang, W., Cai, Y., Wang, Z., Hu, J., Liu, Z., Wang, Q., Bi, S., Huang, D., Ji, Z., Liu, G. H., Wang, S., Song, M., & Qu, J. (2021). SIRT3 consolidates heterochromatin and counteracts senescence. *Nucleic acids research*, 49(8), 4203–4219. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab161>.

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>

Marión, R. M., & Blasco, M. A. (2010). Telomeres and telomerase in adult stem cells and pluripotent embryonic stem cells. *Advances in experimental medicine and biology*, 695, 118–131. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7037-4_9

Borghesan, M., Hoogaars, W., Varela-Eirin, M., Talma, N., & Demaria, M. (2020). A Senescence-Centric View of Aging: Implications for Longevity and Disease. *Trends in cell biology*, 30(10), 777–791. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.07.002>

Braude, S., Holtze, S., Begall, S., Brenmoehl, J., Burda, H., Dammann, P., Del Marmol, D., Gorshkova, E., Henning, Y., Hoeflich, A., Höhn, A., Jung, T., Hamo, D., Sahm, A., Shebzukhov, Y., Šumbera, R., Miwa, S., Vyssokikh, M. Y., von Zglinicki, T., Averina, O., ... Hildebrandt, T. B. (2021). Surprisingly long survival of premature conclusions about naked mole-rat biology. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 96(2), 376–393. <https://doi.org/10.1111/brv.12660>.

Buffenstein R. (2005). The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 60(11), 1369–1377. <https://doi.org/10.1093/gerona/60.11.1369>.

Buffenstein R. (2008). Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: insights from a successfully aging species. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 178(4), 439–445. <https://doi.org/10.1007/s00360-007-0237-5>.

Buj, R., Leon, K. E., Anguelov, M. A., & Aird, K. M. (2021). Suppression of p16 alleviates the senescence-associated secretory phenotype. *Aging*, 13(3), 3290–3312. <https://doi.org/10.18632/aging.202640>.

Chakravarti, D., LaBella, K. A., & DePinho, R. A. (2021). Telomeres: history, health, and hallmarks of aging. *Cell*, 184(2), 306–322. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.028>

Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J., & van Deursen, J. M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates?. *EMBO reports*, 15(11), 1139–1153. <https://doi.org/10.15252/embr.201439245>

Chung, K. W., & Chung, H. Y. (2019). The Effects of Calorie Restriction on Autophagy: Role on Aging Intervention. *Nutrients*, 11(12), 2923. <https://doi.org/10.3390/nu11122923>

A.A. Cohen, D.J. Holmes, *Evolution and the Biology of Aging*, Reference Module in Biomedical Sciences, *Elsevier*, 2014.

Cohen A. A. (2018). Aging across the tree of life: The importance of a comparative perspective for the use of animal models in aging. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1864(9 Pt A), 2680–2689. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.05.028>

Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*. 2009; 325:201–204. [PubMed: 19590001]

da Costa, J. P., Vitorino, R., Silva, G. M., Vogel, C., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2016). A synopsis on aging-Theories, mechanisms and future prospects. *Ageing research reviews*, 29, 90–112. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.06.005>.

Del Ángel, M. (2019). Estudio de la expresión heteróloga de la isoforma pALTInk4a/b del locus Ink4 de la rata topo lampiña, en el establecimiento de la senescencia celular en fibroblastos embrionarios de ratón [Tesis de maestría no publicada]. UNAM.

Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., & d'Adda di Fagagna, F. (2021). Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 22(2), 75–95. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>.

Dziechciaż, M., & Filip, R. (2014). Biological psychological and social determinants of old age: bio-psycho-social aspects of human aging. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*, 21(4), 835–838. <https://doi.org/10.5604/12321966.1129943>

Doonan, R., McElwee, J. J., Matthijssens, F., Walker, G. A., Houthoofd, K., Back, P., Matscheski, A., Vanfleteren, J. R., & Gems, D. (2008). Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes & development*, 22(23), 3236–3241. <https://doi.org/10.1101/gad.504808>.

Edrey, Y. H., Hanes, M., Pinto, M., Mele, J., & Buffenstein, R. (2011). Successful aging and sustained good health in the naked mole rat: a long-lived mammalian model for biogerontology and biomedical research. *ILAR journal*, 52(1), 41–53. <https://doi.org/10.1093/ilar.52.1.41>.

Fatima, I., Chen, G., Botchkareva, N. V., Sharov, A. A., Thornton, D., Wilkinson, H. N., Hardman, M. J., Grutzkau, A., Pedro de Magalhaes, J., Seluanov, A., Smith, E. S. J., Gorbunova, V., Mardaryev, A. N., Faulkes, C. G., & Botchkarev, V. A. (2022). Skin Aging in

Long-Lived Naked Mole-Rats Is Accompanied by Increased Expression of Longevity-Associated and Tumor Suppressor Genes. *The Journal of investigative dermatology*, 142(11), 2853–2863.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2022.04.028>.

Fisher, A. L., Ohsako, S., & Caudy, M. (1996). The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain. *Molecular and cellular biology*, 16(6), 2670–2677. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.6.2670>.

Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science*. 2010; 328:321–326. [PubMed: 20395504]

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.

Gamell, C., Ginsberg, D., Haupt, S., & Haupt, Y. (2017). New insights on the regulation of INK4/ARF locus expression. *Oncotarget*, 8(63), 106147–106148. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22258>.

Gil, J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumor suppressor locus: all for one or one for all. *Nature reviews. Molecular cell biology* vol. 7:9: 667-77 (2006). <https://doi.org/10.1038/nrm1987>.

Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovskiy, V., Jurk, D.,

Gray, D. A., & Woulfe, J. (2005). Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste. *Science of aging knowledge environment*: SAGE KE, 2005(5), re1. <https://doi.org/10.1126/sageke.2005.5.re1>.

Holmes, M. M., & Goldman, B. D. (2021). Social Behavior in Naked Mole-Rats: Individual Differences in Phenotype and Proximate Mechanisms of Mammalian Eusociality. *Advances in experimental medicine and biology*, 1319, 35–58. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65943-1_2.

INEGI (2020). Censo de Población y vivienda 2020. Recuperado el 03 de marzo de 2021 de <https://censo2020.mx/>.

Jin, K. (2010). Modern Biological Theories of Aging. *Aging Dis.*, 1(2), pp.72–74.

Johnson T. E. (1990). Increased lifespan of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4971), 908–912. <https://doi.org/10.1126/science.2392681>.

Jones SE, Lennon JT (2010) Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:5881–5886. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912765107>.

Kanfi Y, Naiman S, Amir G, Peshti V, Zinman G, Nahum L, Bar-Joseph Z, Cohen HY. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature*. 2012; 483:218–221. [PubMed: 22367546]

Yoshimi Kawamura, Kaori Oka, Mayuko Takamori, Yuki Sugiura, Yuki Oiwa, Shusuke Fujioka, Sayuri Homma, Shingo Miyawaki, Minoru Narita, Takaichi Fukuda, Makoto Suematsu, Hidemasa Bono, Hideyuki Okano, Kyoko Miura. Senescent cell death as an aging resistance mechanism in naked mole-rat. *bioRxiv* 2020.07.02.155903. <https://doi.org/10.1101/2020.07.02.155903>.

Kirkwood, T. B., & Melov, S. (2011). On the programmed/non-programmed nature of ageing within the life history. *Current biology: CB*, 21(18), R701–R707. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.07.020>.

Ladiges, W., Van Remmen, H., Strong, R., Ikeno, Y., Treuting, P., Rabinovitch, P., & Richardson, A. (2009). Lifespan extension in genetically modified mice. *Aging cell*, 8(4), 346–352. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00491.x>.

Larson, J. & Park, T. J. (2009). Extreme hypoxia tolerance of naked mole-rat brain. *NeuroReport* 20, 1634–1637.

Longo, V. D., Gralla, E. B., & Valentine, J. S. (1996). Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 271(21), 12275–12280. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.21.12275>.

López-Ortín, C., Blasco, M., Partridge, L., Serrano, M. et al. The hallmarks of Aging. *Cell* 156(6): 1194-1217 (2013).
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 186(2), 243–278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>

Aledo, J. C., & Blanco, J. M. (2015). Aging is neither a failure nor an achievement of natural selection. *Current aging science*, 8(1), 4–10.

Lu, Y., Ma, W., Li, Z., Lu, J., & Wang, X. (2017). The interplay between p16 serine phosphorylation and arginine methylation determines its function in modulating cellular apoptosis and senescence. *Scientific reports*, 7, 41390. <https://doi.org/10.1038/srep41390>.

Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., Schmitt, C. A., ... Demaria, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179(4), 813–827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>.

Matheu, A., Maraver, A., Collado, M., Garcia-Cao, I., Cañamero, M., Borrás, C., Flores, J.M., Klatt, P., Viña, J. and Serrano, M. Anti-aging activity of the Ink4/Arf locus. *Aging Cell*, 8: 152-161 (2009).
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00458.x>.

Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, Longo DL, Allison DB, Young JE, Bryant M, et al. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature*. 2012; 489:318–321. [PubMed: 22932268]

Medvedev Z. A. (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 65(3), 375–398. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1990.tb01428.x>.

Mohamad Kamal NS, Safuan S, Shamsuddin S, Foroozandeh P. Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods. *Eur J Cell Biol*. 99(6):151108 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151108>.

Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Yanai H, Fraifeld VE. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev*. 2012

Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, Liu P, Mostoslavsky G, Franco S, Murphy MM, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*. 2006; 124:315–329. [PubMed: 16439206]

Muñoz-Lorente, M. A., Cano-Martin, A. C., & Blasco, M. A. (2019). Mice with hyper-long telomeres show less metabolic aging and longer lifespans. *Nature communications*, 10(1), 4723. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12664-x>

Olovnikov A. M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of theoretical biology*, 41(1), 181–190. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(73\)90198-7](https://doi.org/10.1016/0022-5193(73)90198-7).

Organización Mundial de la Salud (2021). *Envejecimiento y ciclo de vida*. Recuperado el 03 de marzo de 2021 de <https://www.who.int/ageing/about/facts/es/>.

Park, T. J., Reznick, J., Peterson, B. L., Blass, G., Omerbas̃ic, D., Bennett, N. C., Henning, P., Kuich, J. L., Zasada, C., Browe, B. M., Hamann, W., Applegate, D. T., Radke, M. H., Kosten, T., Lutermann, H., et al. (2017). Fructose-driven glycolysis supports anoxia resistance in the naked mole-rat. *Science* 356, 307–311.

Pifferi, F., & Aujard, F. (2019). Caloric restriction, longevity and aging: Recent contributions from human and non-human primate studies. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 95, 109702. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109702>

Poi, M. J., Knobloch, T. J., & Li, J. (2017). Deletion of RDINK4/ARF enhancer: A novel mutation to "inactivate" the INK4-ARF locus. *DNA repair*, 57, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.06.027>.

Pomatto, L., & Davies, K. (2018). Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. *Free radical biology & medicine*, 124, 420–430. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.016>

Rajman, L., Chwalek, K., & Sinclair, D. A. (2018). Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. *Cell metabolism*, 27(3), 529–547. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.011>

Rando TA, Chang HY. Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. *Cell*. 2012; 148:46–57. [PubMed: 22265401]

Razgonova, M. P., Zakharenko, A. M., Golokhvast, K. S., Thanasoula, M., Sarandi, E., Nikolouzakis, K., Fragkiadaki, P., Tsoukalas, D., Spandidos, D. A., & Tsatsakis, A. (2020). Telomerase and telomeres in aging theory and chronographic aging theory (Review). *Molecular medicine reports*, 22(3), 1679–1694. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11274>.

Reichard M. (2017). Evolutionary perspectives on ageing. *Seminars in cell & developmental biology*, 70, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.05.013>.

Reznick, J., Park, T. J., & Lewin, G. R. (2021). A Sweet Story of Metabolic Innovation in the Naked Mole-Rat. *Advances in experimental medicine and biology*, 1319, 271–286. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65943-1_10

Ruby, J. G., Smith, M., & Buffenstein, R. (2018). Naked Mole-Rat mortality rates defy gompertzian laws by not increasing with age. *eLife*, 7, e31157. <https://doi.org/10.7554/eLife.31157>

Sabbatinelli, J., Prattichizzo, F., Olivieri, F., Procopio, A. D., Rippo, M. R., & Giuliani, A. (2019). Where Metabolism Meets Senescence: Focus on Endothelial Cells. *Frontiers in physiology*, 10, 1523. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01523>.

Sagot, I., & Laporte, D. (2019). Quiescence, an individual journey. *Current genetics*, 65(3), 695–699. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-00928-w>

Saito, N., Araya, J., Ito, S., Tsubouchi, K., Minagawa, S., Hara, H., Ito, A., Nakano, T., Hosaka, Y., Ichikawa, A., Kadota, T., Yoshida, M., Fujita, Y., Utsumi, H., Kurita, Y., Kobayashi, K., Hashimoto, M., Wakui, H., Numata, T., Kaneko, Y., ... Kuwano, K. (2019). Involvement of Lamin B1 Reduction in Accelerated Cellular Senescence during Chronic Obstructive Pulmonary Disease Pathogenesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 202(5), 1428–1440. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801293>,

Saldmann, F., Viltard, M., Leroy, C., & Friedlander, G. (2019). The Naked Mole Rat: A Unique Example of Positive Oxidative Stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 4502819. <https://doi.org/10.1155/2019/4502819>.

Sang, L., & Coller, H. A. (2009). Fear of commitment: Hes1 protects quiescent fibroblasts from irreversible cellular fates. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(14), 2161–2167. <https://doi.org/10.4161/cc.8.14.9104>.

Sang, L., Coller, H. A., & Roberts, J. M. (2008). Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5892), 1095–1100. <https://doi.org/10.1126/science.1155998>.

Sathyan, S., & Verghese, J. (2020). Genetics of frailty: A longevity perspective. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*, 221, 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.03.005>.

Schmeer, C., Kretz, A., Wengerodt, D., Stojiljkovic, M., & Witte, O. W. (2019). Dissecting Aging and Senescence—Current Concepts and Open Lessons. *Cells*, 8(11), 1446. <https://doi.org/10.3390/cells8111446>.

Seluanov, A., Chen, Z., Hine, C., Sasahara, T. H., Ribeiro, A. A., Catania, K. C., Presgraves, D. C., & Gorbunova, V. (2007). Telomerase activity coevolves with body mass not lifespan. *Aging cell*, 6(1), 45–52. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00262.x>.

Serrano M (2010). Shifting senescence into quiescence by turning up p53. *Cell Cycle* 9(21):4256–4257.

Simboeck, E., Ribeiro, J. D., Teichmann, S., & Di Croce, L. (2011). Epigenetics and senescence: learning from the INK4-ARF locus. *Biochemical pharmacology*, 82(10), 1361–1370. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.084>.

Smith, M., & Buffenstein, R. (2021). Managed Care of Naked Mole-Rats. *Advances in experimental medicine and biology*, 1319, 381–407. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65943-1_16.

Speakman J. R. (2005). Body size, energy metabolism and lifespan. *The Journal of experimental biology*, 208(Pt 9), 1717–1730. <https://doi.org/10.1242/jeb.01556>.

Takasugi, M., Firсанov, D., Tomblin, G. et al. Naked mole-rat very-high-molecular-mass hyaluronan exhibits superior cytoprotective properties. *Nat Commun* 11, 2376 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16050-w>.

Takata, T., & Ishikawa, F. (2003). Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in HES1- and HEY2-mediated transcriptional repression. *Biochemical and biophysical research communications*, 301(1), 250–257. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)03020-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)03020-6).

Tian, X., Azpurua, J., Ke, Z., Augereau, A., Zhang, Z. D., Vijg, J., Gladyshev, V. N., Gorbunova, V., & Seluanov, A. (2015). INK4 locus of the tumor-resistant rodent, the naked mole rat, expresses a functional p15/p16 hybrid isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(4), 1053–1058. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418203112>.

Wagner, K. H., Cameron-Smith, D., Wessner, B., & Franzke, B. (2016). Biomarkers of Aging: From Function to Molecular Biology. *Nutrients*, 8(6), 338. <https://doi.org/10.3390/nu8060338>

Wang, A. S., Ong, P. F., Chojnowski, A., Clavel, C., & Dreesen, O. (2017). Loss of lamin B1 is a biomarker to quantify cellular senescence in photoaged skin. *Scientific reports*, 7(1), 15678. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15901-9>

Xia, Y., Liu, Y., Yang, C., Simeone, D. M., Sun, T. T., DeGraff, D. J., Tang, M. S., Zhang, Y., & Wu, X. R. (2021). Dominant role of CDKN2B/p15INK4B of 9p21.3 tumor suppressor hub in inhibition of cell-cycle and glycolysis. *Nature communications*, 12(1), 2047. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22327-5>

Yao, G. D., Yang, J., Li, X. X., Song, X. Y., Hayashi, T., Tashiro, S. I., Onodera, S., Song, S. J., & Ikejima, T. (2017). Blocking the utilization of glucose induces the switch from senescence to apoptosis in pseudolaric acid B-treated human lung cancer cells in vitro. *Acta pharmacologica Sinica*, 38(10), 1401–1411. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.39>.

Zhang, C., & Cuervo, A. M. (2008). Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nature medicine*, 14(9), 959–965. <https://doi.org/10.1038/nm.1851>

Zhao, Y., Tyshkovskiy, A., Muñoz-Espín, D., Tian, X., Serrano, M., de Magalhaes, J. P., Nevo, E., Gladyshev, V. N., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2018). Naked mole rats can undergo developmental, oncogene-induced and DNA damage-induced cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(8), 1801–1806. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721160115>.

Anexo 1

Purificación del plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT

Materiales y Reactivos

- Agar LB*
- Medio LB líquido*
- Bacterias quimio-competentes
- Plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT
- Plásmido pcDNA3.1-

*Receta en Anexo 2

Día 1

Transformación de bacterias quimio-competentes

1. Incubar 200 µl de bacterias quimio-competentes con 10 ng del plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT o pcDNA3.1- por 30 min en hielo.
2. Incubar por 45 seg a 42°C.
3. Transferir a 800 µl de medio S.O.C. de ThermoFisher® (No. Cat. 15544034), previamente atemperado a 37 °C.
4. Incubar a 37°C durante 45 min en agitación vigorosa.
5. Platear el cultivo en una caja Petri de 10 cm con Agar LB suplementado con el antibiótico de selección (Ampicilina 0.1 mg/ml), hasta que se evapore todo el líquido.
6. Incubar a 37 °C por 16 h.

Día 2

1. Inocular 250 ml de Medio LB líquido suplementado con antibiótico de selección (Ampicilina 0.1 mg/ml) con una colonia de bacterias transformadas.
2. Cultivar a 37°C por 14 a 16 h en agitación vigorosa, hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial, una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.7.

Día 3

Purificación de plásmido

Se utilizó el kit “Plasmid Plus Maxi Kit” (No. Cat. 12965, Quiagen), para purificar el plásmido siguiendo las instrucciones del fabricante.

El plásmido purificado se resuspendió en agua Milli-Q estéril a una concentración de 1µg/µl.

Análisis de restricción

Materiales y Reactivos

- Buffer TAE 1X*
- Sybr Green (No. Catálogo S7563, Invitrogen)
- Agarosa
- Enzimas de restricción BamHI, HindIII y SmaI.
- Buffer de carga 6X*

*Receta en Anexo 2

Para verificar la identidad del plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT se hizo un análisis de restricción con las enzimas HindIII, BamHI y SmaI.

1. Para las reacciones de digestión se incubaron 200 ng de plásmido con las enzimas de restricción y el buffer de restricción 1x apropiado, de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un volumen final de 20 µl.
2. Incubar a 37°C por 1 h.
3. Se realizó una electroforesis con las muestras digeridas del DNA.

Enzima	Volumen añadido a reacción	Buffer	Marca
HindIII	0.2 µl	B	Roche
BamHI	0.2 µl	NEB 3.1	New England Biolabs
SmaI	0.2 µl	CutSmart	New England Biolabs

Electroforesis de DNA

1. Preparar un gel de agarosa al 1% con 0.01% de Sybr Green en Buffer TAE 1X.
2. Cargar 5 μ l de cada reacción enzimática más 1 μ l de buffer de carga 6x por pozo.
3. Correr a un voltaje constante de 50 V durante 60 min aproximadamente en Buffer TAE 1X.
4. Observar el DNA a una λ de 365 nm.

Transfección de células HEK293 con PEI

Materiales y Reactivos

- Medio de cultivo suplementado sin antibiótico*
- PEI (1 μ g/ μ l)
- Plásmidos pcDNA3.1⁺, pcDNA3.1⁺-FLAG-pALT y pQBI-50
- OPTIMEM

*Receta en Anexo 2

Día 1

Sembrar 3.5×10^5 células por pozo en una caja de 6 pozos en medio suplementado sin antibióticos.

Día 2

1. Preparar mezcla de transfección por separado.

Solución de PEI-OPTIMEM 75 μ l por pozo (4 μ g PEI por μ g de DNA)

Solución de DNA-OPTIMEM 75 μ l por pozo (1 μ g de DNA)

2. Mezclar gentilmente solución de PEI con solución de DNA. Incubar por 15 min a temperatura ambiente.
3. Retirar la mitad de medio de cada pozo (1ml).
4. Gotear 150 μ l de mezcla PEI-DNA a cada pozo.
5. Incubar de 4 h a 37°C con 5% CO₂ y una humedad relativa de 98%.
6. Cambiar el medio de cultivo con medio suplementado sin antibióticos.

Se transfectaron 2 pozos con plásmido pQBI-50 (GFP) para comprobar la eficiencia de transfección, 2 pozos con el plásmido pcDNA3.1-, y 2 pozos con el plásmido pcDNA3.1-FLAG-pALT.

Día 4

Comprobación de la eficiencia de transfección mediante la expresión de GFP al tomar fotografías en el microscopio de fluorescencia y calcular la eficiencia de transfección ((Células GFP+/Células totales) x 100).

Obtención de extracto de proteína.

Obtención de extracto de proteínas totales de células

Materiales y Reactivos

- Buffer de carga 5X*
- Buffer de Lisis RIPA*
- PBS 1X*

*Receta en Anexo 2

1. Quitar medio de cultivo de cada pozo.
2. Agregar 1ml de PBS frío y despegar células, colectar en tubo de 1.5 ml.
3. Centrifugar a 200 rpm por 5 min.
4. Lavar con 1ml de PBS frío.
5. Centrifugar a 200 rpm por 5 min.
6. Quitar PBS y agregar 80-150µl de buffer de lisis dependiendo del tamaño del pellet celular.
7. Incubar de 20 min en hielo.
8. Sonicar con 20 pulsos en frío.
9. Centrifugar en frío a 13000 rpm por 10 min.
10. Recuperar sobrenadante.
11. Cuantificar las proteínas totales*.
12. Ajustar volumen de muestras con buffer de lisis a fin de que todas las muestras tengan el mismo volumen final. Se recomienda cargar entre 30-100 µg de proteína.
13. Agregar Buffer de carga 5X.

14. Calentar muestras a 95°C por 5 min. Enfriar. Centrifugar para bajar el agua que se haya condensado.

*La cuantificación de proteína se realizó utilizando el DC™ Protein Assay Kit II (Biorad, No. Catálogo 5000112).

Western Blot

Materiales y Reactivos

- Buffer de corrida*
- Buffer de Transferencia*
- Gel separador al 15%*
- Gel concentrador*
- Rojo de Ponceau*
- TBST*

*Receta en Anexo 2

Día 1

Preparación del gel desnaturalizante

1. Mezclar las soluciones para el gel separador y verter la mezcla al cassette para geles de poliacrilamida. Agregar 500 µl de alcohol isobutílico sobre el gel, para alinearlos, y dejar polimerizar.
2. Una vez polimerizado el gel, drenar el alcohol isobutílico, y preparar el gel concentrador.
3. Con una micropipeta, verter el gel concentrador poco a poco sobre el gel separador, hasta casi llenar el cassette, y colocar el peine con cuidado de que no se formen burbujas. Esperar aproximadamente 15 min a que polimerice.

Electroforesis de gel de poliacrilamida

1. Llenar cámara de electroforesis con buffer de corrida.
2. Cargar muestras de proteína en gel SDS-PAGE.
3. Correr a 150 V por aproximadamente 2 h.
4. Transferir por aproximadamente 1 h a 400 miliamperes a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore # IPVH00010) pre-activada en metanol al 100%.
Para corroborar la transferencia, teñir con rojo de Ponceau al 0.1% por 5 min. Desteñir.

5. Bloquear con Leche descremada Bio-RAD No. Cat. 1706404 al 3% en TBST durante 30 min en agitación.
6. Dar 3 lavados con 5ml TBST
7. Incubar con el anticuerpo primario (1:1000) diluido en 2ml de TBST durante toda la noche en agitación a 4°C.

Día 2

1. Dar 3 lavados con 5 ml de TBST.
 2. Incubar 1 h en agitación a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (1:5000 en TBST). Proteger de la luz.
 3. Dar 3 lavados con 5 ml de TBST.
 4. Revelar en foto documentador Odyssey CLX® a una λ de 700 u 800 nm.
- Mantener la membrana protegida de la luz.

Anticuerpos primarios

<i>Anticuerpo</i>	Especie	Dilución	Marca	Catálogo
<i>Anti-Flag</i>	Ratón	1:1000	Sigma-Aldrich	F-3165
<i>Anti α-Tubulina</i>	Conejo	1:1000	ABCAM	

Anticuerpos Secundarios

<i>Anticuerpo</i>	Dilución	Marca	Catálogo
<i>IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG</i>	1:5000	LI-COR	925-32210
<i>IRDye® 680CW Goat anti-Rabbit IgG</i>	1:5000	LI-COR	925-32211

Aislamiento de fibroblastos de piel de ratón neonato.

Materiales y Reactivos

- Kit de disección
- Tripsina-EDTA 0.25% (Gibco, No. Catálogo 25200056)
- PBS 1% antibiótico (Penicilina/Estreptomocina) 1% antimicótico (anfotericina B)
- Medio de cultivo
- Cajas de cultivo celular de 6 cm de diámetro
- Gelatina 0.1%
- Medio de congelación*

*Receta en Anexo 2

1. Sacrificar al ratón neonato por decapitación.
2. Cortar colita de ratón neonato.
3. Lavar la colita en PBS con antibiótico y antimicótico.
4. Utilizando el kit de disección cortar la colita en pedazos pequeños.
5. Incubar 30 min a 37°C los pedazos de tejido en 500µl de tripsina.
6. Inactivar la tripsina con 3.5 ml de medio de cultivo y sembrar en una caja de 6 cm con gelatina al 0.1%*.
7. Incubar a 37°C con 5% CO₂ y una humedad relativa de 98%.
8. Monitorear diariamente, los fibroblastos salen del tejido lentamente, cuando haya muchos fibroblastos rodeando los pedazos de tejido subcultivar.
9. Expandir cultivos de fibroblastos de piel de ratón neonato y congelar máximo en el pase 2 a una densidad celular de 2x10⁶ células/ml de medio de congelación.

*La caja de cultivo debe incubarse 30 min con 1 ml de gelatina al 0.1% a 37°C, pasado el tiempo de incubación la solución de gelatina debe aspirarse y la caja de cultivo debe mantenerse a temperatura ambiente hasta que se utilice.

Cultivo de fibroblastos de ratón (MEFs/MSFs)

1. Descongelar MEFs/MSFs almacenados a -195°C en nitrógeno líquido en baño maría por 2 min.
2. Resuspender inmediatamente en 4 ml de medio de cultivo.
3. Centrifugar 0.4 r.c.f. por 5 min.
4. Resuspender el pellet en 10 ml de medio de cultivo.
5. Sembrar células en caja de 10 cm de diámetro.

6. Incubar a 37°C con 5% CO₂ y una humedad relativa de 98%.

Aislamiento y cultivo de fibroblastos de piel de ratopín neonato.

Materiales y Reactivos

- Kit de disección
- Tripsina-EDTA 0.25% (Gibco, No. Catálogo 25200056)
- PBS 1% antibiótico (Penicilina/Estreptomicina) 1% antimicótico (anfotericina B)
- Medio de cultivo para ratopín*
- Cajas de cultivo celular de 6 cm de diámetro
- Gelatina 0.1%
- Medio de congelación

*Receta en Anexo 2

1. Sacrificar al ratopín neonato por decapitación.
2. Cortar la colita del ratopín neonato.
3. Lavar la colita en PBS con antibiótico y antimicótico.
4. Utilizando el kit de disección cortar la colita en pedazos pequeños.
5. Incubar 30 min a 33°C los pedazos de tejido en 500µl de tripsina.
6. Inactivar tripsina con 3.5 ml de medio de cultivo para ratopín y sembrar en una caja de 6 cm con gelatina al 0.1%*.
7. Incubar a 33°C con 5% CO₂, 3% O₂ y humedad relativa de 98%.
8. Monitorear diariamente, los fibroblastos salen del tejido lentamente, cuando haya muchos fibroblastos rodeando los pedazos de tejido subcultivar.
9. Expandir los cultivos de fibroblastos de piel de ratopín neonato y congelar máximo en el pase 2 a una densidad celular de 1x10⁶ células/ml de medio de congelación.

*La caja de cultivo debe incubarse 30 min con 1 ml de gelatina al 0.1% a 37°C, pasado el tiempo de incubación la solución de gelatina debe aspirarse y la caja de cultivo debe mantenerse a temperatura ambiente hasta que se utilice.

Cultivo de fibroblastos de ratopín neonato

1. Descongelar NSFs almacenados a -195°C en nitrógeno líquido en baño maría por 2 min.

2. Resuspender inmediatamente en 4 ml de medio de cultivo para ratopín.
3. Centrifugar 0.4 r.c.f. por 5 min.
4. Resuspender el pellet en 10 ml de medio de cultivo para ratopín.
5. Sembrar a las células en una caja de 10 cm de diámetro.
6. Incubar a 33°C con 5% CO₂, 3% O₂ y humedad relativa de 98%.

Ensayo de actividad β -galactosidasa asociada a senescencia

Materiales y Reactivos

- Solución de Fijación*
- Solución de Tinción*
- PBS 1X
- Metanol
- DAPI (1mg/ml, 1:100 en PBS)

*Receta en Anexo 2

Día 1

1. Retirar el medio de fibroblastos cultivados sobre cubreobjetos estériles (caja de 12 pozos).
2. Dar dos lavados con PBS.
3. Fijar 5min a temperatura ambiente con solución de fijación para SA- β .
4. Retirar la solución de fijación y dar dos lavados con PBS.
5. Agregar 1 ml de solución de tinción por pozo.
6. Incubar toda la noche a 37°C (De 12 a 16 h máx.).

Día 2

1. Retirar la solución de tinción de los pozos.
2. Dar dos lavados con PBS.
3. Lavar 1 vez con 500 μ l de metanol y dejar secar al aire libre.

4. Teñir con 500 μ l de DAPI (1 mg/ml) durante 2 min.
5. Retirar el DAPI, dar dos lavados de 10 min cada uno con PBS.
6. Observar en microscopio de fluorescencia, tomar fotos en campo claro (Tinción SA- β gal) y a 460 nm (DAPI). Calcular el porcentaje de células con actividad SA- β gal por campo, contando el número de células Bgal+ y el número total de células por campo (Núcleos teñidos con DAPI).

Inmunofluorescencia

Materiales y Reactivos

- PBS 1X
- PFA 4%*
- BSA
- Fluoromont G® (No. Cat. 00-4958-02)
- DAPI (1mg/ml, 1:100 en PBS)

*Receta en Anexo 2

Día 1

1. Retirar el medio de los fibroblastos cultivados sobre cubreobjetos estériles en cajas de 12 pozos.
2. Dar tres lavados con PBS.
3. Fijar las células con PFA 4% durante 30 min a temperatura ambiente.
4. Retirar el PFA y dar 3 lavados con PBS.
5. Permeabilizar células con PBS/Tritón 0.5% por 5 min a temperatura ambiente.
6. Dar tres lavados con PBS.
7. Bloquear durante 30 min con PBS/BSA 5%.
8. Incubar con 130 μ l de anticuerpo primario diluido en PBS/BSA 2% a 4° C toda la noche en cámara húmeda.

Día 2

1. Dar tres lavados de 5 min cada uno con PBS.
2. Incubar con 130 µl de anticuerpo secundario Alexa Fluor® diluido en PBS/BSA 2% (1:500) a temperatura ambiente por 1 h protegido de la luz.
3. Dar tres lavados con 130 µl de PBS.
4. Teñir con 500 µl de DAPI durante 2 min.
5. Dar dos lavados de 10 min cada uno con PBS.
6. Montar el cubreobjetos con una gota de Fluoromont, dejar secar en la oscuridad por un mínimo de 2 h.
7. Observar en microscopía de fluorescencia*.

*Se utilizó un microscopio confocal LSM 710.

Extracción de RNA de tejidos y células adherentes

Materiales y Reactivos

- Cloroformo
- Agua libre de RNasas*
- Etanol al 75% (diluido en agua DEPC)
- Isopropanol
- TRIzol (Invitrogen, No. Catálogo 15596026)
- PBS 1X
- Homogeneizador o vidrio-teflón

*Receta en Anexo 2

Procedimiento

1. Preparar y homogenizar células adherentes o tejidos.

Para células adherentes

- i. Remover medio, lavar con 1 ml de PBS frío.

ii. Quitar PBS y agregar 1ml de TRIzol para una caja de 10 cm de diámetro, despegar células utilizando un *cell scraper*.

Para Tejidos

i. Homogenizar la muestra de tejido en 1 ml de TRIzol por cada 50-100mg de tejido utilizando un vidrio-teflón o un homogeneizador. Seguir con paso 2.

ii. Centrifugar a 12,000 g por 10 min a 4°C.

iii. Transferir la solución de homogenado limpio a un tubo nuevo. Seguir con paso 2.

2. Incubar las muestras por 5 min a temperatura ambiente.

3. Agregar 200 µl de cloroformo por ml de TRIzol. Agitar vigorosamente por 15 seg e incubar de 2 a 3 min a temperatura ambiente.

4. Centrifugar a 12,000 g por 15 min a 4°C.

5. Con cuidado transferir la fase acuosa superior a un tubo nuevo sin tocar la interfase.

6. Precipitar el RNA agregando 500 µl de isopropanol por ml de TRIzol. Mezclar por inversión, incubar por 10 min a temperatura ambiente.

7. Centrifugar a 12,000 g por 10 min a 4°C.

8. Decantar el sobrenadante y remover el líquido por aspiración.

9. Lavar el pellet de RNA con etanol al 75%, agregar 1 ml de etanol por cada ml de TRIzol. Mezclar por vórtex, centrifugar a 7,500 g por 5 min a 4°C.

10. Remover los restos de etanol dejando secar al aire de 5 a 10 min.

11. Disolver el RNA en 20 µl de agua libre de RNasas. Incubar la solución 10 min a 55-60°C. Guardar a -20°C.

Anexo 2

Agar LB

Reactivo	Concentración
Agar en polvo BioRad (No. Cat. 1660472EDU)	3.5 %
Agua destilada	Volumen necesario

Medio LB líquido

Reactivo	Concentración
Medio LF Fisher en polvo (No. Cat BP 1426-2)	2%
Agua destilada	Volumen necesario

Buffer TAE 1X

Reactivo	Concentración
Tris base (PM: 121.14 g/mol)	2M
EDTA disódico (mw: 372.24 g/mol)	1M
Ácido Acético (mw: 60.05 g/mol)	1M

1. Agregar 800 mL de dH₂O en un recipiente adecuado.
2. Añadir 242 g de base de Tris a la solución.
3. Añadir 18,61 g de EDTA disódico a la solución.
4. Añadir 59,955 g de ácido acético a la solución.

5. La solución 1x TAE es 40mM Tris, 20mM acetato y 1mM EDTA y típicamente tiene un pH alrededor de 8.6 (no ajustar).
6. Añadir dH₂O hasta que el volumen sea 1 L.

Buffer de carga 6X

El buffer de carga 6X está compuesto de un 0,03% de bromofenol azul, un 0,03% de xileno cianol FF, 60 mM de EDTA, pH 7,6 y un 60% de glicerol en agua de calidad para biología molecular.

Medio de cultivo sin antibiótico

DMEM Glutamax® (No cat. 10566-016) suplementado con 10% de suero fetal bovino.

Buffer de Carga 5X	Para 9.5 ml
<i>Agua bidestilada</i>	3.55 ml
<i>Tris-HCl 0.5 M pH 6.8</i>	1.25 ml
<i>Glicerol</i>	2.5 ml
<i>SDS 10%</i>	2 ml
<i>Azul de bromofenol</i>	200 µg

*Antes de usar añadir 25 µl de 2-mercaptoetanol por cada 475 µl de buffer de carga.

Buffer de Lisis RIPA	Para 1ml
<i>Tris-HCl 0.5 M pH 6.8</i>	10 µl
<i>EDTA</i>	2 µl
<i>SDS 0.1%</i>	5 µl
<i>Igepal</i>	10 µl
<i>Deoxicolato de sodio</i>	25 µl
<i>NACl 140 mM</i>	140 µl
<i>Inhibidor de proteasas</i>	100 µl
<i>Agua bidestilada</i>	708 µl

PBS 1X

Reactivo	Cantidad	Concentración
<i>Cloruro de sodio (PM: 58.44 g/mol)</i>	8 g	0.137 M
<i>Cloruro de Potasio (PM: 74.55 g/mol)</i>	0.2 g	0.0027 M
<i>Fosfato de Sodio Dibásico (PM: 141.96 g/mol)</i>	1.44 g	0.01 M
<i>Fosfato de Potasio Monobásico (PM: 136.09 g/mol)</i>	0.245 g	0.0018 M

1. Agregar 800 ml de agua destilada a un recipiente adecuado.
2. Añadir 8 g de cloruro de sodio a la solución.
3. Añadir 0,2 g de cloruro de potasio a la solución.
4. Añadir 1,44 g de fosfato de sodio dibásico a la solución.
5. Añadir 0,245 g de fosfato de potasio monobásico a la solución.
6. Ajuste la solución al pH deseado (típicamente pH \approx 7.4).
7. Añadir agua destilada hasta que el volumen sea de 1 L.

Medio de cultivo

DMEM Glutamax® (No cat. 10566-016) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina).

Buffer de corrida Tris-Glicina pH 8.3

Para preparar 1 L concentrado 10X

Reactivo	Cantidad	Concentración
<i>Tris base</i>	30.3 g	25 mM
<i>Glicina</i>	144 g	190 mM
<i>SDS</i>	10 g	0.1%

1. Disolver en 800 ml de agua bidestilada.
2. Ajustar el pH a 8.3 con HCl 6N
3. Aforar a 1 L con agua bidestilada.
4. Almacenar a 4°C.

Se usa 1X.

Buffer de transferencia

Al momento de usar se diluyen:

720 ml H₂O bidestilada

80 ml buffer de corrida 10X

200 ml Metanol

Gel separador 15%

Para 10 ml

Reactivo	Cantidad
<i>H₂O</i>	2.3 ml
<i>Acrilamida mix 30%</i>	5 ml
<i>Tris 1.5 M (pH 8.8)</i>	2.5 ml
<i>SDS 10%</i>	0.1 ml
<i>Persulfato de amonio 10%</i>	0.1 ml
<i>TEMED</i>	0.002 ml

Gel concentrador 5%

Para 6 ml

Reactivo	Cantidad
<i>H₂O</i>	4.1 ml
<i>Acrilamida mix 30%</i>	1 ml
<i>Tris 1 M (pH 6.8)</i>	0.75 ml
<i>SDS 10%</i>	0.06 ml
<i>Persulfato de amonio 10%</i>	0.06 ml

TEMED

0.006 ml

Rojo de Ponceau

Para preparar 40 ml

Reactivo	Cantidad	Concentración
<i>Rojo de Ponceau</i>	40 mg	0.1%
<i>Ácido acético</i>	2 ml	5%

1. Aforar a 40 ml con agua bidestilada.
2. Se almacena en oscuridad.

TBS 10X

Para preparar 1 L

Reactivo	Cantidad
<i>Trizma HCL</i>	24.23 g
<i>NaCl</i>	80.06 g

1. Disolver en 800 ml de agua.
2. Ajustar el pH a 7.6 con HCl puro.
3. Aforar a 1 L con agua bidestilada.
4. Almacenar a temperatura ambiente.

TBST

Para preparar 1 L

agua bidestilada 899 ml

TBS 10X 100 ml

Tween20 0.1% 1 ml

Almacenar a temperatura ambiente hasta 3 meses.

Medio de congelación

DMEM Glutamax® (No cat. 10566-016) suplementado con 20% de suero fetal bovino, 10% DMSO y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina).

Medio de cultivo de ratopín

DMEM Glutamax® (No cat. 10566-016) suplementado con 15% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco, No. Cat. 11140050) y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina).

Solución de Fijación Ensayo β galactosidasa

Disolver 2% de formaldehído (v/v) y 0.2% de glutaraldehído (v/v) con buffer PBS.

La solución es estable por un mes a temperatura ambiente.

Solución de Tinción Ensayo β galactosidasa

Para 20 ml

Reactivo	Cantidad	Concentración
<i>Solución X-gal</i>	1 ml	1 mg/ml
<i>Buffer ácido cítrico/fosfato de sodio (0.2 M)</i>	4 ml	40 mM
<i>Ferrocianuro de Potasio 100 mM</i>	1 ml	5 mM
<i>Ferricianuro de Potasio 100 mM</i>	1 ml	5 mM
<i>Cloruro de Sodio 5 M</i>	0.6 ml	150 mM
<i>Cloruro de Magnesio</i>	0.04 ml	2 mM
<i>Agua destilada</i>	12.36 ml	

PFA 4%

Para 500 ml

1. Disolver 20 g de paraformaldehído en 250 ml de agua destilada.
2. Calentar sin pasar los 60°C.
3. Agregar 1 o 2 hojuelas de NaOH.

4. Enfriar una vez disuelto.
5. Mezclar los 250 ml con 250 ml de PBS 2X.
6. Checar pH a 7.4 y filtrar.

Agua libre de RNasas

Para preparar agua libre de RNasa, utilizar botellas de vidrio sin RNasa. Agregar DEPC a 0.01% (v/v). Dejar reposar toda la noche y esterilizar en autoclave.

Secuencias de Primers

<i>Nombre</i>	<i>Dirección</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Especificidad</i>
<i>NMR p15-5'UTR</i>	Forward	CAGGAAAAGCCCGGAACTAACTAC	p15 5'UTR
<i>NMR p16-E2</i>	Reverse	GGTGACAGGGTCAGCGCAGTTCG	p16 Exon 2
<i>NMR beta-actin</i>	Forward	TTGCTGACAGGATGCAGAAG	beta-actin Exon 5
<i>NMR beta-actin</i>	Reverse	TGATCCACATCTGCTGGAAG	beta-actin Exon 6

Obtenidas de Fatima, I., et al., 2022.