



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“Estudio de la expresión heteróloga de la isoforma pALT^{Ink4a/b} del locus *Ink4* de la rata topo lampiña, en el establecimiento de la senescencia celular en fibroblastos embrionarios de ratón.”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Carlos Miguel del Ángel Muñoz

DIRECTORA DE TESIS

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

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR

Dra. María Sandra Cabrera Benítez, Facultad de Ciencias, UNAM

Dra. Marina Macías Silva, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad Universitaria, CDMX

Marzo de 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
Longevidad, senescencia y expectativa de vida	6
Teorías para explicar el envejecimiento	7
Teoría de la tasa de vida.....	7
Teoría de los radicales libres	9
Teorías evolutivas del envejecimiento.....	9
Acumulación de mutaciones y antagonismo pleiotrópico.....	10
Teoría del soma desechable.....	11
Teoría de la historia de vida	12
Coeficiente de longevidad.....	13
<i>Heterocephalus glaber</i>	16
Senescencia celular	18
Control del ciclo celular en las células senescentes.....	21
Papel fisiológico de la senescencia celular.....	24
Quiescencia celular	26
Ciclo celular en <i>Heterocephalus glaber</i>	29
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVO GENERAL.....	31
OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
MATERIAL Y MÉTODOS	33
Cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs).....	33
Ensayo de β -galactosidasa asociada a senescencia	33
Tinción de Sudán Black B.....	35
Inmunofluorescencia.....	36
In cell western blot.....	37
Western Blot	38
Especificaciones de los anticuerpos	40
Purificación de plásmidos.....	40

Electroforesis de DNA	41
Digestión enzimática	42
Transfección de MEFs	42
RESULTADOS	43
1. Establecimiento del modelo de senescencia celular en fibroblastos embrionarios de ratón inducida por daño al DNA	43
1.1 El tratamiento con etopósido incrementa la actividad de SA-β Gal	45
1.2 El tratamiento con etopósido induce una reducción de la expresión de HES1, un represor transcripcional que evita la geroconversión.	50
1.3 El tratamiento con etopósido indujo un aumento en la expresión de p16 ^{Ink4a} y p21 ^{Cip1} , inhibidores del ciclo celular involucrados en la senescencia celular.	52
1.4 El tratamiento con etopósido no incrementa la fosforilación de la histona H2AX.....	53
1.5 El tratamiento con etopósido no indujo la acumulación de lipofuscina, un agregado lipoproteico característico de las células senescentes tras 6 días in vitro.....	55
2. La expresión heteróloga de pALT ^{Ink4a/b} de H. Glaber en células de ratón protege del establecimiento de la senescencia celular.....	57
2.1 Reconstrucción de la secuencia de pALT ^{Ink4a/b}	57
2.2 Diseño del cDNA para expresar e identificar la traducción de pALT ^{Ink4a/b}	61
2.3 Construcción de los vectores para la expresión de pALT ^{Ink4a/b}	65
2.4 La expresión de pALT ^{Ink4a/b} previno el establecimiento de la senescencia celular inducida por daño al DNA	68
CONCLUSIÓN	82
DISCUSIÓN.....	82
CONCLUSIÓN	87
AGRADECIMIENTOS.....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

D.E.	Desviación estándar
DMEM	Del inglés, medio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
γH2Ax	Histona γ 2AX
<i>H. glaber</i>	<i>Heterocephalus glaber</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Hg	Mercurio
kDa	Kilo Daltones
Kg	Kilogramo
LQ	Coefficiente de longevidad. (Del inglés: Longevity quotient)
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
mm	Milímetros
MTORC1	Objetivo mecanístico de la rapamicina. (Del inglés: Mechanistical target of Rapamicyn)
pRB	Proteína del retinoblastoma

ROS	Especies reactivas de oxígeno. (Del inglés: Reactive oxygen species)
SA-β Gal	Ensayo de β -Galactosidasa asociada a senescencia
SAHF	Focos de histona asociados a senescencia. (Del inglés: Senescence associated histone foci)
SASP	Fenotipo secretorio asociado a senescencia. (Del inglés: Senescence associated secretory phenotype)
SBB	Sudan Black B
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β . (Del inglés: Transforming growth factor β)
UV	Ultra violeta
λ	Longitud de onda

RESUMEN

El envejecimiento es el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades e incremento de la mortalidad. Uno de los pilares del envejecimiento es la acumulación de células senescentes. La senescencia celular es un fenotipo en el cual las células dejan de proliferar, principalmente debido a la actividad de inhibidores del ciclo celular como p16^{Ink4a} que es codificado en el locus *Ink4*, además de que adquieren una alta actividad secretora que incluye quimiocinas, citocinas, y metaloproteasas, la persistencia de las células senescentes daña el tejido y se asocia a múltiples enfermedades relacionadas con la edad. En la naturaleza ha evolucionado una gran variedad de estrategias de historia de vida, y como resultado de esto, existen organismos que envejecen a diferentes tasas. La rata topo lampiña (*Heterocephalus glaber*) es un organismo sumamente longevo y en la literatura se acepta que no envejece, pues no presenta enfermedades relacionadas con la edad y como consecuencia tampoco presenta un incremento en la mortalidad en función del tiempo. Un probable mecanismo que explique su extraordinaria historia de vida es que es más resistente a la senescencia celular que otros animales que sí envejecen. También es el único organismo conocido que produce una isoforma del locus *Ink4* de inhibidores del ciclo celular, denominada pALT^{Ink4a/b}, aunque la posible contribución de esta isoforma a la resistencia a la senescencia celular de *H. glaber* no se conoce. En este trabajo se estandarizó un modelo de senescencia celular inducida por daño al DNA en fibroblastos embrionarios de ratón y se demostró que la expresión heteróloga de pALT^{Ink4a/b} de *H. glaber* en fibroblastos embrionarios de ratón redujo algunas características de la senescencia celular inducida por daño al DNA, tales como el incremento en la actividad de β-Galactosidasa asociada a senescencia, la expresión de los inhibidores del ciclo celular p21^{Cip1} y p16^{Ink4a}, e hipertrofia celular.

INTRODUCCIÓN

Longevidad, senescencia y expectativa de vida

La longevidad, la expectativa de vida y el envejecimiento son características independientes, pero no mutuamente excluyentes que surgen como resultado de una compleja interacción entre factores ambientales, de historia de vida, genéticos y epigenéticos que determinan tanto la cantidad de tiempo que vivirá un organismo, como la calidad de vida que tendrá. Sin tomar en cuenta la gran diversidad de eventos estocásticos y de historia de vida como son la depredación, los accidentes, la adquisición de enfermedades infecciosas y los factores externos de carácter ambiental, existe suficiente evidencia para pensar que el proceso de envejecimiento y la longevidad están altamente regulados a nivel genético, epigenético y por la interacción celular, dando como resultado un "mosaico de envejecimiento" en el cual diferentes elementos del organismo envejecen a diferentes tasas y tiempos¹.

Se entiende como *expectativa de vida* el tiempo promedio que vive la mayoría de los individuos de una población, mientras que la *expectativa máxima de vida* se define como la edad a la cual murió el 10% de los individuos más longevos de una población, o bien el mayor tiempo de vida registrado para un organismo de dicha especie. La *longevidad* se refiere al tiempo de vida máximo de un organismo en condiciones ideales, mientras que el *envejecimiento* es una caída en el desempeño fisiológico que refleja una serie de cambios, celulares y moleculares, que provocan directamente un aumento dependiente del tiempo en la tasa de mortalidad intrínseca del organismo. La relación entre longevidad y el envejecimiento no es siempre lineal, ya que pueden existir organismos que presenten síntomas de envejecimiento solamente durante una proporción muy corta de su vida, mientras que puede haber otros que tengan una vejez prolongada experimentada durante una gran parte de su vida².

Teorías para explicar el envejecimiento

El objetivo principal de investigar el envejecimiento es entender cuáles son los mecanismos involucrados en el envejecimiento fisiológico, para poder desarrollar terapias que lo retrasen y, sobre todo, que ayuden a mejorar la calidad de vida.

Históricamente existen dos corrientes de pensamiento por las cuales se ha estudiado el envejecimiento. La primera de ellas propone que el envejecimiento es un fenómeno programado genéticamente y que los seres vivos poseen uno o varios mecanismos conservados evolutivamente que dictan el tiempo y tasa a la cual ocurre el deterioro asociado con el envejecimiento. La otra plantea que el envejecimiento es un fenómeno estocástico, y que es resultado de la acumulación gradual y paulatina de daño y estrés, que darán como resultado una caída en el desempeño fisiológico asociada al tiempo^{3,4}. Prácticamente todas las teorías que se han planteado a lo largo de la historia de la investigación del envejecimiento siguen uno u otro planteamiento, sin embargo, hasta el día de hoy no existe un consenso absoluto sobre la explicación próxima y última del envejecimiento. A continuación, se resumen aquellas teorías que han contribuido al entendimiento actual del envejecimiento.

Teoría de la tasa de vida

La teoría de la tasa de vida ("rate-of-living") propone que la expectativa de vida de un organismo en condiciones ideales es inversamente proporcional a la demanda energética de su metabolismo por unidad de tiempo, es decir, que organismos con tasas metabólicas bajas vivirán más que aquellos con tasas metabólicas altas. Tomando en cuenta la relación biológica y física que existe entre la tasa de consumo calórico y la masa de un organismo, la expectativa de vida máxima se puede calcular mediante la regresión logarítmica de la función

de la masa corporal y la tasa metabólica basal. Esto quiere decir que como los organismos más pequeños tienen tasas metabólicas más elevadas, tendrán una expectativa máxima de vida menor que organismos con más masa. Esta relación entre masa y expectativa máxima de vida se mantiene de una manera muy robusta en los animales, particularmente en los mamíferos⁵. A pesar de que la mayoría de los animales mantienen esta estrecha relación entre tamaño y longevidad no se puede crear una generalización, pues existen algunos ejemplos en la naturaleza, tales como los murciélagos, las tortugas, las aves, la rata topo lampiña (*Heterocephalus glaber*), e inclusive el ser humano, en los cuales la expectativa máxima de vida supera a la predicha de acuerdo a su masa (Tabla 1). Además, esta relación representa solamente una regla descriptiva y a pesar de su alto valor predictivo, no explica los mecanismos que subyacen al envejecimiento.

Tabla 1. Masa y expectativa de vida de diferentes animales.

Organismo	Masa (Kg)	Expectativa máxima de vida (años)
<i>Balaena mysticetus</i> (Ballena boreal)	100,000	Alrededor de 200
<i>Loxodonta africana</i> (Elefante africano)	58,000±200	65.2±2
<i>Hippopotamus amphibius</i> (Hipopótamo)	1,450±300	61
<i>Ursus arctos</i> (Oso Grizly)	200±70	25±3
<i>Mus musculus</i> (Ratón)	19±5	3.5±0.2
<i>Canis lupus</i> (Lobo gris)	50±30	4.5±0.6
<i>Sorex araneus</i> (Musaraña)	45±0.9	3.2±0.3
<i>Homo sapiens</i> (Humanos)	65±10	112
<i>Heterocephalus glaber</i> (Ratopín)	35±10	>31
<i>Chelonoidis nigra</i> (Tortuga galápagos)	417	152

Teoría de los radicales libres

Otra relación que se desprende de aquella entre el tamaño y la longevidad, es que los animales con tasas metabólicas basales más elevadas, tienen una menor longevidad, pues los animales pequeños suelen tener una tasa metabólica más elevada que aquellos de mayor tamaño. Durante la década de los 50s se propuso una posible explicación para la relación entre longevidad y tasa metabólica, a la cual se le denominó teoría del envejecimiento de los radicales libres mitocondriales. El principio de esta teoría es que se producen especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) como resultado del metabolismo mitocondrial, y que estas ROS dañan macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Finalmente, se propuso que este daño se acumula en función del tiempo, lo que provoca el mal funcionamiento de las macromoléculas oxidadas, causando el envejecimiento⁵. A falta de una mejor explicación, esta visión mecanística fue considerada el paradigma durante muchos años. Hoy en día sabemos que no es así, ya que las ROS desempeñan un papel fundamental en la comunicación celular, tanto en el desarrollo embrionario como en procesos fisiológicos normales⁶, y a pesar de que su exceso se relacionan con diferentes patologías asociadas a la edad, la eliminación o sobre expresión de mecanismos antioxidantes, no siempre impacta en la longevidad de los organismos ni reduciendo enfermedades relacionadas con la edad⁷. Más que guiar directamente del proceso de envejecimiento, la acumulación de ROS parece ser una consecuencia de él.

Teorías evolutivas del envejecimiento

Desde la publicación del origen de las especies se ha intentado reconciliar al envejecimiento con un punto de vista evolutivo, pues bajo una perspectiva meramente adaptacionista, el envejecimiento y el deterioro asociado a este que culmina con la muerte de los organismos, son claramente perjudiciales para la supervivencia, así que deberían de ser rápidamente eliminadas por selección natural. Entonces, ¿Cómo existen tantas especies que envejecen?

Acumulación de mutaciones y antagonismo pleiotrópico

La teoría de la acumulación de mutaciones propone que aquellas características de un organismo que se expresan en etapas previas al cese de la reproducción impactan más fuertemente en la adecuación (fitness), que las que se expresan en etapas post reproductivas, pues a estas alturas los organismos ya han transmitido su información genética a la siguiente generación. Esto crea un gradiente en la presión de selección natural que declina con la edad, y el resultado es que aquellas mutaciones perjudiciales en etapas posteriores no son eliminadas por selección natural. Finalmente, la acumulación de mutaciones perjudiciales tras cada generación, produce el fenómeno del envejecimiento⁸. En ocasiones estas mutaciones son neutrales y no confieren ventaja o desventaja evolutiva, pero como resultado de la disminución en la fuerza de selección natural con respecto a la edad, si estos genes favorecen la reproducción en etapas tempranas de la vida, aunque tengan efectos neutrales o perjudiciales en etapas tardías, serán seleccionados a favor. A esta teoría se le conoce como antagonismo pleiotrópico⁹. Muchos genes tienen funciones pleiotrópicas, es decir que afectan funciones diferentes en el organismo; el efecto antagonista se refiere a que un gen puede conferir una ventaja en las primeras etapas de la vida, pero una desventaja en etapas avanzadas, que se puede explicar como una relación costo-beneficio. Algunos de los ejemplos más notables de efectos antagonistas y pleiotrópicos son genes que regulan el ciclo celular, pues la proliferación celular es el evento más importante durante el desarrollo, pero en el envejecimiento la desregulación de genes relacionados con la proliferación es una de las principales causas de cáncer; la producción de ROS durante el desarrollo también es un fenómeno esencial para la señalización y comunicación celular, pero en los organismos viejos, la acumulación de ROS produce daño y alteración en las mitocondrias y macromoléculas. También inducen la senescencia celular, la cual es requerida para una correcta formación de los tejidos en el desarrollo, pero asociada con la inflamación crónica, fibrosis y pérdida de la capacidad de regeneración de los tejidos durante el envejecimiento.

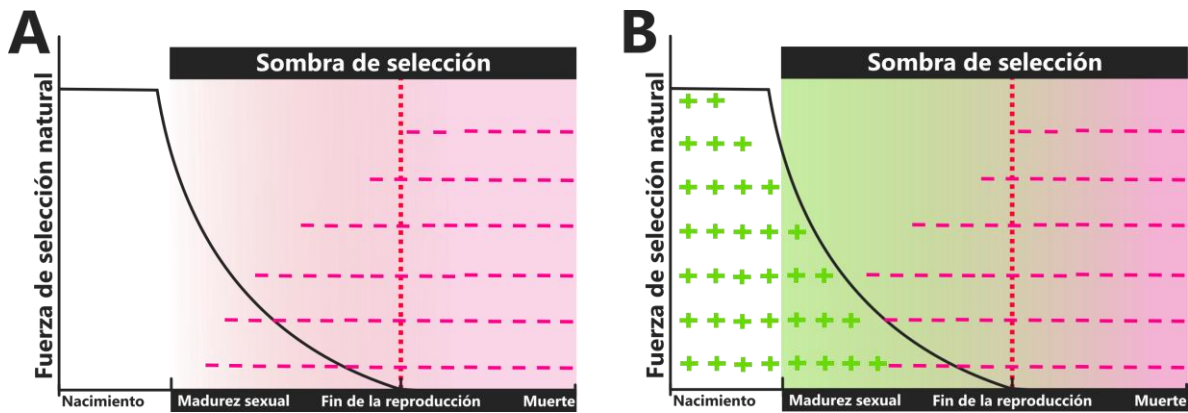


Figura 1. Teoría evolutiva del envejecimiento. (A) La fuerza de selección natural disminuye con el paso del tiempo, ya que las características desfavorables o deletéreas que aparecen durante la etapa adulta, posterior a la madurez sexual, impactan muy poco en la capacidad reproductiva del individuo y no serán seleccionadas en contra. Estas mutaciones desfavorables pasan a la siguiente generación, y su acumulación durante muchas generaciones produce el deterioro asociado al envejecimiento. A esta teoría se le conoce como acumulación de mutaciones. (B) El efecto es mayor si una característica confiere alguna ventaja reproductiva durante etapas tempranas de la vida del organismo, pues la selección natural actuará a favor de su mantenimiento, este fenómeno se conoce como antagonismo pleiotrópico (*Imagen adaptada de Fabian & Flatt, 2011*).

Teoría del soma desechable

Dentro de este mismo contexto de "trade-offs" o costo-beneficio, una de las explicaciones acerca de la diversidad de esperanzas de vida entre especies, es que existe un balance energético continuo entre la reproducción y el mecanismo de reparación y mantenimiento celular. Esta teoría predice que aquellos organismos que invierten más recursos en el esfuerzo reproductivo que en el mantenimiento somático, tendrán una gran cantidad de descendientes en intervalos relativamente cortos. Esto es a costa de un menor tamaño, una expectativa de vida corta y en general del mantenimiento del organismo adulto. En cambio aquellos organismos que inviertan menor energía en la reproducción y más en el mantenimiento celular, sacrificarán esfuerzo en la reproducción, tendrán menor descendencia y en intervalos prolongados. En este caso los individuos serán de mayor tamaño y con una

expectativa de vida mayor¹⁰. Un experimento en *D. melanogaster* demostró que inclusive bajo presiones de selección artificial direccionadas, este efecto es posible¹¹.

Teoría de la historia de vida

Hoy en día, la teoría del soma desechable no es completamente aceptada, sin embargo, sentó las bases para el entendimiento integral del envejecimiento desde un punto de vista evolutivo y no simplemente mecánico o funcional. El envejecimiento y la gran diversidad de expectativas de vida entre especies representan una paradoja, pues se esperaría que, si apareciesen mutaciones que retrasen el envejecimiento, o que incrementen la expectativa de vida en algunos organismos, estas serían seleccionadas positivamente, pues la etapa reproductiva y el fitness incrementaría, y a la larga favorecería fuertemente la aparición de especies sumamente longevas y sin envejecimiento. Sin embargo, esto no es así, existen restricciones genéticas, ambientales y de disponibilidad de recursos que hace imposible o sumamente difícil la aparición de especies así. Entre los seres vivos existen estrategias reproductivas muy contrastantes que no es posible explicar por un único mecanismo evolutivo, como el antagonismo pleiotrópico, la acumulación de mutaciones o la teoría del soma desechable. Por ejemplo, las hembras de salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*) viven durante casi 8 años en el mar, regresan al río donde nacieron, ponen hasta 5,000 huevos y mueren en un proceso de envejecimiento acelerado pocas horas después¹², en contraste, las hembras del tiburón de Groenlandia (*Somniosus microcephalus*), tienen camadas de 10 crías constantemente durante más de 500 años. Para explicar la gran disparidad de estrategias de supervivencia que han evolucionado entre los seres vivos como el tiempo gestación, maduración, el tamaño, la cantidad de crías y eventos reproductivos, la tasa de envejecimiento y la expectativa de vida, en la ecología evolutiva ha surgido un término llamado *historia de vida* y cada uno de estos procesos que contribuyen a la supervivencia de los organismos, se les conoce como *rasgos de historia de vida*. La historia de vida propone que las especies son resultado de presiones evolutivas ejercidas por el medio ambiente y la interacción con otros organismos como el clima, el hábitat, la

disponibilidad de recursos, la depredación, competencia, mutualismo, etc., que moldean los rasgos de historia de vida, y como resultado se maximiza el éxito reproductivo de dicha especie¹³. Además de la reproducción y el mantenimiento somático, como se mencionó anteriormente, existen diversos "Trade offs", entre otros rasgos de historia de vida como la tasa de maduración y la tasa de envejecimiento, el tamaño y la tasa metabólica, etc. Este balance entre rasgos se puede explicar a nivel genético por genes con antagonismo pleiotrópico¹⁴. Como resultado, cada especie ha evolucionado en condiciones muy particulares bajo presiones de selección muy diferentes y con rasgos de historia de vida particulares. La expectativa de vida y el envejecimiento son dos rasgos que contribuyen fuertemente al éxito reproductivo de un organismo, y es por eso que son tan variados entre especies. La depredación es quizá una de las interacciones que moldean los rasgos de historia de vida más estudiada. Se ha demostrado que existe una relación negativa entre la depredación y la expectativa de vida, también es por eso que los organismos en los cuales han evolucionado estrategias para disminuir la depredación, como el vuelo en el caso de las aves o los murciélagos, o el caparazón en las tortugas, tienen una expectativa de vida elevada¹⁵.

Coefficiente de longevidad

La relación entre la expectativa de vida y el envejecimiento es compleja y es resultado de interacciones que juegan papeles diferentes en cada grupo de organismos. Es por eso por lo que la tasa de envejecimiento, la expectativa de vida media y la expectativa máxima de vida y la longevidad por especie son sumamente variables a lo largo de los diferentes grupos de eucariontes.

Debido a esta gran variación, no es posible comparar la expectativa de vida de una especie con otra simplemente midiendo qué tanto viven. Es por lo que se desarrolló una forma normalizada de medir la longevidad relativa de una especie, llamada coeficiente de

longevidad (LQ, por sus siglas en inglés), el cual es el resultado del cociente de la expectativa máxima de vida de una especie, entre la expectativa de vida predicha de acuerdo con la teoría de la tasa de vida (Tabla 2). El resultado es un número entre 0 e ∞ e indica si una especie es más o menos longeva que otras especies relacionadas, de su misma masa y por lo tanto tasa metabólica basal. Debido a que el LQ puede realizarse con información de un número cualquiera de especies relacionadas, si se toma en cuenta suficiente información, puede predecir con gran robustez y precisión la expectativa de vida de la mayoría de las especies. En general, en la naturaleza se pueden observar muchos ejemplos que confirman estas observaciones, especialmente en los vertebrados, y más específicamente en los mamíferos¹⁶ (Figura 3).

Tabla 2. Coeficiente de longevidad.

LQ	Interpretación
<1	La expectativa máxima de vida es menor que la predicha para organismos de su talla.
1	La expectativa máxima de vida es igual a aquella predicha para organismos de su talla.
>1	La expectativa máxima de vida es mayor que aquella predicha para organismos de su talla.

El LQ se calcula a partir de la regresión logarítmica de la función de la masa corporal y la tasa metabólica basal de organismos relacionados evolutivamente¹⁶.

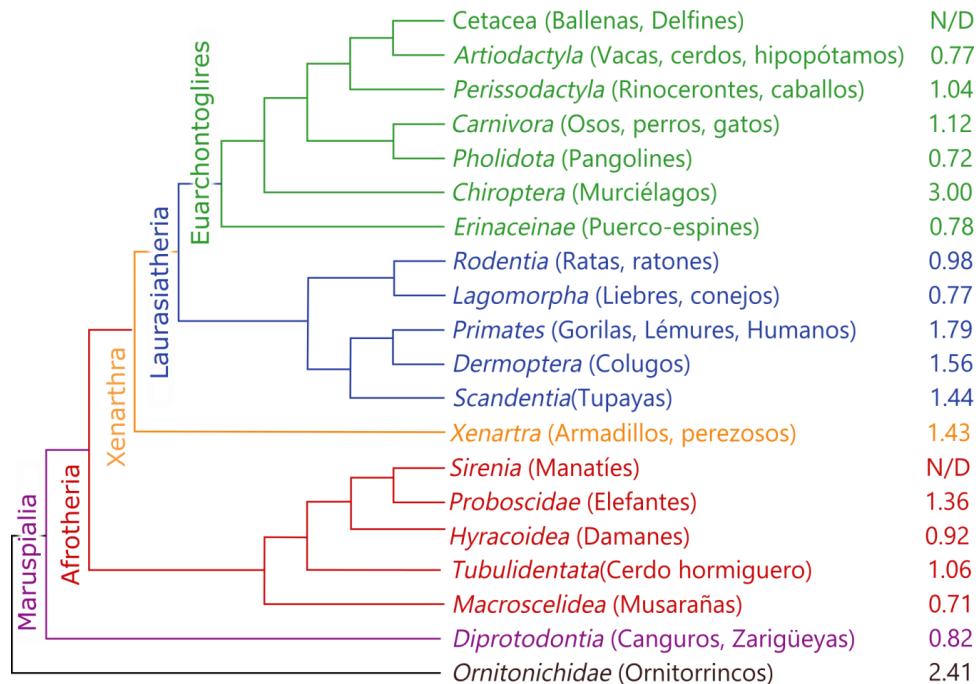


Figura 3. Los índices de longevidad de los órdenes de mamíferos actuales. LQ fue calculado a partir de la expectativa máxima de vida para una especie, en 400 especies de mamíferos en diferentes órdenes, sobre la expectativa máxima de vida predicha de la especie, de acuerdo a la regresión logarítmica lineal de la masa corporal contra la expectativa de vida media de mamíferos no voladores^{16,17}. Los datos del LQ de los órdenes Cetacea y Sirenia no se encuentran disponibles.

Esta regla se cumple en la mayoría de los órdenes de mamíferos vivos, a excepción de los murciélagos, que, como orden animal, tienen el coeficiente de longevidad más alto entre los mamíferos (LQ=3), y los marsupiales, que en contraste tienen el más bajo (LQ=0.71). Esta tendencia no se explica por la tasa metabólica basal, como lo predice la teoría de la tasa de vida, ya que la media de ambos grupos es muy similar. Sin embargo, existen explicaciones evolutivas que se ajustan a la teoría de la historia de vida del envejecimiento, puesto que los murciélagos han evolucionado una serie de costosos mecanismos de supervivencia, a diferencia de los marsupiales, en los cuales, como grupo, se favorece una estrategia inclinada hacia la reproducción. También existen otros ejemplos notables de especies con un LQ mayor a 1, tales como el ser humano (*Homo sapiens*) con un LQ de 2.7 y

la rata topo lampiña (*Heterocephalus glaber*), con un LQ de entre 3 y 10, dependiendo del grupo con el que se le compare¹⁸.

Heterocephalus glaber

La rata topo lampiña (*Heterocephalus glaber*), también llamada ratopín rasurado es un roedor pequeño (33.9 g \pm 4.9 D.E.), miembro de la familia *Bathygeridae*, que incluye otras 30 especies de topos africanos clasificadas en los géneros vivientes *Cryptomys*, *Bathyergus*, *Fukomys*, *Heliophobius*, *Georychus* y *Heterocephalus*. Es endémica del este de África y su hábitat se extiende a lo largo de prácticamente toda Somalia, el sur y centro de Etiopía y el norte de Kenia, restringido principalmente a zonas xéricas con baja precipitación anual (200-400 mm/año). De manera natural, viven en madrigueras subterráneas formadas por complejos de túneles y cámaras de hasta 50 metros de longitud total, lo que permite amortiguar los drásticos cambios de temperatura característicos de climas áridos. Las madrigueras cuentan solamente con una o dos entradas denominadas volcanes, lo que las aísla del medio ambiente exterior, lo cual disminuye la depredación, a la vez que crea condiciones hipóxicas (bajas concentraciones de O₂) e hipercápnicas (altas concentraciones de CO₂). Como resultado de la evolución en dicho hábitat, *H. glaber* tiene una gran cantidad de características morfológicas, fisiológicas y sociales que le han permitido la explotación de este nicho, tales como: pulmones pequeños; hemoglobina con alta afinidad al oxígeno, es capaz de sobrevivir a periodos prolongados de anoxia a expensas de la fosforilación de fructosa a fructosa 1 fosfato por una cetohecoquinasa exclusiva de la especie, que le permite continuar con la glucólisis por periodos de hasta 18 minutos sin oxígeno¹⁹. Tienen una tasa metabólica en reposo menor que otros roedores de su misma masa; 0.70 ml O₂/ g-h en *H. glaber*²⁰ y 0.60 ml O₂/g-h en *M. Musculus*. Adicionalmente, son los únicos mamíferos poiquiloterms conocidos hasta el día de hoy. Su temperatura corporal oscila a lo largo del día entre los 22 y 37 °C, con una media de 32°C sin variaciones a lo largo del año²¹. La principal manera por la cual regulan su temperatura corporal es a través del intercambio de calor con las paredes de la madriguera por conducción térmica. Esto lo logran gracias a una

piel extremadamente delgada y altamente vascularizada con arrugas que reducen la tasa volumen/área, aumentando la superficie de contacto que incrementa la eficiencia del intercambio térmico, poca grasa subcutánea y carencia de pelo, por ende su nombre común; también tienen glándulas sudoríparas, lo cual contribuye en mucho menor cantidad a disipación del calor, ya que como muchos otros roedores de climas áridos, obtienen el agua directamente de los alimentos como plantas suculentas y tubérculos alrededor de las cuales construyen sus madrigueras. Al obtener agua de los alimentos, los niveles de concentración de urea en la orina pueden alcanzar concentraciones sumamente elevadas²².

Otra característica evolutiva que refleja la adaptación a la vida en grupos genéticamente acotados es que son animales eusociales, lo que quiere decir que exhiben un comportamiento que refleja un alto nivel de organización de labores dentro de la colonia, que es en realidad un grupo familiar extendido con generaciones sobrelapadas, y un patrón de reproducción altamente restringido, pues solamente existe una reina, y entre uno y tres machos que son los encargados de la labor reproductiva²³. Los individuos no reproductivos de la colonia desarrollan un comportamiento cooperativo distribuido en diferentes tareas²⁴. La repartición de labores dependerá de la composición poblacional de la colonia, pero en términos generales aquellos de mayor talla se dedican a la defensa, excavación y mantenimiento de la madriguera, mientras que los de menor talla se dedican al cuidado y mantenimiento de las camadas. Esta estrategia de crianza cooperativa permite a la colonia mantener camadas grandes y en corta sucesión una tras de otra²⁵.

Quizá la característica más notable de *H. glaber* es su longevidad, pues puede llegar a vivir hasta 30 años en cautiverio y aparentemente no presenta síntomas de envejecimiento como artritis, sarcopenia, enfermedades neurodegenerativas, y es sumamente resistente al desarrollo de tumores cancerígenos²⁶. También se ha observado que su tasa reproductiva no decae con la edad²⁷, pero aún más importante es el hecho de que no presentar una gran variedad de enfermedades relacionadas con la edad, lo que se traduce en que su mortalidad no aumenta con respecto al tiempo, como en la mayoría de los organismos²⁸. Por este conjunto de características, en la literatura se acepta que no envejece. Con respecto a

mecanismos de mantenimiento celular, *H. Glaber* mantiene altos niveles basales de autofagia, a comparación de otros roedores como el ratón²⁹, además de que se induce de manera más efectiva en condiciones de estrés alimenticio. Esto sugiere que la autofagia es un mecanismo que puede estar jugando un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis celular, la calidad de las proteínas y como consecuencia, su extraordinaria longevidad. Otra característica notable de esta especie es la resistencia al cáncer. *H. glaber*, como otros mamíferos, secreta un glucosaminoglicano de matriz extracelular conocido como hialuronano, pero a diferencia del resto de los mamíferos, el hialuronano de *H. glaber* es cortado en fragmentos de un alto peso molecular. Las células cancerígenas secretan proteínas de matriz extracelular que facilitan su migración a través de diferentes tejidos, principalmente sistema linfático y sanguíneo. Se piensa que el hialuronano de alto peso molecular es menos susceptible a este tipo de proteasas y confiere una protección física que impide la invasión de estas células a tejidos sanos, y que además permite la transducción de señales extracelulares al interactuar con receptores de membrana que activan vías de señalización que detienen el ciclo celular³⁰.

Senescencia celular

Se le conoce como pilares (Hallmarks) del envejecimiento, a aquellas características conservadas evolutivamente que aparecen y contribuyen a los efectos fisiológicos del envejecimiento tales como el daño al DNA, la pérdida de la proteostasis, la inestabilidad genómica y la alteración en la homeostasis tisular entre otros, y cuya intervención clínica parece retrasar algunos efectos del envejecimiento y enfermedades relacionadas a este³¹. Uno de ellos es la senescencia celular. En los años 60 se describió por primera vez que los cultivos primarios de fibroblastos humanos realizan un número limitado divisiones celulares antes de dejar de proliferar, a este fenómeno se le denominó senescencia celular replicativa³². Ahora sabemos que se debe principalmente al acortamiento de los telómeros con cada división, que dispara una respuesta de daño al DNA³³. Además de la detención del ciclo celular, las células senescentes sufren una gran variedad de cambios morfológicos,

fisiológicos y funcionales. En células en cultivo, se puede observar un aplanamiento celular y aumento en la superficie celular. Aparición de gránulos de estrés, y de vesículas. Esta acumulación de vesículas se refleja en un incremento en la función lisosomal. En el núcleo también hay cambios evidentes. Así como en la superficie celular, la superficie nuclear se deforma, junto con el tamaño del nucléolo, la cromatina se reorganiza y se forman focos de heterocromatina. Se ha observado senescencia celular *in vivo*, e *in vitro* en diferentes tipos celulares como hepatocitos, queratinocitos, células endoteliales, linfocitos, etc. Inclusive se han observado características asociadas a senescencia celular en células postmitóticas como neuronas, miocardiocitos y adipocitos³⁴. Las células senescentes tienen una elevada actividad parácrina, que incluye, pero no se limita a la secreción de proteasas de matriz extracelular, citosinas proinflamatorias inducidas por NFκB, proteínas relacionadas con la quimiotaxis, mitógenos y especies reactivas de oxígeno. A este conjunto de moléculas secretadas se le conoce por sus siglas en inglés como SASP ("*senescence-associated secretory phenotype*"), y es mediante éste que los efectos que las células senescentes ejercen son transmitidos de manera parácrina³⁵. Este aumento en la actividad secretora ocurre acompañado de un aumento en la actividad transcripcional general y en particular aquella relacionada con la biogénesis lisosomal³⁶. Este aumento en la biogénesis y actividad lisosomal ha permitido desarrollar técnicas para identificar a las células senescentes, como el ensayo de β Galactosidasa asociada a senescencia (SA-β Gal). Este ensayo consiste en detectar la actividad de la galactosidasa lisosomal a un pH no óptimo para el lisosoma (pH 6)³⁷, de forma que solo se detecta cuando hay una abundante actividad de la galactosidasa. Otra característica de las células senescentes es la acumulación de lipofuscina. La lipofuscina es un agregado de proteínas y lípidos entrecruzados covalentemente en los lisosomas. De manera natural las células producen pequeñas cantidades de lipofuscina que no es degradada ni exocitada. Tras la replicación celular la lipofuscina acumulada se diluye entre las células hijas, esto evita la acumulación. En cambio en las células senescentes, la detención del ciclo celular, acompañada de una elevada transcripción y disminución en la proteostasis, favorece su acumulación.³⁸

Las células que se vuelven senescentes pierden muchas de las funciones que realizaban previamente, mientras que adquieren otras nuevas. Por consiguiente, debe ocurrir una extensa remodelación de la arquitectura de la cromatina. Los focos de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF por sus siglas en inglés) son regiones de heterocromatina transcripcionalmente inactiva que se forman en respuesta a la inducción de senescencia. El proceso por el cual se forman estos focos de heterocromatina aún se desconoce, sin embargo, se sabe que involucra la participación de histonas como la macro H2A, la histona H3.3, la chaperona de histonas HIRA, y la proteína HP1 α ³⁸, así como un incremento en la metilación del DNA y decremento en la expresión de la histona H1⁴¹. La formación de los SAHF coincide con el reclutamiento de pRB hacia el promotor de los genes dependientes de los factores de transcripción E2F⁴². Experimentalmente se ha observado que las células requieren a la pRB para entrar en senescencia y que sin ella se vuelven insensibles a la inducción de senescencia por oncogenes⁴³ o acortamiento de los telómeros⁴⁴. pRB se encuentra mutada o ausente en muchos tipos de cáncer⁴⁵, lo que favorece la incapacidad de la célula para entrar en senescencia celular y evitar la progresión tumoral. Otro evento muy importante para inducir senescencia celular es la activación de la respuesta de daño al DNA (DDR, por sus siglas en inglés). Como ya se mencionó, la senescencia celular fue descrita por primera vez, como un límite replicativo de las células en cultivo, la senescencia celular replicativa, se debe principalmente al acortamiento de telómeros. Diversos estímulos que producen daño al DNA, incluido el acortamiento de telómeros, inducen senescencia celular, acompañada de la respuesta celular de daño al DNA. Durante este evento, una variante de la Histona H2A, la histona H2AX será fosforilada en la serina 139, llamada entonces γ H2AX, por cinasas como ATM o ATR, y reclutada en el sitio del daño al DNA. Este evento de fosforilación es el primer paso para iniciar la reparación del daño al DNA. Una vez reparado el daño, la histona es desfosforilada, por lo que es ampliamente usada como un marcador de inicio de la respuesta de daño al DNA y reparación del DNA⁴⁶. Al igual que con las células senescentes, durante el envejecimiento hay acumulación de células con una respuesta elevada de daño al DNA. De manera paralela, en cultivo, las células senescentes tienen una respuesta permanente de daño al DNA⁴⁷, y aunque aún no está claro si la respuesta de daño al DNA es

una consecuencia de la senescencia celular, o una característica requerida para el mantenimiento del fenotipo⁴⁸, la histona γ H2AX es ampliamente usada como un marcador de senescencia celular.

Control del ciclo celular en las células senescentes

Como ya se mencionó, las células senescentes dejan de proliferar. Esta detención del ciclo celular es esencialmente irreversible, pues las células no responden a estímulos mitóticos u oncogénicos⁴⁹ y depende de la expresión de genes que participan en el paro del ciclo celular como *Cdkn2a* (p16^{Ink4a} y p14^{Arf}/p19^{Arf}), *Cdkn2b* (p15^{Ink4b}) y *Cdkn1a* (p21^{Cip1}). El locus *Ink4* (*Cdkn2a/b*) es un locus está integrado por los genes *Cdkn2a* y *Cdkn2b*, altamente conservado en distintos linajes evolutivos, desde peces hasta mamíferos. En los mamíferos este locus se compone de dos genes muy cercanos uno del otro (*Cdkn2a* y *Cdkn2b*) y tiene un tamaño de menos de 50 kb de longitud. En humanos se localiza en el cromosoma 9:p21.3; dependiendo el organismo y tipo celular, codifica para diversos transcritos involucrados en la regulación del ciclo celular y respuesta a estrés⁵⁰. Unas de las proteínas más estudiadas que se encuentran codificadas en este locus, son p14^{Arf}, p15^{Ink4b} y p16^{Ink4a}. En mamíferos, la transcripción de estos genes es compleja, pues el gen *Cdkn2b* tiene dos exones (E2 y E1) que forman la proteína p15^{Ink4b}, mientras que *Cdkn2a* tiene 4 exones (E1, E1 β , E2 y E3) que pueden codificar para p14^{Arf}, también denominada ARF o p19^{Arf} en ratones, y para p16^{Ink4a}. Esta última es producto del splicing de los exones E1, E2 y E3, mientras que p14^{Arf} se forma a partir del splicing del exón 1 alternativo, (E1 β) y los exones E2 y E3, con lo que se cambia el marco abierto de lectura, resultando en una secuencia diferente. Entre otros productos del locus, menos estudiados se encuentran p16 γ y p12, proteínas que se expresan de manera tejido-específica⁵¹.

Tanto p16^{InkA} como p15^{InkB} actúan impidiendo la formación del complejo CDK4 o CDK6, con la ciclina D o E, mientras que p21^{Cip1} inhibe la acción del complejo formado por CDK2 con la ciclina A o E. En ambos casos, el resultado es la inhibición de la fosforilación de

la proteína del retinoblastoma (pRB), regulador negativo de factores de transcripción de la familia E2F⁵², involucrados en la transcripción de genes asociados a la entrada a la fase S del ciclo celular.

p14^{Arf} es un inhibidor del ciclo celular que interactúa directamente con la ubiquitin-ligasa MDMD2 (murine double minute 2) en ratón o HDM2 (human double minute 2) en humanos, inhibiendo su actividad de ubiquitin ligasa, lo que provoca la estabilización de p53. MDM2/HDM2 es el principal regulador negativo de p53, ya que dependiendo del patrón y grado de fosforilación de p53, puede ubiquitinarla para que sea degradada por el proteasoma o liberarla y permitir la transcripción de sus genes blanco en el núcleo (figura 4). Uno de sus genes blanco es *Cdkn1a*, que codifica para la proteína p21^{Cip1}, y además de su función en la detención del ciclo celular, es mediador de diversas de respuestas celulares relacionadas con la supervivencia y muerte celular en respuesta a estímulos de estrés, tales como inanición, hipoxia, estrés oxidativo, reparación de daño al DNA, establecimiento de la quiescencia y en el mantenimiento de la troncalidad⁵³.

La expresión de estos supresores tumorales es un evento fundamental durante la senescencia celular, pues además de inhibir la proliferación, la sobreexpresión de p16^{Ink4a} o p21^{Cip1} puede llevar a la célula a senescencia, y evitar la expresión de estas proteínas evita que las células se vuelvan senescentes^{54,55}. En particular, la sobreexpresión de p16^{Ink4a} es un fuerte inductor de senescencia celular. Además de su función como inhibidor de CDKs, p16^{Ink4a} se puede asociar al factor de transcripción TFHII en el dominio carboxilo terminal de la RNA polimerasa II, inhibiendo su fosforilación y regulando la transcripción⁵⁶. Ink4 es regulado principalmente de manera transcripcional. Uno de los mecanismos de regulación más estudiados, es la represión transcripcional por el sistema de regulación epigenética polycomb. BML-1 es una proteína que recluta al complejo represor polycomb-2 (PRC-2) a través de su interacción con la metil-transferasa de histonas EZH2, que forma parte de PRC2 hacia las marcas de Histona 3 trimetilada en la lisina 27 (H3K27me3), reprimiendo la expresión de los transcritos del gen *Ink4a*. En las células senescentes los niveles de EZH2 disminuyen, lo que evita el silenciamiento del gen^{57,58}.

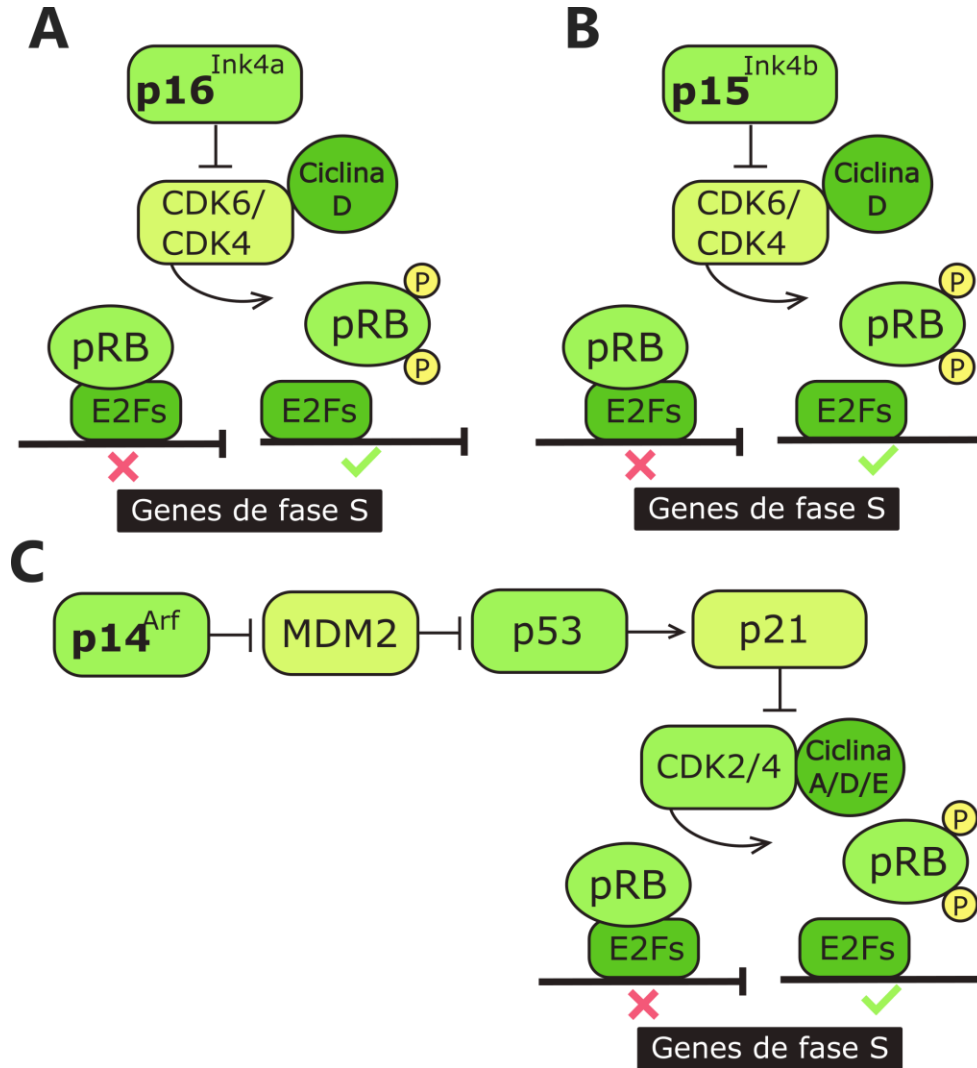


Figura 4. Regulación del ciclo celular en células senescentes. Los supresores tumorales p16^{Ink4b} (A) y p15^{Ink4a} (B) impiden la formación del complejo CDK4 o CDK6 con la ciclina D. Esto evita que el complejo fosforile a sus blancos, como la proteína del retinoblastoma (pRB). pRB en un estado hipofosforilado mantiene secuestrados e inactivos a diversos factores de transcripción de la familia de E2F, involucrados en la transcripción de genes relacionados con la entrada a la fase S del ciclo celular. p14^{Arf}, otro supresor tumoral, inhibe a la ubiquitin ligasa E3 HDM2/MDM2, el principal regulador negativo de p53. Esta inhibición estabiliza a p53, lo que favorece la transcripción de sus genes blanco, como *Cdkn1a* (p21^{Cip1}), el cual actúa de manera similar a p16^{Ink4b} y p15^{Ink4a}, inhibiendo la formación del complejo CDK2 o CDK4 con la ciclina A, D o E. Esto mantiene a pRB en un estado hipofosforilado, inhibiendo la acción de los factores de transcripción de la familia de factores E2F y deteniendo la progresión del ciclo celular.

Características de la senescencia celular

Cambios en el citoplasma

- 1 Aumento en el tamaño celular (hipertrofia celular).
- 2 Aumento en la masa y actividad lisosomal.
- 3 Aparición de gránulos de estrés.
- 4 Acumulación de lipofuscina.

Cambios en el núcleo

- 5 Aumento en el tamaño nuclear (hipertrofia nuclear)
- 6 Aumento en el tamaño nucleolar.
- 7 Incremento en la expresión de inhibidores del ciclo celular (p16^{Ink4a}, p21^{Cip1}).
- 8 Formación de focos de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF, por sus siglas en inglés).
- 9 Defromación de la superficie nuclear.

Cambios en la actividad

- 10 Aparición del fenotipo secretorio asociado a senescencia (SASP, por sus siglas en inglés) que incluye quimiocinas, citocinas, factores de crecimiento y metaloproteasas.
- 11 Resistencia a mitógenos.
- 12 Resistencia a la apoptosis

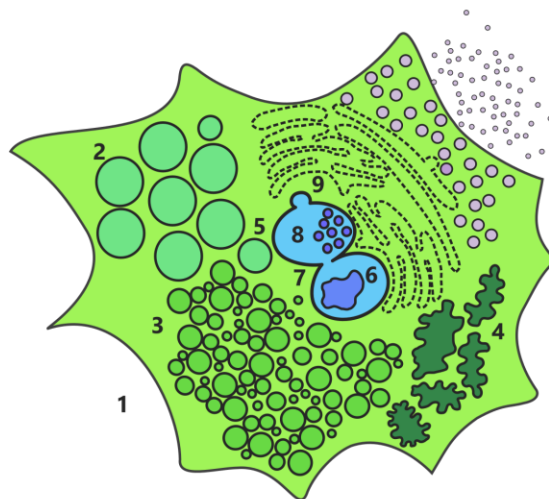


Figura 5. Características de la senescencia celular. Algunas de las características más evidentes de las células senescentes detectables *in vitro* son el detenimiento del ciclo celular, acompañado de un incremento de tamaño tanto en el citoplasma como en el núcleo. También es evidente el aumento en el tamaño nucleolar y la aparición del SAHF. Algunas características que se usan comúnmente como marcadores de senescencia celular tanto *in vitro* como *in vivo*, son el incremento en la masa y actividad lisosomal (SA-β Gal), la acumulación de lipofuscina, secreción del SASP i.e. I-L6, I-L8, MCP-2, IFN γ , EGF, TGF β , el incremento en la expresión de inhibidores del ciclo celular (p16^{Ink4a}, p21^{Cip1})⁴⁹.

Papel fisiológico de la senescencia celular

La senescencia celular ocurre como respuesta a diversos estímulos fisiológicos y de estrés, principalmente aquellos que generan una respuesta de daño al DNA, como la atrición de telómeros o la expresión de oncogenes⁴⁹, este último, es uno de los principales mecanismos por los cuales las células evitan la formación de tumores y la progresión del cáncer. Además

de su función antitumoral, las células senescentes participan en otros procesos, tales como el desarrollo embrionario y la cicatrización. Existen poblaciones de células senescentes que surgen de manera programada en nichos específicos durante el desarrollo, como el mesonefros, el canal auditivo, los interdígitos, el lecho ungueal, los arcos branquiales, el tubo neural y el cerebro⁵⁹ y en los vasos sanguíneos, donde promueven la angiogénesis⁶⁰. A este tipo de senescencia celular, se le denominó senescencia celular programada. La pérdida de la senescencia celular programada durante el desarrollo provoca malformaciones durante el desarrollo de dichas estructuras, sugiriendo que cumplen un papel importante para el desarrollo de órganos y para la formación de una arquitectura tisular adecuada. Por otro lado en animales adultos, aparecen células senescentes en respuesta a heridas cutáneas, que a través del SASP participan en diferentes procesos importantes para la cicatrización como son la fibrosis, a través de la secreción de factores de crecimiento como TGF- β ; la inflamación, a través de citocinas proinflamatorias como interleucina 6 y 8 (IL-6 e IL-8); el reclutamiento de células del sistema inmune, con proteínas quimio atrayentes de macrófagos como las MCPs; y la remoción de células muertas o dañadas, gracias a la secreción de proteasas de matriz extracelular. La prevención de la aparición de estas células senescentes retrasa la cicatrización⁶¹, lo que demuestra su importancia en este proceso. En ambos casos (ya sea como remodeladoras durante el desarrollo y en la cicatrización), las células senescentes son transitorias, pues una vez formado el tejido embrionario o regenerada la herida, fagocitadas por los macrófagos, lo que permite la repoblación del tejido por células en proliferación. En contraste, durante el envejecimiento, existe una acumulación de células senescentes que no ocurre en la juventud. Este fenómeno es particularmente conspicuo en los condrocitos, adipocitos, células endoteliales y de músculo liso⁶². Aún no se sabe con certeza si esta acumulación es debida a que las células senescen con mayor facilidad o si son removidas con menor eficiencia por el sistema inmune. Lo que sí se ha demostrado de manera muy clara, es que la eliminación de las células senescentes tanto en ratones con progeria, como en ratones silvestres, retrasa el deterioro asociado con la edad, a través de la reducción de condiciones como las cataratas, la sarcopenia, la adiposis y la neurodegeneración a la vez que aumenta la expectativa de vida^{63,64}. Estos experimentos demuestran que las células senescentes

contribuyen al deterioro relacionado con el envejecimiento, pues afecta la homeostasis de los tejidos. En resumen, la acumulación de células senescentes durante el envejecimiento, deriva en la pérdida paulatina de la función fisiológica del organismos través la alteración de nichos troncales, inflamación crónica, fibrosis, y degradación de la matriz extracelular⁶⁵. El efecto es aún más perjudicial si se alteran nichos de células troncales o tejido rico en células postmitóticas, como tejido nervioso o muscular.

Desde un punto de vista evolutivo, el papel que desempeñan las células senescentes durante el desarrollo embrionario, en la cicatrización, y como un mecanismo antitumoral, en contraste con su papel relacionado con el envejecimiento, dejan claro que se trata de un ejemplo de antagonismo pleiotrópico⁶⁶.

Quiescencia celular

La senescencia celular no es el único fenotipo no proliferativo que pueden adquirir las células en respuesta a estrés. En contraste con la senescencia celular, la quiescencia celular cuando las células se encuentran en inanición o confluencia, un fenómeno conocido como inhibición por contacto o bajo programas de expresión altamente regulados como en las células troncales. Este cese proliferativo se reanuda cuando se pierde la inhibición por contacto, se restituye la falta de nutrientes o en respuesta a factores mitóticos.

En trabajos previos se ha demostrado que existen muchos paralelismos entre las células quiescentes y senescentes, por lo que es fundamental caracterizar adecuadamente el fenotipo. Por ejemplo, en las células quiescentes en inhibición por contacto puede incrementar la actividad de SA- β Gal⁶⁷, uno de los ensayos más usados para la identificación de células senescentes. Al igual que en las células senescentes, la detención del ciclo celular en células quiescentes involucra la participación de inhibidores de CDKs como p53 pero principalmente p27^{Kip1}, que no es frecuente en senescencia. La senescencia celular ocurre principalmente en respuesta a estrés con el cual la célula debe contender de manera inmediata, por lo que la detención del ciclo celular puede ocurrir en cualquiera de las fases

del ciclo celular. Una consecuencia de esto es que las células senescentes se pueden encontrar en fase G₁, G₂ e inclusive en fase M, en contraste, la detención de la proliferación en las células quiescentes es altamente regulada y sucede exclusivamente en la fase G₁ o G₂, manteniendo a las células en un estado comúnmente llamado G₀ que es en un estadio de reposo, en el cual la célula no se prepara para dividirse ni crecer, el crecimiento y la cariocinesis se detienen y la transcripción se reduce. En las células senescentes la cariocinesis en ocasiones continúa, es por eso que se llegan a observar células con múltiples núcleos⁶⁸.

Quizá una de las características moleculares más importantes y que desempeña un papel central determinando el panorama metabólico de las células quiescentes y senescentes es la actividad de la cinasa mTOR. En las células quiescentes, la actividad de mTOR es inhibida a través de la inhibición de AKT, lo que favorece un cese en el crecimiento, y un cambio general en la transcripción, pues mTOR regula factores de transcripción involucrados en respuestas de estrés tales como NRF2, HIF-1 α , FOXO, PPAR^{69,70}. La reducción en la actividad de mTOR también se asocia con un incremento en la autofagia, pues mTOR regula de manera negativa a Beclin1⁷¹, una proteína que involucrada en el inicio de la autofagia. Se ha observado que si la activación de p53 es parcial, o la inhibición de mTOR no es completa, en respuesta a estímulos de inhibición por contacto o inanición la células en vez de volverse quiescentes, se vuelven senescentes⁷². El papel que mTOR desempeña decidiendo el destino de la célula (ya sea quiescencia o senescencia) es fundamental, pues cuando las células quiescentes sufren una activación de mTOR, se vuelven senescentes. A este proceso se le denomina geroconversión⁷³. Más allá de mTOR se han identificado otras proteínas involucrada en la prevención de la geroconversión, como HES1. Esta proteína es un represor transcripcional que se expresa principalmente en precursores neuronales, células troncales y células quiescentes, y actúa reclutando desacetilasas de histonas al DNA⁷⁴. En un trabajo reciente, se demostró que HES1 previene la geroconversión asociada a daño al DNA, a la sobreexpresión de inhibidores del ciclo celular y es requerido para reanudar la proliferación de células quiescentes, tras una detención prolongada del ciclo celular⁷⁵. De la misma manera, otra proteína importante involucrada en el mantenimiento de la quiescencia es el

inhibidor de CDKs $p27^{Kip1}$. Durante la progresión del ciclo celular, esta proteína se une a los complejos CDK2/ciclina E, CDK2/ciclina A, CDK / ciclina A, CDK1/ciclina B y CDK4 o 6/ ciclina D o E. Una vez unida, evita la fosforilación de pRB, lo que mantiene inactivos a los factores de transcripción de la familia E2F e impide la progresión del ciclo celular de la misma manera que otros inhibidores de CDKs. La interacción de $p27^{Kip1}$ con los complejos CDK4/6 con ciclina D/E es interrumpida por $p15^{Ink4b}$ y $p16^{Ink4a}$, que toman su lugar y facilitan la degradación de $p27^{Kip1}$ por vía proteasomal, favoreciendo la senescencia celular y geroconversión⁷⁶.

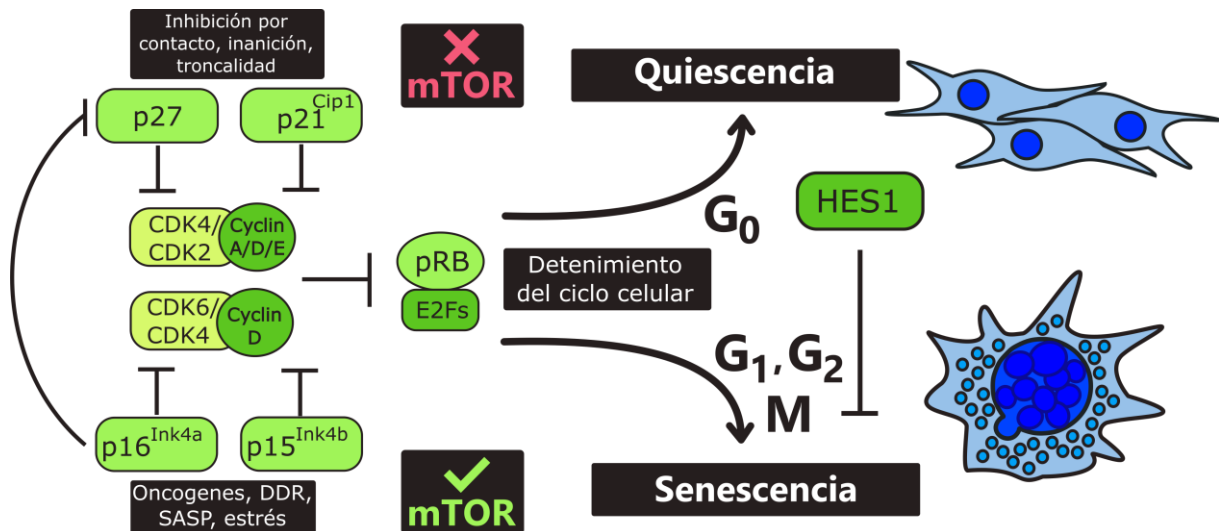


Figura 6. Determinación de senescencia celular o quiescencia. Una característica común de las células quiescentes y senescentes es el cese de la proliferación, mediado por los inhibidores de CDKs. $p21^{Cip1}$, $p15^{Ink4b}$ y $p16^{Ink4a}$ participan en la inhibición del ciclo celular en las células senescentes, mientras que en las células quiescentes hay participan otros inhibidores de CDKs como $p27^{Kip1}$. Estos inhibidores impiden la fosforilación de pRB y la liberación subsecuente de los factores de transcripción de la familia E2F, impidiendo la progresión del ciclo celular. El inhibidor de CDKs, $p27^{Kip1}$ inhibe todos los complejos CDK/ciclina, pero a su vez, puede ser desplazado por $p15^{Ink4b}$ o $p16^{Ink4a}$. La inhibición de mTOR es importante para el mantenimiento de la quiescencia, pues su inhibición favorece una reducción en la síntesis de proteínas, de manera opuesta, la activación de mTOR se asocia con la senescencia celular y geroconversión, pues favorece el incremento en el tamaño celular y una reducción en la autofagia. Adicionalmente el represor transcripcional HES1 participa activamente manteniendo a las células en un estado quiescente y evitando la geroconversión.

Ciclo celular en *Heterocephalus glaber*

Gran parte del control del ciclo celular en *H. Glaber*, como en la mayoría de los vertebrados, se encuentra regulado por el locus *Ink4*. Entre los mamíferos, este locus se encuentra altamente conservado al igual que las diferentes proteínas que se expresan a partir de él. Sin embargo, el gen *Cdkn2a* de *H. glaber* tiene 2 codones de paro tempranos en el exón 2, que resultan en la traducción de una forma más corta de tanto de la proteína p16^{Ink4a} como de p14^{Arf} en comparación con sus homólogas en ratón^{77,78}. Es interesante recalcar que a pesar de que las proteínas son más cortas a comparación las de otros mamíferos como ratas, ratones e inclusive humanos, participan activamente en la regulación el ciclo celular de manera equivalente. En experimentos *in vitro* con fibroblastos de *H. glaber*, se demostró que existe una relación directa entre la expresión de ambas y el pasaje celular, que se expresan en respuesta al daño al DNA y que su expresión es suficiente para provocar un paro del ciclo celular en fase G₁ o G₂⁷⁸, de manera similar a lo que ocurre durante la senescencia celular en otros mamíferos. La senescencia celular programada también ocurre en *H. glaber*. Durante el desarrollo, al igual que en otros mamíferos, existen nichos donde se acumulan de manera transitoria células senescentes, como es el caso del lecho ungueal y los folículos pilosos. Paralelamente, se demostró que *in vitro*, los fibroblastos se vuelven senescentes ante estímulos inductores de senescencia muy bien caracterizados como son el daño al DNA por radiación-γ y la sobreexpresión de oncogenes. Cabe destacar que a pesar de que los fibroblastos de *H. glaber* pueden volverse senescentes, son más resistentes ante estos estímulos que fibroblastos de otras especies de roedores, como el ratón⁷⁹. Y que no se ha observado la acumulación de células senescentes durante el envejecimiento, como sucede en prácticamente todos los mamíferos.

H. glaber tiene un punto de control adicional único de su especie, una variante de transcripción extra del locus *Ink4*, denominado pALT^{Ink4a/b}. Este RNA mensajero se produce por el trans splicing del exón 1 de *Cdkn2b*, con el exón 2 y 3 de *Cdkn2a* (figura 5). Se identificó que pALT^{Ink4a/b} participa en la respuesta de inhibición por contacto temprana. También se observó que su sobreexpresión provoca la detención del ciclo celular, y que es

necesario para la supervivencia celular en respuesta al daño al DNA⁸⁰. Debido a que las células en inhibición por contacto se encuentran en quiescencia, y el daño al DNA es uno de los principales inductores de senescencia celular, esta evidencia sugiere que pALT^{Ink4a/b} tiene un papel importante determinando el destino celular, y probablemente evita la geroconversión de las células favoreciendo que se mantengan en quiescencia, lo cual nos permite proponer que la expresión de esta isoforma en *H. glaber* previene la acumulación de las células senescentes durante el envejecimiento.

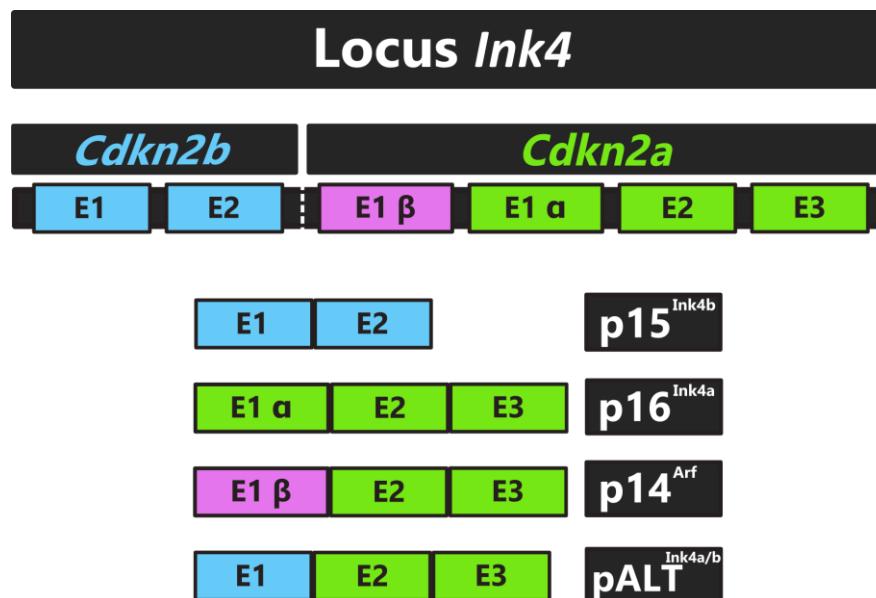


Figura 7. Locus *Ink4*. El locus *Ink4* contiene a los genes *Cdkn2b* y *Cdkn2a*. *Cdkn2b* tiene 2 exones, que codifican para la proteína p15^{Ink4b}. *Cdkn2a* contiene 4 exones, que codifican para las proteínas p16^{Ink4a} (exón 1α, exón 2 y exón 3), p14^{Arf} (exón 1β, exón 2 y exón 3) que resultan en una proteína con un marco de lectura distinto a p16^{Ink4a}. *Heterocephalus glaber* es el único organismo en el cual se produce una variante alternativa de transcripción formada por el exón 1 de *Cdkn2b* y los exones 2 y 3 de *Cdkn2a*, llamada pALT^{Ink4a/b}.

JUSTIFICACIÓN

Heterocephalus glaber es un mamífero sumamente longevo que no presenta deterioro asociado al envejecimiento. En la literatura no existen reportes de que ocurra la acumulación

de células senescentes durante el envejecimiento como en otros mamíferos. Una característica molecular única de *H. glaber* es que expresa la variante de mRNA pALT^{Ink4a/b}, que, en conjunto con otros inhibidores del ciclo celular, participa para lograr una regulación del ciclo celular que podría favorecer el estado quiescente y evitar la geroconversión. Estudiar el mecanismo molecular por el cual las células de *H. glaber* son más resistentes a adquirir el fenotipo senescente a diferencia de lo que ocurre en células de animales como el ratón, que envejece y padece enfermedades relacionadas con la edad como el ser humano, permitirá proponer blancos terapéuticos para aminorar los padecimientos asociados a la acumulación de células senescentes.

HIPÓTESIS

La expresión de la variante de mRNA pALT^{Ink4a/b} previene el establecimiento de la senescencia celular, manteniendo a las células en un estado quiescente.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la expresión heteróloga de pALT^{Ink4a/b} de *H. glaber* disminuye el establecimiento de la senescencia celular inducida por daño al DNA en fibroblastos de ratón (*Mus musculus*), manteniendo a las células en quiescencia.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer un modelo de senescencia celular por daño al DNA en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, por sus siglas en inglés). Se eligió este tipo celular porque son capaces de volverse senescentes, por una variedad de estímulos.

Metas específicas:

- Encontrar la dosis subletal de etopósido que potencialmente induzca senescencia celular. Se eligió etopósido porque es un alcaloide que produce lesiones en el DNA, consideradas un estímulo de senescencia celular.
- Determinar la senescencia celular evaluando el paro de la proliferación, la expresión de inhibidores del ciclo celular como p16^{Ink4a} y p21^{Cip1}, incremento en la actividad de SA-β Gal, acumulación de lipofuscina, mantenimiento de la respuesta de daño al DNA detectando a histona γH2AX y como componente del SASP detectar IL-6.

2. Analizar si la expresión heteróloga de pALT^{Ink4a/b} en MEFs reduce el establecimiento de la senescencia celular inducida por daño al DNA.

Metas específicas:

- Reconstruir mediante análisis bioinformático la secuencia de pALT^{Ink4a/b} a partir de las secuencias reportadas por Tian et al., 2014.
- Clonar pALT^{Ink4a/b} en un vector de expresión en células de mamífero, agregando una etiqueta para detectar la producción de la proteína predicha.
- Determinar si la expresión de pALT^{Ink4a/b} en MEFs evita la geroconversión:
 - A) Determinar si se mantienen las células en quiescencia, midiendo la expresión de HES1.
 - B) Comparar el establecimiento de la senescencia en MEFs que expresen o no la variante pALT^{Ink4a/b}, evaluando el paro de la proliferación celular al contar el número de duplicaciones celulares y determinar la expresión de inhibidores del ciclo celular p16^{Ink4a} y p21^{Cip1}; el incremento en la actividad de SA-β Gal; la acumulación de lipofuscina, el mantenimiento de la respuesta de daño al DNA con histona γH2AX; y el componente del SASP IL-6.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)

1. Descongelar MEFs en pase 2 almacenados a -195°C en nitrógeno líquido en baño maría por 2 minutos.
2. Resuspender inmediatamente en medio de cultivo DMEM Glutamax® (No cat. 10566-016) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina).
3. Centrifugar 0.4 r.c.f. por 5 minutos para formar un pellet.
4. Resuspender el pellet en medio de cultivo DMEM Glutamax® (No cat. 10566-016) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina).
5. Resembrar las células a una densidad de 6,570 MEFs/cm².
6. Incubar a 37°C con 5% CO₂ y una humedad relativa de 98%.

Nota:

- Para ensayo de SA- β Gal, inmunofluorescencia o tinción de Sudán Black B: Sembrar sobre cubreobjetos estériles en cajas de 12 pozos.
- Para In cell western blot: Sembrar en cajas de 96 pozos.
- Para Western Blot: Sembrar en cajas Petri de 60 mm.

Ensayo de β -galactosidasa asociada a senescencia

Día 1

1. Retirar el medio de fibroblastos cultivados sobre cubreobjetos estériles.
2. Lavar las células con PBS 1x dos veces.
3. Fijar 5min a temperatura ambiente con solución de fijación para SA- β Gal (formaldehído 2% + glutaraldehído 0.2% en PBS.)

4. Retirar la solución de fijación y lavar las células con PBS 1X dos veces.
5. Agregar la solución de tinción (1 ml por pozo).
6. Incubar de 16 h a 37°C.

Día 2

1. Eliminar la solución de tinción de los pozos.
2. Lavar las células con PBS 1x dos veces.
3. Lavar 1 vez con 500 µl de metanol y dejar secar al aire libre.
4. Teñir con 500 µl de DAPI (1 mg/ml) durante 2 min.
5. Remover el DAPI, lavar con PBS 1x 2 veces, por 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Observar en microscopio. El X-Gal adquiere una coloración azul intensa observable en microscopia de campo claro.

*Solución de tinción SA-β Gal

Reactivo	Concentración
20 mg/ml X-gal*, disuelto en dimetilformamida	1 mg/ml
Buffer de fosfato de sodio / ácido cítrico pH 6	
63.1% Fosfato de sodio 0.2M	40 mM
36.85% Ácido cítrico 0.1M	
Ferrocianuro de potasio 100 mM	5 mM
Ferricianuro de potasio 100 mM	5 mM
Cloruro de sodio 5M	150 mM
Cloruro de magnesio 1M	2 mM
Agua	De acuerdo al volumen

requerido

*Almacenar la solución X-gal a -20 °C. El buffer y las sales pueden ser preparadas varios días o semanas antes de tiempo. Sin embargo, X-gal no es estable en solución acuosa, así que adicionarlo el día del ensayo, no antes.

Tinción de Sudán Black B

1. Retirar el medio de fibroblastos cultivados sobre cubreobjetos estériles.
2. Lavar con PBS 1x 3 veces.
3. Fijar las células con PFA 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Retirar el PFA y lavar con PBS 1x 3 veces.
5. Incubar el cubreobjetos en etanol al 70% por 2 minutos.
6. Colocar el cubreobjetos sobre una gota de solución de tinción de Sudán Black B de Sigma Aldrich (No. Cat. 199664-25G) durante 10 segundos.
7. Lavar el cubreobjetos en etanol al 50% por 2 minutos.
8. Lavar el cubreobjetos en agua destilada por 1 minuto
9. Teñir con 500 µl de DAPI (1 mg/ml) durante 2 min.
10. Lavar con PBS 1x 2 veces por 10 minutos a temperatura ambiente.
11. Montar el cubreobjetos con una gota de Fluoromont G® (No. Cat. 00-4958-02) e incubar en oscuridad por 2 horas.
12. Observar en microscopio. La lipofuscina adquiere una coloración negra, observable en microscopía de campo claro.

Solución de tinción de Sudán Black B

Reactivo	Concentración
Sudán Black B*	0.07g
Etanol al 70%	10 ml

*Disolver el Sudán Black B, al menos con 18 horas de anticipación, en un recipiente hermético. Una vez disuelto, filtrar con papel filtro Whattman y almacenar a temperatura ambiente.

Inmunofluorescencia

Día 1

1. Retirar el medio de fibroblastos cultivados sobre cubreobjetos estériles en cajas de 12 pozos
2. Lavar con PBS 1x, 3 veces
3. Fijar las células con PFA 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Retirar el PFA y lavar con PBS 1x 3 veces.
5. Permeabilizar con PBS 1x/Tritón 0.5% por 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Lavar con PBS 1x 3 veces.
7. Bloquear durante 30 minutos con PBS 1x BSA 5%.
8. Incubar con 130 µl de anticuerpo primario diluido en PBS 1x BSA 2% a 4° C por 24 horas en cámara húmeda.

Día 2

1. Lavar con PBS 1x 3 veces por 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Incubar con 130 µl de anticuerpo secundario Alexa Fluor® diluido en PBS 1x BSA 2% a 4° C por 1 hora.
3. Lavar con 130 µl de PBS 1x 3 veces por 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Teñir con 500 µl de DAPI (1 mg/ml) durante 2 min.
5. Lavar con PBS 1x 2 veces por 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Montar el cubreobjetos con una gota de Fluoromont G® (No. Cat. 00-4958-02) e incubar en oscuridad por 2 horas.
7. Observar en microscopía de fluorescencia.

Nota: Después de agregar el anticuerpo secundario, se deben mantener a las células en oscuridad.

In cell western blot

1. Retirar el medio de fibroblastos cultivados en cajas de 96 pozos.
2. Lavar con PBS 1x, 3 veces
3. Fijar las células con PFA 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Retirar el PFA y lavar con PBS 1x 3 veces.
5. Permeabilizar con PBS 1x/Tritón 0.1% por 5 minutos a temperatura ambiente 5 veces en agitación.
6. Lavar con PBS 1x 3 veces.
7. Bloquear durante 90 minutos con PBS 1x BSA 5%.
8. Incubar con 25µl de anticuerpo primario diluido en PBS 1x BSA 2% a 4° C por 24 horas

Día 2

1. Lavar con PBS 1x 3 veces por 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Incubar con 25 µl de anticuerpo secundario IRDye® diluido en PBS 1x BSA 2% a 4° C por 1 hora. Se debe adicionar 1 µl de InCellTag™ (No Cat. 926-4109) por pozo, junto con el anticuerpo secundario.
3. Lavar con 130 µl de PBS 1x 3 veces por 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Revelar en foto documentador Odyssey CLX® a una λ de 700 u 800 nm.
5. Realizar la densitometría con el software ImageStudioLite®.

Nota: Después de agregar el anticuerpo secundario, se deben mantener a las células en oscuridad.

Western Blot

Preparación de las muestras:

1. Retirar el medio de fibroblastos cultivados en cajas 60 mm.
2. Lavar con PBS 1x, 3 veces.
3. Incubar las células en 1.5 ml de tripsina-EDTA 10% durante 5 minutos a 37°C.
4. Recuperar las células en 3.5 ml de medio de PBS estéril.
5. Centrifugar a 0.4 r.c.f. por 5 minutos, para formar un pellet.
6. Re suspender el pellet en Buffer de lisis suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas al 10%.
7. Incubar a 4°C por 30 minutos.
8. Sonicar las células y centrifugar a 20 r.c.f. por 10 min a 4°C. Recuperar el sobrenadante.
9. Desnaturalizar las proteínas, incubando en Buffer de carga 5x a 95°C por 5 minutos.

Día 1

1. Cargar 30 a 40 µg de proteína en un gel SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes.
2. Correr durante 120 minutos aproximadamente, a un voltaje constante de 130 V.
3. Electrotransferir a una membrana de polifluoruro de vinileno (PVDF) Immobilion®-FVL (No. Cat. 05317-10EA) previamente reactivada en Metanol durante 5 minutos, por 1 hora a un amperaje constante de 400 miliamperes.
4. Incubar la membrana en TBS t, 5% Reactivo de bloqueo Bio-RAD No. Cat. 1706404 durante 1 hora en agitación.
5. Lavar 3 veces con TBS t.
6. Incubar en 2 ml. de anticuerpo primario diluido en TBS t, 5% BSA durante 18 a 24 horas a 4°C en agitación.

Día 2

1. Lavar con TBS t 3 veces por 5 minutos a temperatura ambiente.

2. Incubar en 2 ml de anticuerpo secundario IRDye® diluido en TBS t, 5% BSA, 0.02% SDS durante 1 hora a 4°C en agitación.
3. Lavar con TBS t 3 veces por 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Revelar en foto documentador Odyssey CLX® a una λ de 700 u 800 nm.
5. Realizar la densitometría se realizó en el software ImageStudioLite®.

Nota: Después de agregar el anticuerpo secundario, se debe mantener la membrana en oscuridad.

Buffer de Lisis	
Reactivo	Concentración
HEPES	25 mM
Acetato de potasio	125 mM
Acetato de magnesio	2.5 mM
EGTA	0.5%
NP-40	1 mM
Agua mili Q	Ajustar al volumen requerido

TBS t 1x	
Reactivo	Concentración
Tris Base	0.02M
NaCl	.15 M
Tween	0.1 %
Agua Mili Q	Ajustar al volumen requerido

Buffer de carga	
Reactivo	Concentración
Tris HCL	250 mM
SDS	10%
Glicerol	30%
DTT	0.05%
Azul de bromofenol	0.1%
2-Mercaptoetanol*	5%
Agua mili Q	Ajustar al volumen requerido

*Agregar el 2-Inmediatamente antes de la incubación de 95°C

Especificaciones de los anticuerpos

Anticuerpos primarios				
Anticuerpo	Especie	Dilución usada	Marca	No. Cat.
Anti-HES 1	Conejo	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-25392
Anti-p16	Ratón	1:1,000	ABCAM	ab211542)
Anti-p21	Conejo	1:1,000	ABCAM	ab52915
Anti- γ H2AX	Ratón	1:200	ABCAM	ab81299
Anti-FLAG	Ratón	1;1000	Sigma-Aldrich	F-1804
Anticuerpos secundarios				
Anticuerpo		Dilución usada	Marca	No. Cat.
IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG		1:10,000-15,000	Li-Cor	925-32210
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG		1:10,000-15,000	Li-Cor	925-32211
Alexa Fluor® 488 Goat anti-Rabbit IgG		1:1,000	Thermo Fisher	A11034

Purificación de plásmidos

Día 1

1. Incubar 200 μ l de bacterias quimio-competentes con 10 ng del plásmido a purificar por 30 minutos en hielo.
2. Incubar por 45 segundos a 42°C.
3. Transferir a 800 μ l de medio S.O.C. de ThermoFisher® (No. Cat. 15544034), previamente atemperado a 37 °C.
4. Incubar a 37°C durante 45 minutos en agitación vigorosa.
1. Platear el cultivo en una caja Petri de 10 cm con Agar LB suplementado con el antibiótico de selección (0.1 mg/ml), hasta que se evapore todo el líquido.

5. Incubar a 37 °C por 16 horas.

Día 2

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

Día 3

1. Purificar plásmido con el kit de purificación de plásmidos "Plasmid Plus Maxi Kit M" (No. Cat. 12965) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
2. Resuspender el DNA en agua Mili Q estéril.

Agar LB	
Reactivo	Concentración
Polvo de Agar BioRad (No. Cat. 1660472EDU)*	3.5%
Agua Destilada	Ajustar al volumen requerido

*Esterilizar en autoclave inmediatamente después de agregar el Agar

Medio LB líquido	
Reactivo	Concentración
Polvo de medio LB Fisher (No. Cat BP 1426-2)	2%
Agua Destilada	Ajustar al volumen requerido

*Esterilizar en autoclave inmediatamente después de agregar el medio LB

Electroforesis de DNA

1. Preparar un gel de agarosa al 1% con 0.01% de Sybr Green.
2. Incubar 100 ng de DNA purificado, resuspendido en agua mili Q en Buffer de carga para DNA en una proporción 1 a 1.
3. Cargar un volumen máximo de 20 µl de muestra por pozo.
4. Correr a un voltaje constante de 50 mV durante 20 minutos aproximadamente.
5. Observar el DNA a una λ de 365 nm.

Digestión enzimática

1. Preparar la reacción de digestión de 1 µg de plásmido con las enzimas de restricción y el buffer de restricción 1x apropiado, de acuerdo a las instrucciones del fabricante en un volumen final de 10 µl de agua Mili Q Estéril.
2. Incubar a 37°C por 1 hora.
3. Realizar electroforesis de DNA con las muestras digeridas.

Enzimas de restricción				
Enzima	Concentración por 10 µl de reacción	Buffer de restricción	Marca	No. Cat.
BamHI	0.1 µl (1U)	Buffer B	ThermoFisher	ER0051
HindIII	0.1 µl (1U)	Buffer B	ThermoFisher	ER0501
StuI	0.2 µl (1U)	CutSmart®	NEB	R0187S

Transfección de MEFs

Día 1

1. Incubar MEFs en pase 3 en una confluencia máxima de 50% en una caja Petri de 10 cm con medio cultivo DMEM Glutamax® (No cat. 10566-016) suplementado con 10% de suero fetal bovino a 37°C con 5% CO₂ y una humedad relativa de 98% durante 24 horas.

Día 2

1. Retirar el medio y lavar con PBS estéril a 37°C 2 veces
2. Incubar las células en 1.5 ml de tripsina-EDTA 10% durante 5 minutos a 37°C.
3. Recuperar el sobrenadante en 3.5 ml de PBS estéril a 37°C.
4. Centrifugar a 0.4 r.c.f. durante 5 minutos para formar un pellet.

5. Resuspender el pellet en 1 ml de PBS estéril a 37°C.
6. Contar las células.
7. Centrifugar a 0.4 r.c.f. durante 5 minutos para formar un pellet.
8. Resuspender en Buffer R del kit Neon® Transfection System de ThermoFisher. No. Cat. (MPK1096) para obtener una concentración máxima de 150,000 células por cada 10 µl.
9. Incubar 1 de plásmido por cada 150,000 células durante no más de 15 minutos
10. Electroporar con un electroporador "MicroPorator MP-100" marca Digital Bio, con puntas de 10 µl, de acuerdo con las instrucciones del fabricante con un pulso individual de 30 ms a un voltaje de 1300 V.
2. Resembrar en medio cultivo DMEM Glutamax® (No cat. 10566-016) suplementado con 10% de suero fetal bovino a 37°C con 5% CO₂ y una humedad relativa de 98% durante 24 horas.
7. Cambiar el medio por medio de cultivo DMEM Glutamax® (No cat. 10566-016) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina).
8. Incubar a 37°C con 5% CO₂ y una humedad relativa de 98%.

RESULTADOS

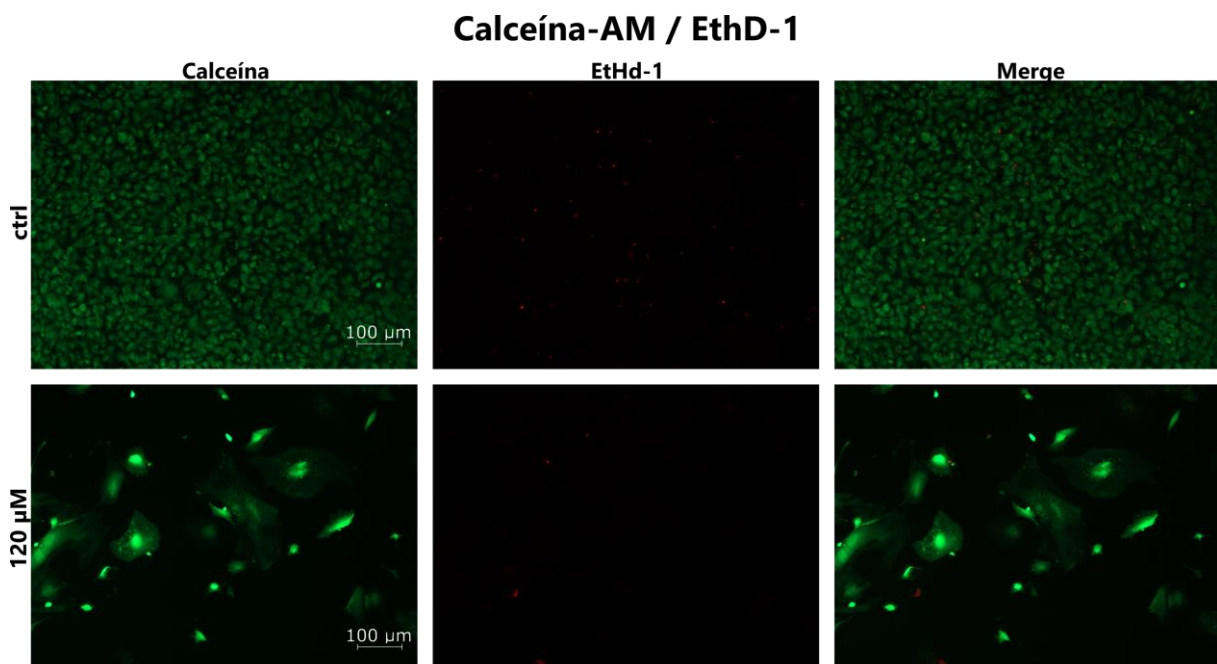
1. Establecimiento del modelo de senescencia celular en fibroblastos embrionarios de ratón inducida por daño al DNA

Con el fin de estudiar si la expresión heteróloga de pALT^{Ink4a/b} disminuye el establecimiento de la senescencia celular, se estandarizó un modelo de senescencia celular por daño al DNA con etopósido en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, por sus siglas en inglés). El etopósido es un alcaloide que se une a la DNA topoisomerasa II inhibiendo su acción de ligasa, lo que provoca que las rupturas de doble cadena causadas por esta durante la

formación de las horquillas de replicación, no se ligan de nuevo⁸¹. Dependiendo del grado de daño al DNA, las células presentan diferentes respuestas; reparar por completo el daño y continuar proliferando, volverse senescentes o morir^{33,82}. Se ensayaron diferentes condiciones para encontrar el tratamiento que indujera senescencia celular sin muerte celular.

Con la finalidad de corroborar que el tratamiento con etopósido no induce muerte celular, se realizó un ensayo de viabilidad en MEFs tratados con etopósido. Las células vivas tienen una gran cantidad de esterasas en el citoplasma, al ser incubadas con calceína-acetoximetil (AM), este compuesto es el fácilmente transportado a través de la membrana celular en las células vivas. Dentro del citoplasma el AM es rápidamente escindido y la calceína emite fluorescencia al ser excitada con luz a una λ de ≈ 495 nm. El EtHd-1 es un agente intercalante del DNA que se introduce en las células cuando la integridad membranal se encuentra comprometida, cuando se intercala en el DNA emite fluorescencia al ser excitada con una $\lambda \approx 528$ nm. Con esta doble tinción se pueden distinguir a las células vivas (calceína) y excluir las muertas (EtHd-1). Se determinó que la dosis de etopósido usada es subletal y no disminuye la supervivencia celular, pues tanto los MEFs control como los tratados con etopósido, tienen una viabilidad de más del 90% (figura 8).

A



B

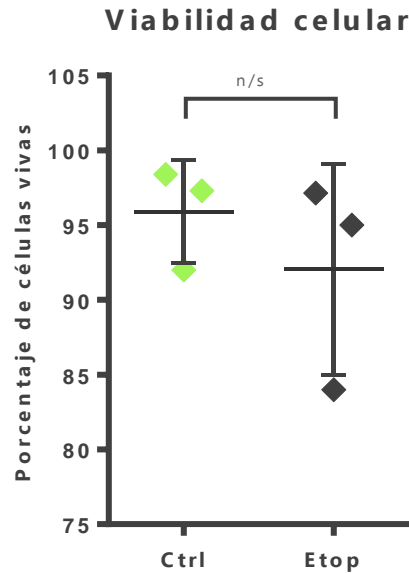


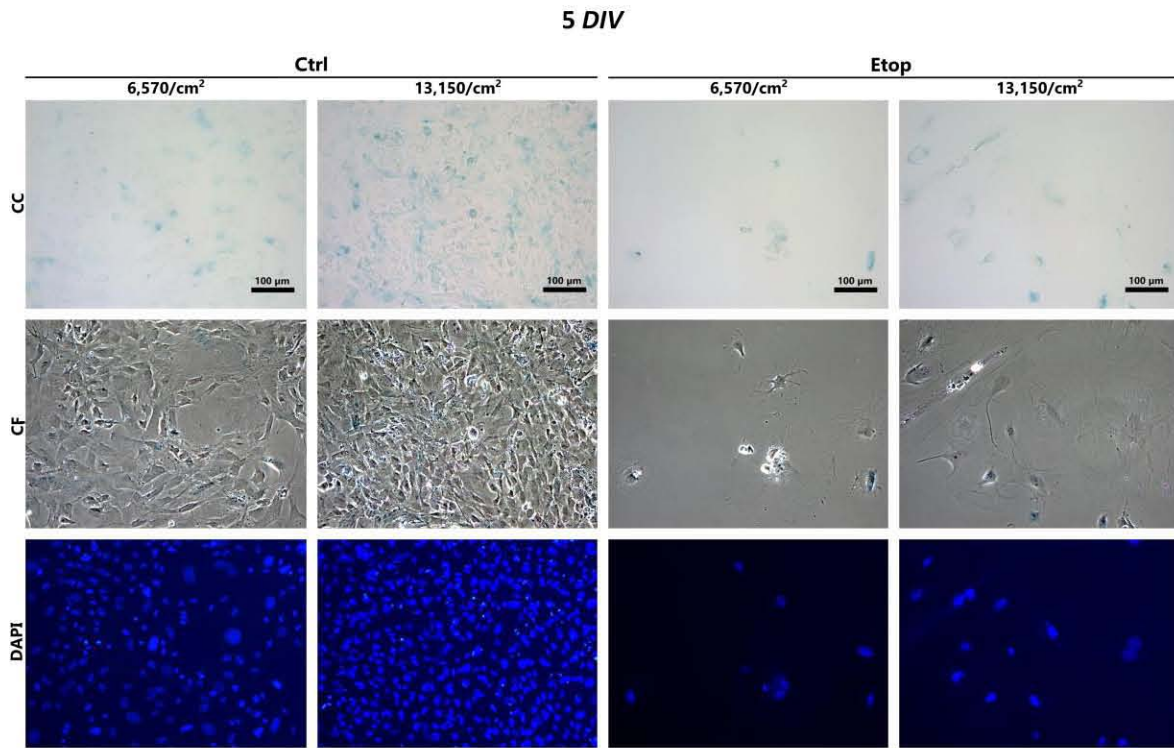
Figura 8. El tratamiento con etopósido no reduce la viabilidad celular. Se trataron MEFs con etopósido. **(A)** Se evaluó la viabilidad celular tras 6 días *in vitro* con una doble tinción de células vivas con calceína (verde), y células muertas con homodímero de etidio (rojo). Se muestran micrografías representativas **(B)** Se graficó la viabilidad celular, como porcentaje de células vivas del total de células por campo, n=3 experimentos independientes. (T de student; P = sin significancia estadística) Las barras de error representan el error estándar de la media.

1. 1 El tratamiento con etopósido incrementa la actividad de SA- β Gal

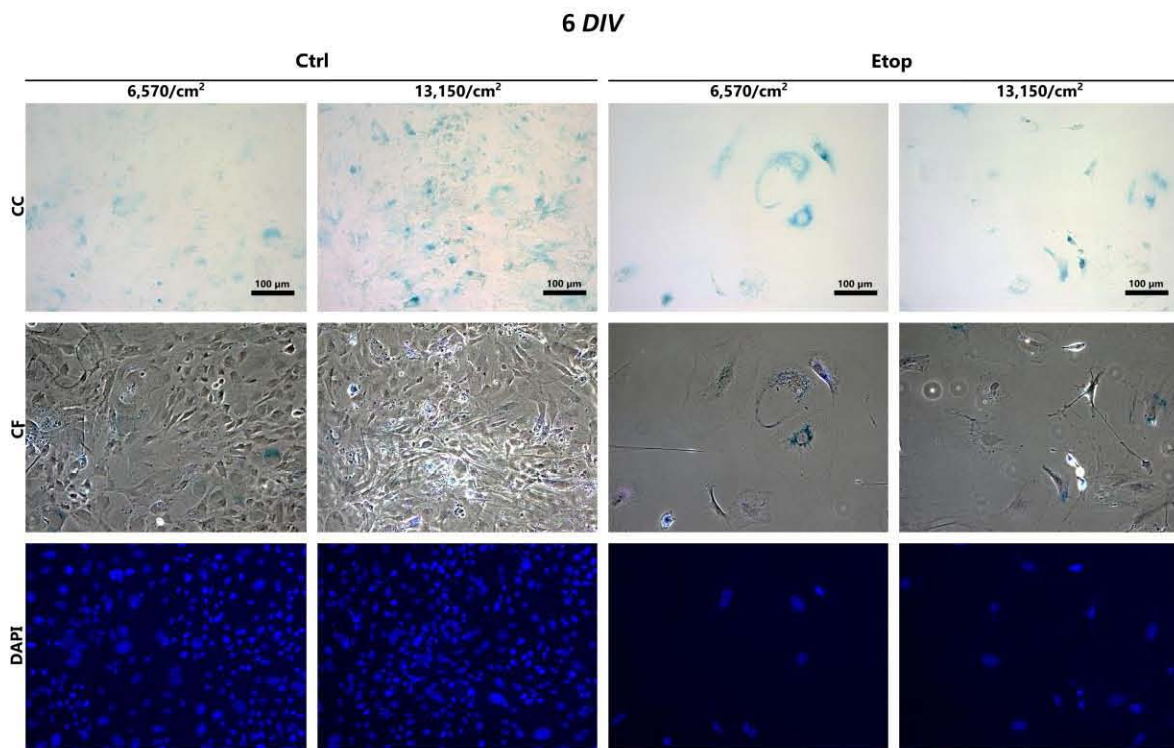
La β Galactosidasa es una glicosidasa que en condiciones ácidas hidroliza el enlace glicosídico de los galactósidos. Esta reacción ocurre de manera óptima dentro del lisosoma a un pH de 4.5. La detección de dicha actividad se lleva a cabo con el reactivo 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, comercialmente llamado X-Gal, que es una molécula de galactosa, unida a un grupo indol, a través de un enlace glicosídico. Cuando la β

Galactosidasa rompe el enlace glicosídico del X-Gal, se produce galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxi-indol. Subsecuentemente este indol se oxida en un producto conocido como azul índigo, un colorante azul que es visible a simple vista. En células senescentes, la detección de la actividad de la β Galactosidasa se hace a un pH subóptimo de 6, lo cual es posible gracias al incremento general de la expresión de la enzima y de la masa lisosomal. Este ensayo se conoce como Beta galactosidasa asociada a senescencia o SA- β Gal y es uno de los marcadores más usados para la detección de células senescentes. Sin embargo las células quiescentes en inhibición por contacto también presentan un incremento en la actividad de SA- β Gal⁶⁷. Para minimizar el efecto de la confluencia en el aumento de la actividad de SA- β Gal en nuestros experimentos, se sembraron MEFs en dos diferentes densidades celulares: 6,570 y 13,150 células por cm². Se evaluó la actividad de SA- β Gal 5 y 6 días después de haber sido tratadas o no con etopósido 120 μ M (Fig. 9). La mayor diferencia en la actividad de SA- β Gal entre los controles y las células tratadas con etopósido fue en células sembradas a una densidad de 6,570 células por cm², tras 6 días *in vitro*, por lo que se decidió adoptar este esquema para la evaluación de la expresión de los siguientes marcadores de senescencia celular.

A



B



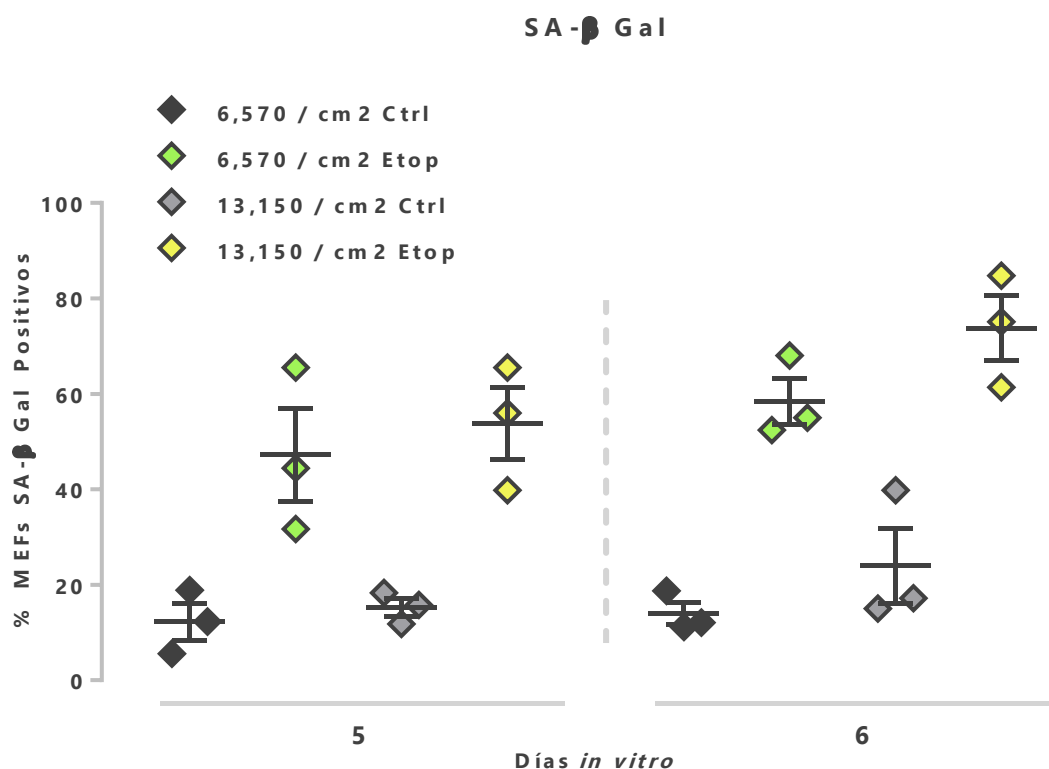


Figura 9. El tratamiento con etopósido produce el mayor incremento en la actividad de SA- β Gal, con respecto al control, tras 6 días *in vitro*, en células sembradas a una densidad celular baja. Se trataron MEFs sembrados en diferentes densidades (6,750 y 13,150 células / cm²) con etopósido. **(A)** Se evaluó la actividad de SA- β Gal tras 5 y 6 días *in vitro*. **(B)** Se graficó el porcentaje total de células β -Gal positivas en cada tratamiento, n= 3 experimentos independientes. Las barras de error representan el error estándar de la media. La barra larga representa la media.

Un aspecto fundamental de la senescencia celular la detención del ciclo celular. Se evaluó el efecto del etopósido en la proliferación celular, contando el número de duplicaciones celulares realizadas tras el tratamiento (figura 10). Acorde a lo esperado, se observó que el etopósido provoca la detención de la proliferación desde el inicio del cultivo, por lo que al final del experimento hay menos células que en los controles. En cambio, en los controles, las células continuaron dividiéndose hasta el cuarto día. Esto sugiere que, para el sexto día, que es cuando encontramos características de senescencia celular en respuesta al etopósido, los

controles están en quiescencia (en confluencia e inhibición por contacto). Dado que el etopósido inhibe la proliferación desde el inicio del cultivo, en los siguientes experimentos se normalizó cada análisis por el número total de células.

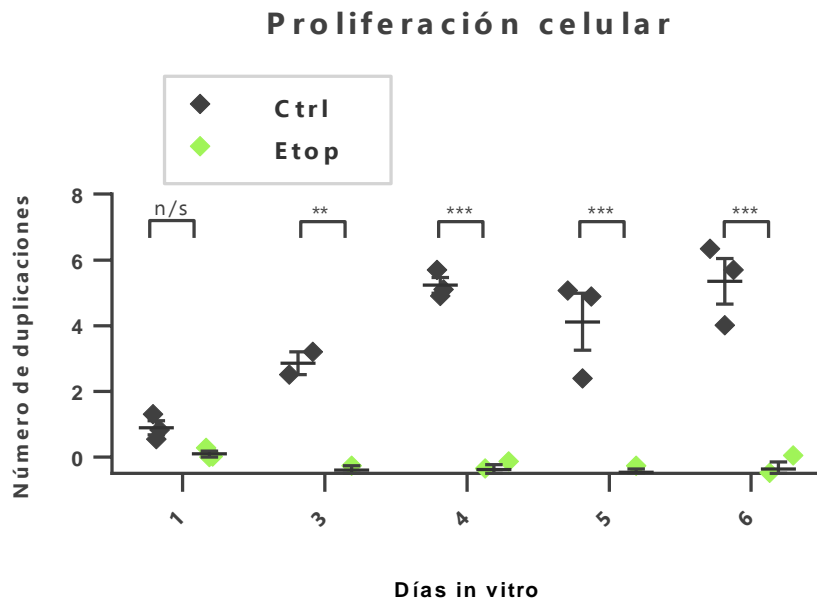


Figura 10. El etopósido provocó el detenimiento de la proliferación celular. Se trataron MEFs con etopósido y se evaluó la proliferación celular tras 1, 3, 4, 5 y 6 días *in vitro*. Se contó el total de células vivas por campo, y se calculó el número de duplicaciones ($\frac{\log(\# \text{ células contadas} - \# \text{ células sembradas})}{\log 2}$) ocurridas con cada tratamiento, con respecto a las células que no fueron tratadas con etopósido y permanecieron el mismo tiempo en cultivo. n=3 experimentos independientes. ANOVA de dos factores (**p < 0.05). Las barras de error representan el error estándar de la media. La barra larga representa la media.

1.2 El tratamiento con etopósido induce una reducción de la expresión de HES1, un represor transcripcional que evita la geroconversión.

En los resultados anteriores se confirmó que el tratamiento con etopósido produce una detención del ciclo celular, acompañada de un aumento en la actividad de SA- β Gal, dos características fundamentales de las células senescentes; sin embargo, también las células quiescentes por inhibición por contacto pueden presentar estas características. Notamos que las células sin tratamiento dejaron de proliferar al cuarto día, indicando que estaban en quiescencia. Para distinguir las células quiescentes de las senescentes, se evaluó la expresión del represor transcripcional HES1, cuya función es impedir la geroconversión en células troncales⁷⁴, partimos de la posibilidad de que en los fibroblastos también fuera su función. La detección de la expresión de esta proteína se realizó a través de un ensayo de In Cell Western Blot (ICW). Esta técnica es un ensayo de inmunofluorescencia cuantitativa, ya que se revela utilizando anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos que emiten a 700 nm u 800 nm, rango infrarrojo que permite analizar la intensidad expresión de proteínas con un rango dinámico lineal mayor, utilizando el analizador de imágenes Odyssey de Li-Cor. Esto facilita la comparación de la expresión de proteínas, pues no hay necesidad de extraerlas, separarlas en un gel SDS y transferir a una membrana.

Se observó que la expresión de HES1 es menor en las células tratadas con etopósido, lo que confirma que no son células quiescentes a diferencia de las células control, que alcanzaron máxima confluencia e inhibición por contacto (figura 11).

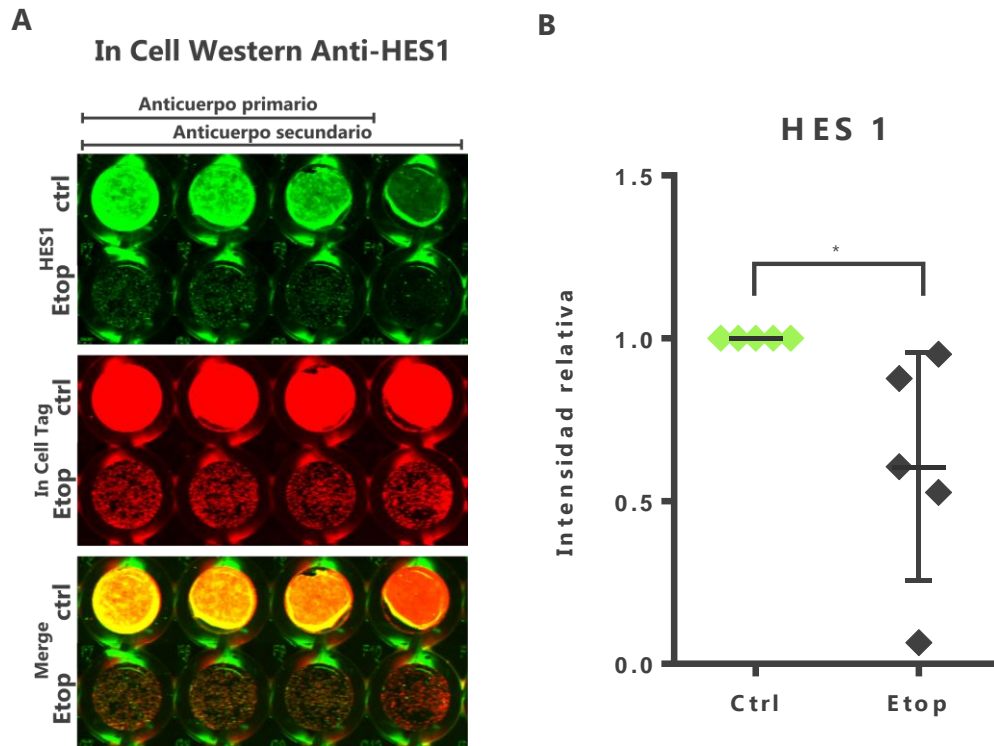


Figura 11. El arresto celular provocado por el etopósido no indujo la expresión del represor transcripcional HES1, a diferencia del arresto celular inducido por inhibición por contacto. Se trataron MEFs con etopósido y **(A)** se detectó la expresión de HES1 tras 6 días *in vitro* por ICW. La intensidad de la señal de HES1 (verde) se normalizó con respecto a la intensidad de la señal de células totales, teñidas con un colorante celular inespecífico "In Cell Tag" (rojo). **(B)** Se graficó la intensidad relativa de fluorescencia de la señal de HES1 en las células tratadas con etopósido con respecto al control, n=5 experimentos independientes. Cada punto es el promedio de 3 réplicas de cada experimento. (T de student; *P < 0.05) Las barras de error representan el error estándar de la media.

1.3 El tratamiento con etopósido indujo un aumento en la expresión de p16^{Ink4a} y p21^{Cip1}, inhibidores del ciclo celular involucrados en la senescencia celular.

La expresión de los inhibidores del ciclo celular p21^{Cip1} y p16^{Ink4a} es característica de la senescencia celular. Se observó por ICW que la expresión de p21^{Cip1} es mayor en las células tratadas con etopósido con respecto al control (Figura 12). Este inhibidor del ciclo celular participa en conjunto con otros inhibidores de CDKs para detener el ciclo celular en las células senescentes, por lo que también se evaluó la expresión de p16 por ICW en MEFs tratados con etopósido (Figura 13). La expresión de p16 fue más elevada en las células tratadas con etopósido con respecto al control.

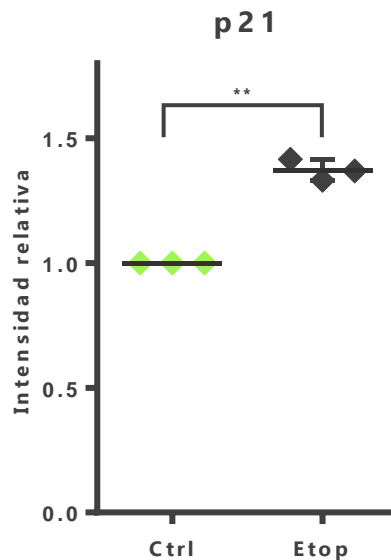


Figura 12. El tratamiento con etopósido provocó un ligero aumento en la expresión de p21. Se trataron MEFs con etopósido y se detectó la expresión de p21 tras 6 días *in vitro* por ICW. La intensidad de la señal de p21^{Cip1} se normalizó con respecto a la intensidad de la señal de células totales, y se graficó la intensidad relativa de fluorescencia de la señal de p21^{Cip1} en las células tratadas con etopósido con respecto al control, n=4 experimentos independientes. Cada punto es el promedio de 3 réplicas de cada experimento (T de student; **P < 0.05) Las barras de error representan el error estándar de la media.

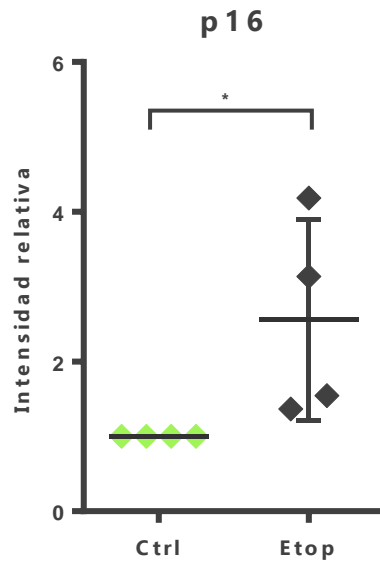


Figura 13. El tratamiento con etopósido provocó un aumento en la expresión de p16. Se trataron MEFs con etopósido y se detectó la expresión de p16^{Ink4a} tras 6 días *in vitro* por ICW. La intensidad de la señal de p16^{Ink4a} se normalizó con respecto a la intensidad de la señal de células totales y se graficó la intensidad relativa de fluorescencia de la señal de p16 en las células tratadas con etopósido con respecto al control, n=4 experimentos independientes. Cada punto es el promedio de 3 réplicas de cada experimento. (T de student; *P < 0.01) Las barras de error representan el error estándar de la media.

1.4 El tratamiento con etopósido no incrementa la fosforilación de la histona H2AX

Una característica de las células senescentes es mantener una respuesta de daño al DAN sostenida. Para comprobar si en nuestro modelo sucede eso, se evaluó la fosforilación de la histona γ H2AX como un marcador de la respuesta de daño al DNA (figura 14). Se trataron MEFs con etopósido y se realizó ICW contra la histona γ H2AX. En contra de lo esperado, los niveles de γ H2AX en las células tratadas con etopósido fue menor con respecto a aquellas sin tratamiento. Las células sin tratamiento, continúan proliferando durante aproximadamente 4 días y luego entran en quiescencia por inhibición por contacto. Durante la proliferación es

normal que ocurran roturas de DNA de doble cadena que son reparadas antes de continuar con el ciclo celular, sin embargo en las células queiscentes, el daño no se repara completamente hasta que el ciclo celular continúa, esta es una de las razones por la cual las células qiescentes pueden tener una elevada respuesta de reparación de daño al DNA⁸³. En estudios paralelos en el laboratorio, hemos observado que el tratamiento con etopósido utilizado en este estudio induce daño al DNA, y que las células son capaces de repararlo tras 6 horas. Aquí se detectó la fosforilación de la histona hasta 6 días después del daño, tiempo tras el cual parece que se resuelve la repración del DNA.

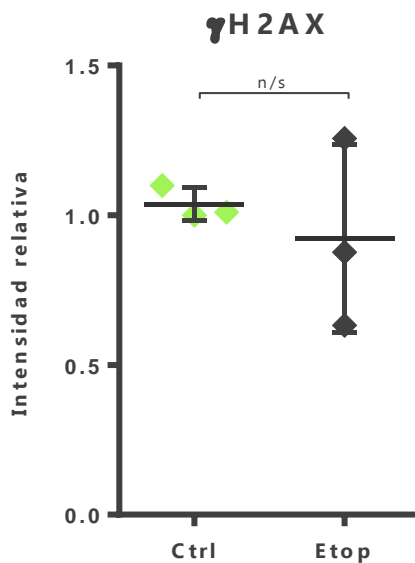


Figura 14. El tratamiento con etopósido no provocó un aumento sostenido en los niveles de la histona γ H2AX tras 6 días *in vitro*. Se trataron MEFs con etopósido y se detectó la expresión de la histona γ H2AX tras 6 días *in vitro* por ICW. La intensidad de la señal la histona se normalizó con respecto a la intensidad de la señal de células totales y se graficó la intensidad relativa de fluorescencia de la señal de la histona en las células tratadas con etopósido con respecto al control, n=3 experimentos independientes. Cada punto es el promedio de 3 réplicas de cada experimento. (T de student; *P = n/s) Las barras de error representan el error estándar de la media.

1.5 El tratamiento con etopósido no indujo la acumulación de lipofuscina, un agregado lipoproteico característico de las células senescentes tras 6 días in vitro

Otra característica de las células senescentes es la acumulación de agregados lipoproteicos oxidados llamados lipofuscina. Esta acumulación es resultado de una disminución en la proteólisis, un aumento en la transcripción de genes lisosomales y principalmente la detención del ciclo celular, pues tras cada división, los agregados insolubles se reparten entre las células hijas y esto evita su acumulación. Se realizó tinción con Sudán Black B (SSB) tras 6 días de haber sido incubados con de etopósido. El SBB es un tinte liposoluble, que se une con gran afinidad a la lipofuscina, y se puede observar por microscopía de campo claro, como pequeños gránulos negros dentro de las células. No se observó alguna diferencia significativa de SBB tras el tratamiento (Fig. 15). Al ser la lipofuscina producto de una gran cantidad de moléculas entrecruzadas, produce auto fluorescencia en un amplio espectro de excitación y emisión, medir la auto fluorescencia de las células también es una manera ampliamente reportada de determinar si hay acumulación de lipofuscina, por lo que también se evaluó la auto fluorescencia por microscopía de epifluorescencia (Figura 15). No se observó un aumento de auto fluorescencia entre las células tratadas con etopósido y el control, por lo que se determinó que la acumulación de lipofuscina no sucede tras el tratamiento con etopósido.

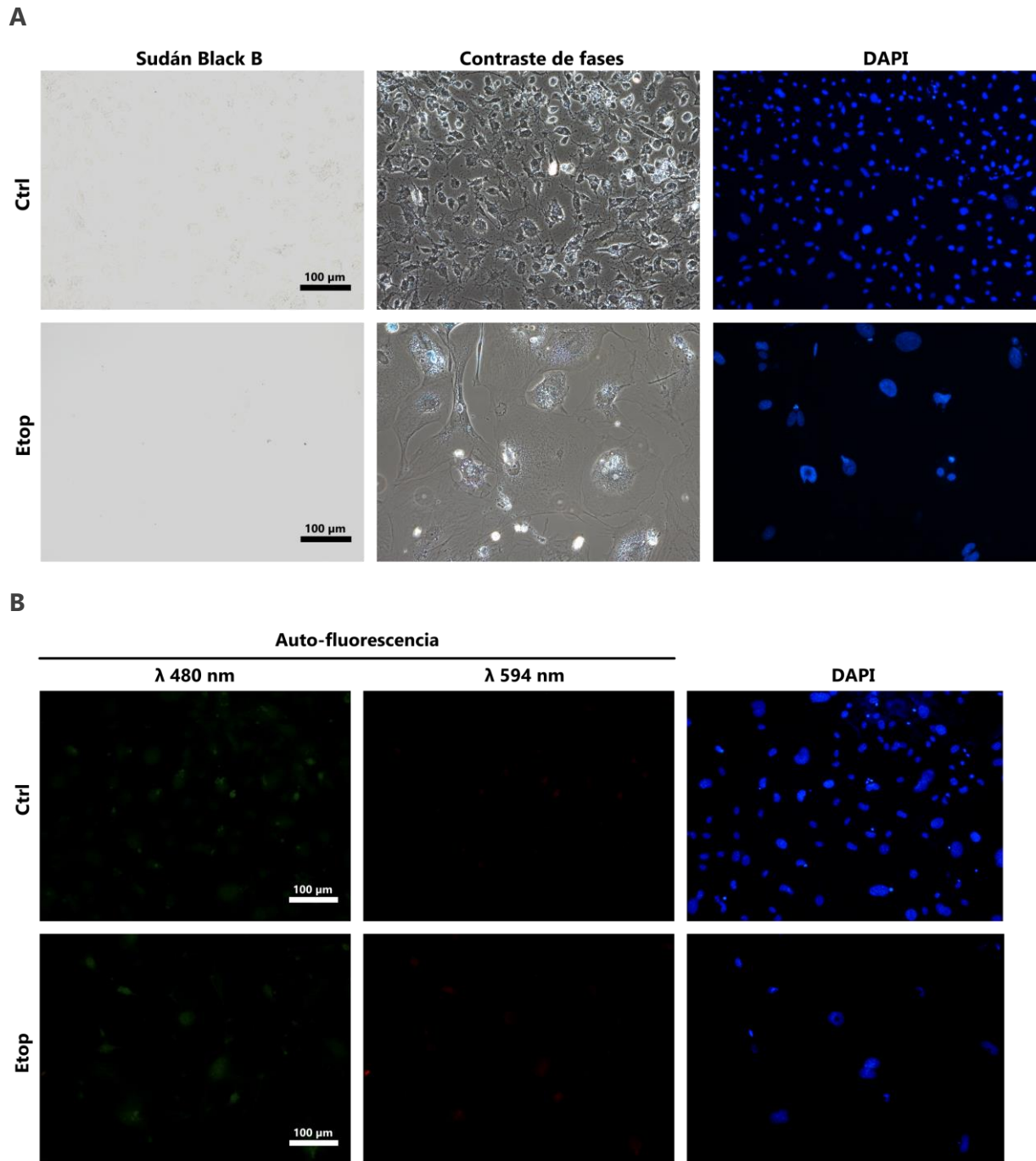


Figura 15. El tratamiento con etopósido no produjo la acumulación de lipofuscina. Micrografías representativas de MEFs tratados con etopósido. Sevaluó la acumulación de lipofuscina por tinción de Sudán Black B en MEFs tratados con etopósido, n=3. **(B)** Y la acumulación de lipofuscina por auto fluorescencia a una λ de 488 nm (verde) y 594 nm (rojo), n=3.

En conjunto, a pesar de que no presentaron una respuesta sostenida de daño al DNA, ni acumulación de lipofuscina, con estos resultados se puede concluir que las células tratadas con etopósido, tras 6 días *in vitro*, se vuelven senescentes, pues presentan una elevada actividad de SA- β Gal, una detención de la proliferación celular, un aumento en la expresión de los inhibidores de CDKs p16^{Ink4a} y p21^{Cip1}, y presentan una menor expresión del represor transcripcional HES1. Las células sin tratar tras 6 días *in vitro* se vuelven quiescentes, pues al llegar a máxima confluencia entran en inhibición por contacto. Una vez establecido el modelo de senescencia celular por daño al DNA, se prosiguió a evaluar si la expresión heteróloga de pALT^{Ink4a/b} de *H. Glaber* en células de ratón protege del establecimiento de la senescencia celular.

2. La expresión heteróloga de pALT^{Ink4a/b} de *H. Glaber* en células de ratón protege del establecimiento de la senescencia celular.

2.1 Reconstrucción de la secuencia de pALT^{Ink4a/b}

La secuencia completa de pALT^{Ink4a/b} no se encuentra depositada en alguna base de datos, por lo que realizó un análisis bioinformático para reconstruir la secuencia de cDNA a partir de las diversas secuencias parciales disponibles. Se buscaron regiones de similitud en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de la secuencia de mRNA de pALT^{Ink4/b} alrededor del sitio de splicing entre exón 1 de *Cdkn2b* y el exón de *Cdkn2a*, reportado en 2014 por Tian et al⁸⁰. Se identificó que la secuencia reportada está formada por las secuencias depositadas en el GeneBank del NCBI con números de acceso XM_004838351 y XM_004838352.1, respectivamente (Figura 16).

A

Sitio de splicing del Exón 1 y 2			
pALT ^{Ink4a/b}	000	--GGGAGGGCGCCCGATCCAGGTCATGATGATGGGCAACACCCAA--	042
<i>Cdkn2b</i>	451	TCGGGAGGGCGCCCGATCCAGGTCATGATGATGGGCAAGTCCCACA	495
<i>Cdkn2a</i>	117	TCGGCCGAGACCGATTTCAGGTCATGATGATGGGCAACACCCAAG	161

B

BLAST de nucleótidos de pALT ^{Ink4a/b}			
pALT ^{Ink4a/b}	000	-----	000
<i>Cdkn2b</i>	405	GGCATCTCCTGGACGCCGGAGCAGATCCCAACGCCGTCAATCGCT	450
<i>Cdkn2a</i>	071	GCGAGCTGCTGGAGGCTGGGGCGCCCAATGCCCGGAACCGTT	116
pALT ^{Ink4a/b}	000	--GGGAGGGCGCCCGATCCAGGTCATGATGATGGGCAACACCCAA--	042
<i>Cdkn2b</i>	451	TCGGGAGGGCGCCCGATCCAGGTCATGATGATGGGCAAGTCCCACA	495
<i>Cdkn2a</i>	117	TCGGCCGAGACCGATTTCAGGTCATGATGATGGGCAACACCCAAG	161
pALT ^{Ink4a/b}	042	-----	042
<i>Cdkn2b</i>	496	TGGCTGAGCTTCTGCTGCTCCACGGCGCAGAGCCCAACTGCGCAG	540
<i>Cdkn2a</i>	162	TGGCTGAGCTTCTGCTGCTCCACGGCGCAGAGCCCAACTGCGCAG	206

Figura 16. Caracterización de la secuencia de pALT^{Ink4a/b}. (A) Secuencia reportada del sitio de splicing de pALT^{Ink4a/b} por Tian et al., 2014. (B) Se identificaron las secuencias que corresponden al exón 1 y exón 2 del cDNA de pALT^{Ink4a/b} en el GeneBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). En color se resaltan las regiones correspondientes al exón 1 de *Cdkn2b* (Amarillo) y la correspondiente al exón 2 de *Cdkn2a* (verde), alineadas con la secuencia de pALT^{Ink4ab} (negro).

Una vez identificadas las secuencias que corresponden al exón 1 y 2 de pALT^{Ink4a/b}, se reconstruyó la secuencia completa de cDNA, incluyendo al exón 3 de *Cdkn2b*, como ocurre naturalmente con el mRNA de p16^{Ink4a} (figura 17). Esta secuencia se tradujo *in silico* usando el código genético estándar para mamíferos. Se identificaron 6 diferentes posibles marcos de lectura abiertos (ORFs, por sus siglas en inglés). Se realizó un análisis de similitud por alineamiento múltiple de proteínas con la herramienta básica de alineamiento local (BLAST) entre las diferentes secuencias de aminoácidos de los ORFs de pALT^{Ink4a/b} y las secuencias de aminoácidos de p15^{Ink4b} y p16^{Ink4a} de *Heterocephalus glaber*. De esta manera se identificó un solo ORF cuyo exón 1 y exón 2 se encuentran en el mismo marco de lectura para traducir a

p15^{Ink4b} y p16^{Ink4a} de *H. glaber*. También se observó, acorde a lo reportado en la literatura para el mRNA de p16^{Ink4a} de *H. glaber*, que el ORF de pALT^{Ink4a/b} tiene un codón de paro temprano en el exón 2, que resulta en una secuencia de aminoácidos más corta con respecto a p16^{Ink4a} de otros mamíferos como rata, ratón o humano⁷⁷. Adicionalmente, para confirmar que el ORF de pALT^{Ink4a/b} fuese el correcto, se realizó un alineamiento de similitud múltiple entre la secuencia de aminoácidos del ORF y las secuencias de aminoácidos de p15^{Ink4b} o p16^{Ink4a} de otros mamíferos: rata topo lampiña (*H. glaber*), ratón (*Mus musculus*) y humano (*Homo sapiens*) (figura 18). Los porcentajes de identidad entre p15^{Ink4b} de *H. glaber*, *M. musculus* y *H. sapiens* y p16^{Ink4a} se presentan en la tabla 3.

	Exón 1	
1	GGTGGGCCGCCCGGCCAGCTGGGAACACAGCTCATTCCTGCCGGCT	48
49	CCCCAGGCCACCGAGCTGGGCTGCGCGCAAGGCGTTCTTCCTGGGAA	96
97	GGACAGGCGAGTGTCTGCTGGTTCTCGGCCGCCAGGAAAAGCCCGGAA	144
145	CTAACTACTCTGCCCTGCAAGGCCCCACACCGCAGAAAGCCTGCGA	192
193	CAGGGACAGAAGCTGACTGAGCTCTCCTGTGAGGGCAGCGCCCCGGGG	240
241	CGGTGCAGAACTGTCGCTGAACTCACCTCAGCAGTGGATTATACAG	288
289	GCCGCTCCGGGTCCGAAGGCTGCGCAATGCGAGAAGAGGACAAGAGCA	336
337	TGCTCAGTGGTGGCGGCTGCGATGTGGACCTGGCCAACGCCGCGGCGC	384
385	GAGGGCAAGTGGAGACGGTTCGGCATCTCCTGGACGCCGGAGCAGATC	432
433	CCAACGCCGTCAATCGCTTCGGGAGGCGCCGATCCAGGTCATGATGA	480
481	TGGGCAACACCCAAGTGGCCGCGCTGCTGCTGCTCCACGGCGCGGACC	528
529	CGAACTGCGCTGACCCTGTCAACCTCACACTACCGGTGCATGACGCGG	576
577	CGCGGGCGGGCTTCTTGGATACTCTGGTGGCGCTGCACCGGGCTGGGG	624
625	CGCGGCTGGACGTGCGCGACACCTGGGGCCGCTTGCCCGTGGACCTGG	672
673	CTGAGGAGCAGGGCCACCGCGAGGTCGCTAGGTATCTGCGCGACGTTG	720
721	TGGGGGACGTGTAAGCGGCAGCGATGCCTGTGTAGTCACCCACAAAG	768
	Exón 3	

769	TCACCAGCACAAATCCAGAATCTGATCATGAATTGGAAAAGTCAAAAAGA	816
817	AAATAAGAACATCTTCCACTCACCCAATTCTACCATTTTTTAAATGT	864
865	GGAGCTGGGGATGTAACCCAGTGGTAGAGTGTCTAGCATTTCAGGAAG	912
913	CCTTAGGTTTCATTCCCAGCCCCACCAAAATCAAATAAATAAATAAAAA	960
961	TTAAACCGTTAA	972

Figura 17. Secuencia completa de cDNA de pALT^{Ink4a/b}. Reconstrucción de la secuencia completa de cDNA de pALT^{Ink4a/b} (ORF en negro) a partir del exón 1 de *Cdkn2b* (amarillo) y el exón 2 y 3 de *Cdkn2a* (verde).

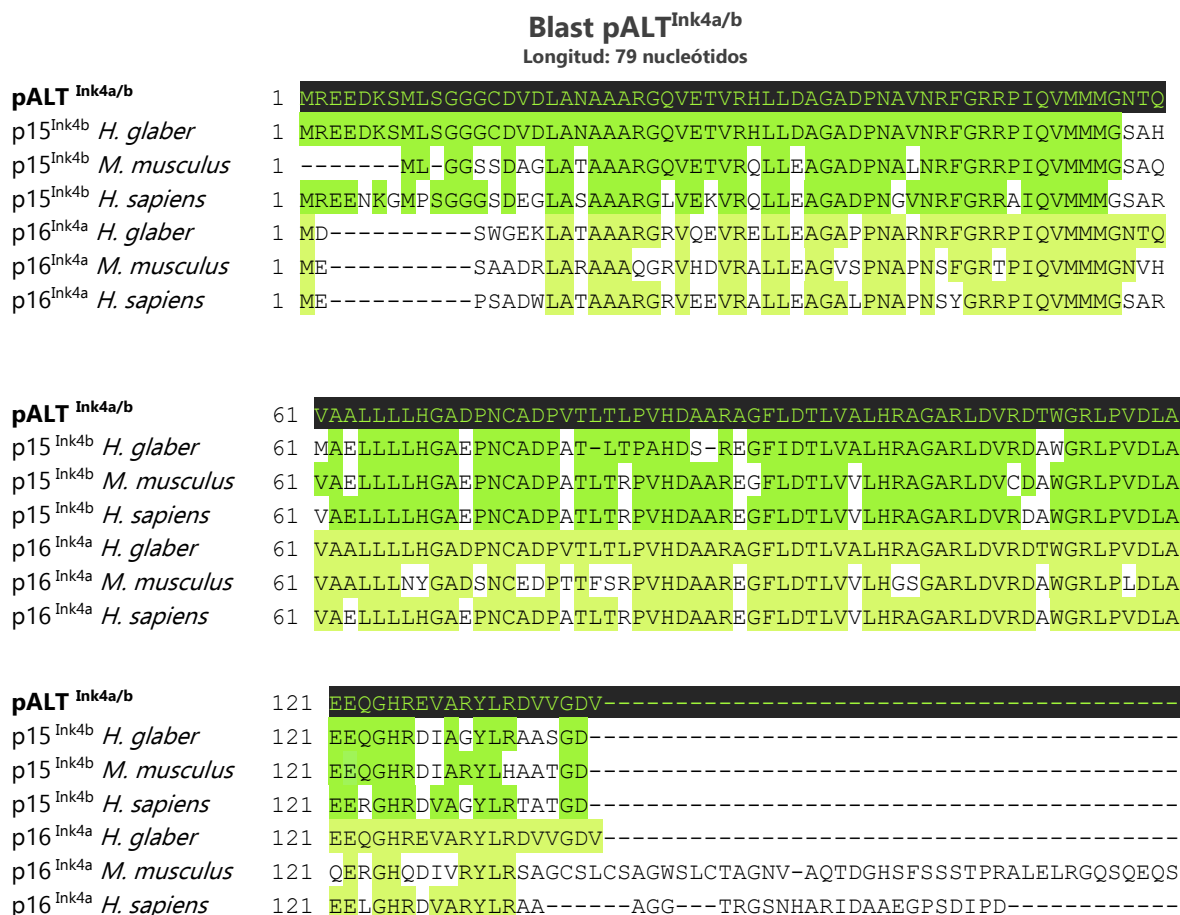


Figura 18. Identificación del ORF de pALT^{Ink4a/b}. Se muestra un alineamiento múltiple de proteínas entre la secuencia de aminoácidos de pALT^{Ink4a/b} y p15^{Ink4b} y p16^{Ink4a} de *H. glaber*,

M. musculus y *H. sapiens*. En color se muestran regiones de similitud entre la secuencia de aminoácidos de p15^{Ink4b} (verde) o p16^{Ink4a} (amarillo) con respecto a pALT^{Ink4a/b}

Tabla 3. BLAST de pALT ^{Ink4a/b}			
Proteína ¹	Número de acceso ²	Query ³	Identidad ⁴
p15 ^{Ink4b} <i>H. glaber</i>	XP_004838408.1	99%	88%
p15 ^{Ink4b} <i>M. musculus</i>	AAH02010.1	92%	81%
p15 ^{Ink4b} <i>H. sapiens</i>	CAG38766.1	99%	79%
p16 ^{Ink4a} <i>H. glaber</i>	XP_004838409.1	87%	93%
p16 ^{Ink4a} <i>M. musculus</i>	NP_001035744.1	82%	69%
p16 ^{Ink4a} <i>H. sapiens</i>	AAB60645.1	86%	80%

1. Proteína alineada con el producto de traducción *in silico* de pALT^{Ink4a/b}.
2. Número de acceso en *GeneBank* del NCBI.
3. Porcentaje total de la secuencia, en la cual se realizó el alineamiento.
4. Porcentaje de similitud entre pALT^{Ink4a/b} y la proteína.

2.2 Diseño del cDNA para expresar e identificar la traducción de pALT^{Ink4a/b}

En el único reporte hasta la fecha sobre pALT^{Ink4a/b} se estudió la función del mRNA en el ciclo celular, hasta el momento no se ha demostrado la traducción de la proteína. Con la finalidad de conservar la función biológica que pudiese tener el mRNA, en el diseño final del cDNA para expresar pALT^{Ink4a/b} se incluyeron las regiones no traducidas (UTR por sus siglas en inglés) 5' y 3' de pALT^{Ink4a/b}, además de una secuencia para la expresión del péptido FLAG en el extremo amino terminal, para identificar a la proteína con anticuerpos contra este epítipo, pues no existen anticuerpos contra pALT^{Ink4a/b}. Esta secuencia se flanqueó con sitios de restricción para las enzimas BamHI (extremo 5') y HindIII (extremo 3') para poder identificarla con ensayos de restricción analítica y para facilitar la subclonación en otros vectores de expresión. A esta secuencia se le denominó "FLAG pALT^{Ink4a/b}" (figura 19). Adicionalmente se diseñó una secuencia para sobre expresar p16^{Ink4a} de ratón como control positivo para la

inducción de senescencia. A la secuencia de cDNA de p16^{Ink4a} se le adicionó una secuencia para la expresión de FLAG en el extremo amino terminal para poder identificarla con anticuerpos dirigidos contra este epítipo y se flanqueó con secuencias de restricción para las enzimas BamHI (5') y StuI (3'), con la finalidad de poder diferenciarla de la secuencia FLAG pALTI^{Ink4a/b}, con un ensayo de digestión analítica. A esta secuencia se le denominó "FLAG p16^{Ink4a}" (figura 20). Ambas secuencias fueron sintetizadas y clonadas en un vector pUC57.

A

FLAG-pALT^{Ink4a/b} (H. glaber)

001	GGATCC GGTGGGCCGCCCGGCCAGCTGGGAACACAGCTCATTCCCTG	048
049	CCGGCTCCCCAGGCCACCGGAGCTGGGCTGCGCGCAAGGCGTTCTTCC	096
097	TGGGAAGGACAGGCGAGTGTCTGCTGGTTCTCGGCCGCCAGGAAAAGC	144
145	CCGGAACTAACTACTCTGCCCCGTGCAAGGCCCCACACCGCAGAAAAGC	192
193	CTGCGACAGGGACAGAAGCTGACTGAGCTCTCCTGTGAGGGCAGCGCC	240
241	CCGGGGCGGTGCAGAACTGTCGCTGAACTCACCCCTCAGCAGTGGATT	288
289	ATACAGGCCGCTCCGGGTCCGAAGGCTGCGCA ATGGATTATAAGGATG	336
337	ACGATGACAAGATGCGAGAAGAGGACAAGAGCATGCTCAGTGGTGGCG	384
385	GCTGCGATGTGGACCTGGCCAACGCCGCGCGGAGGGCAAGTGGAGA	432
433	CGGTTGCGCATCTCCTGGACGCCGGAGCAGATCCCAACGCCGTCATC	480
481	GCTTCGGGAGGCGCCCGATCCAGGTCATGATGATGGGCAACACCCAAG	528
529	TGGCCGCGCTGCTGCTGCTCCACGGCGCGGACCCGAACTGCGCTGACC	576
577	CTGTCACCCTCACACTACCGGTGCATGACGCGGCGCGGGCGGGCTTCT	624
625	TGGATACTCTGGTGGCGCTGCACCGGGCTGGGGCGCGGCTGGACGTGC	672
673	GCGACACCTGGGGCCGCTTGCCCGTGGACCTGGCTGAGGAGCAGGGCC	720
721	ACCGCGAGGTCGCTAGGTATCTGCGCGACGTTGTGGGGACGTGTAAAG	768
769	CGGCAGCGATGCCTGTGTAGTCACCCACAAAGTCACCAGCACAAATCC	816
817	AGAATCTGATCATGAATTGGAAAAGTCAAAGAAAATAAGAACATCTT	864
865	CCACTCACCCAATTCTACCATTTTTTAA AAGCTT	899

B

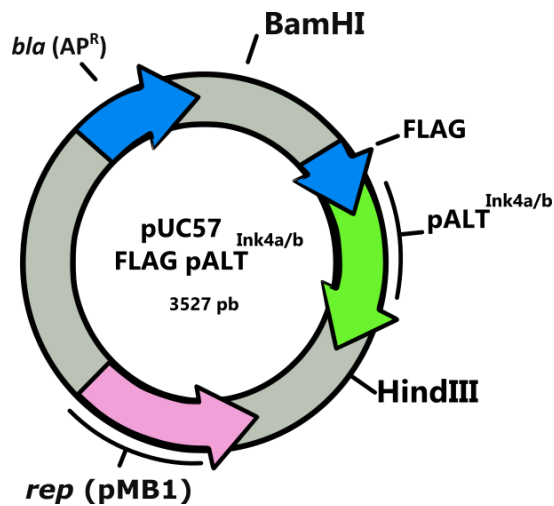


Figura 19. Secuencia de cDNA para expresar FLAG-pALT^{Ink4a/b} de *H. glaber*. El diseño del cDNA para la expresión de pALT^{Ink4a/b} (A) incluyó 327 nucleótidos de la UTR 5' de pALT^{Ink4a/b} de *H. glaber*, seguida de una secuencia que codifica para el epítipo FLAG (verde), el ORF de pALT^{Ink4a/b} (fondo en negro) y 92 nucleótidos de la UTR 3' de pALT^{Ink4a} de *H. glaber*. La secuencia se encuentra flanqueada por sitios de restricción para las enzimas BamHI (azul) y HindIII (rosa). Se clonó en un plásmido pUC57 (B), que tiene un gen para resistencia a ampicilina (Beta lactamasa). La construcción tuvo una longitud de 3527 nucleótidos

A

FLAG p16^{Ink4a} (*M. musculus*)

001	GGATCCATGGATTATAAGGATGACGATGACAAGATGGAGTCCGCTGCA	048
049	GACAGACTGGCCAGGGCGGCGGCCAGGGCCGTGTGCATGACGTGCGG	096
097	GCACTGCTGGAAGCCGGGTTTCGCCCAACGCCCCGAACCTTTTCGGT	144
145	CGTACCCCGATTCAGGTGATGATGATGGGCAACGTTACGTAGCAGCT	192
193	CTTCTGCTCAACTACGGTGCAGATTCGAACTGCGAGGACCCACTACC	240
241	TTCTCCCGCCCGGTGCACGACGCAGCGCGGAAGGCTTCCTGGACACG	288
289	CTGGTGGTGCTGCACGGGTCAGGGGCTCGGCTGGATGTGCGCGATGCC	336
337	TGGGGTCGCCTGCCGCTCGACTTGGCCCAAGAGCGGGGACATCAAGAC	384
385	ATCGTGCGATATTTGCGTTCGCGTGGGTGCTCTTTGTGTTCGCTGGG	432
433	TGGTCTTTGTGTACCGCTGGGAACGTCGCCAGACCGACGGGCATAGC	480
481	TTCAGCTCAAGCACGCCAGGGCCCTGGAACCTTCGCGGCCAATCCCAA	528
529	GAGCAGAGCTAAAGGCCT	547

B

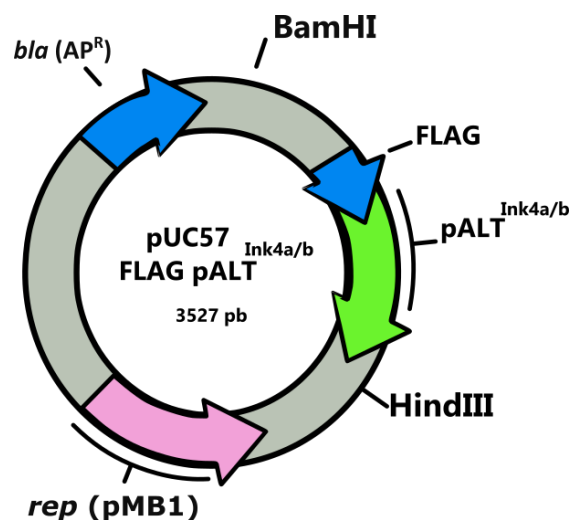


Figura 20. Secuencia de cDNA para sobre expresar FLAG p16^{Ink4a}. El diseño del cDNA para la expresión de p16^{Ink4a} **(A)** incluyó una secuencia para el epítipo FLAG (verde), seguida del ORF de p16^{Ink4a} (fondo en negro). La secuencia se encuentra flanqueada por sitios de restricción para las enzimas BamHI (azul) y StuI (rosa). Se clonó en un plásmido pUC57 **(B)**, que tiene un gen para resistencia a ampicilina (Beta lactamasa). La construcción tuvo una longitud de 3527 nucleótidos.

2.3 Construcción de los vectores para la expresión de pALT^{Ink4a/b}.

Para la expresión de FLAG pALT^{Ink4a/b} y FLAG p16^{Ink4a} en células de mamífero se eligió usar el vector pCDNA3.1⁻ que asegura una expresión elevada y constitutiva en células de mamífero. La secuencia FLAG pALT^{Ink4a/b} se subclonó del vector de origen pUC57 al vector de expresión pCDNA3.1⁻ por restricción enzimática usando las enzimas BamHI y HindIII. Para la subclonación de la secuencia FLAG-p16^{Ink4a} (*M. musculus*), se subclonó del plásmido pUC57 a un plásmido intermediario pBluescriptII KS (+) usando las enzimas de restricción BamHI y EcoRV, posteriormente se subclonó al plásmido pCDNA3.1⁻ y por restricción enzimática, usando las enzimas BamHI y HindIII (figura 21). La identidad de los insertos se comprobó mediante un análisis de digestión analítica usando las enzimas de restricción BamHI y HindIII. El vector vacío tiene una longitud de 5,409 pb y a los insertos FLAG pALT y FLAG-p16, 892 pb y 540 pb, respectivamente (figura 22) Ambas construcciones se secuenciaron para confirmar su identidad y que no hubiera mutaciones.

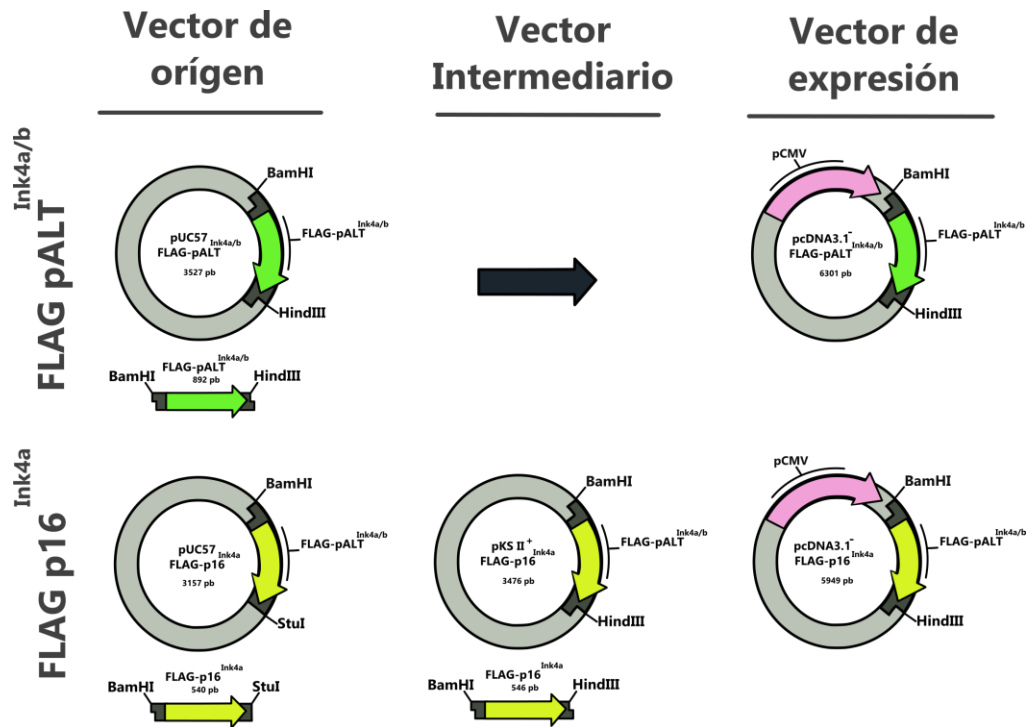


Figura 21. Construcción de los vectores de expresión de pALT^{Ink4a/b} y p16^{Ink4a} de ratón. El inserto FLAG pALT^{Ink4a/b} se subclonó del plásmido pUC57 al plásmido de expresión pcDNA3.1- por digestión enzimática, usando las enzimas BamHI y HindIII, a esta construcción de 6,301 pb de longitud se le denominó pcDNA3.1⁻FLAG pALT^{Ink4a/b}. El inserto FLAG p16^{Ink4a} se subclonó del plásmido de clonación pUC57 al plásmido intermediario de expresión pKS II⁺ por digestión enzimática usando las enzimas BamHI y StuI, luego se subclonó al plásmido de expresión pcDNA3.1- por digestión enzimática, usando las enzimas de restricción BamHI y HindIII, a esta construcción de 5,949 pb se le denominó pcDNA3.1⁻ FLAG p16^{Ink4a}.

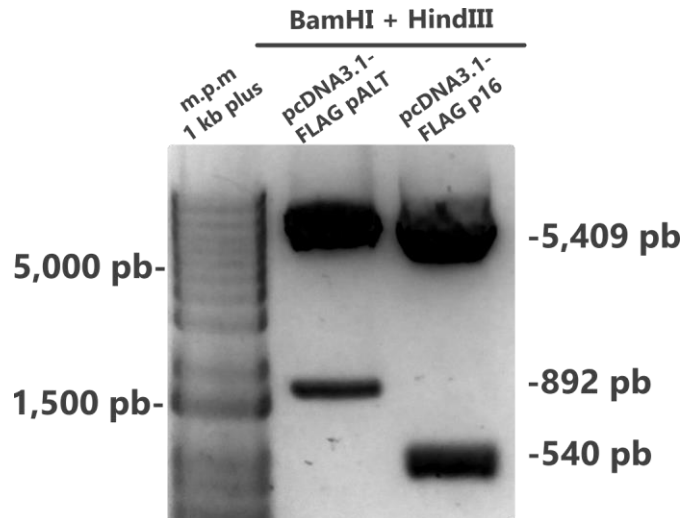
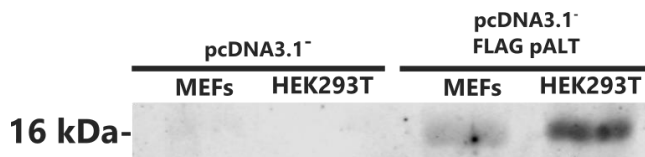


Figura 22. Digestión analítica de las construcciones pcDNA3.1⁻ FLAG pALT^{Ink4a/b} y pcDNA3.1⁻ FLAG p16^{Ink4a}. Se realizó in análisis de restricción de las construcciones pcDNA3.1⁻FLAG pALT^{Ink4a/b} y pcDNA3.1⁻ FLAG p16^{Ink4a} con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. Se resaltan las bandas correspondientes al vector vacío (5 409 pb), y a los insertos FLAG pALT^{Ink4a/b} (892 pb) y FLAG-p16 (540 pb).

Experimentalmente nunca se ha observado la traducción de pALT^{Ink4a/b}. Para corroborar que el mensajero se traduce, se transfectaron MEFs y células HEK293T con la construcción pcDNA3.1⁻ FLAG pALT^{Ink4a/b} o con el vector vacío y se detectó la expresión de la proteína por Western Blot con anticuerpos anti-FLAG (figura 23). La secuencia de aminoácidos de FLAG pALT^{Ink4a/b} tiene un peso predicho de 16 kDa. Se observó que la expresión ocurre en ambos tipos celulares., demostrando la funcionalidad de la construcción.

A



B

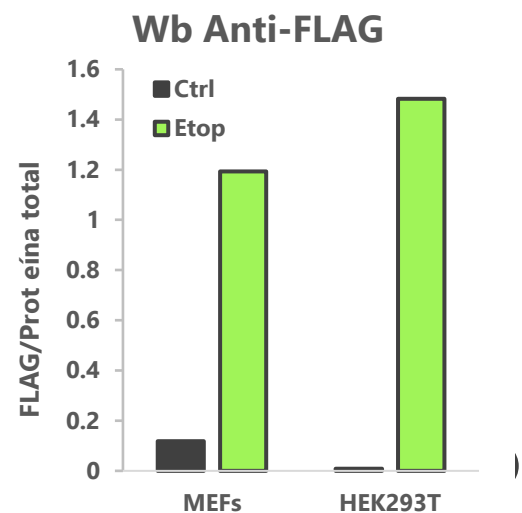


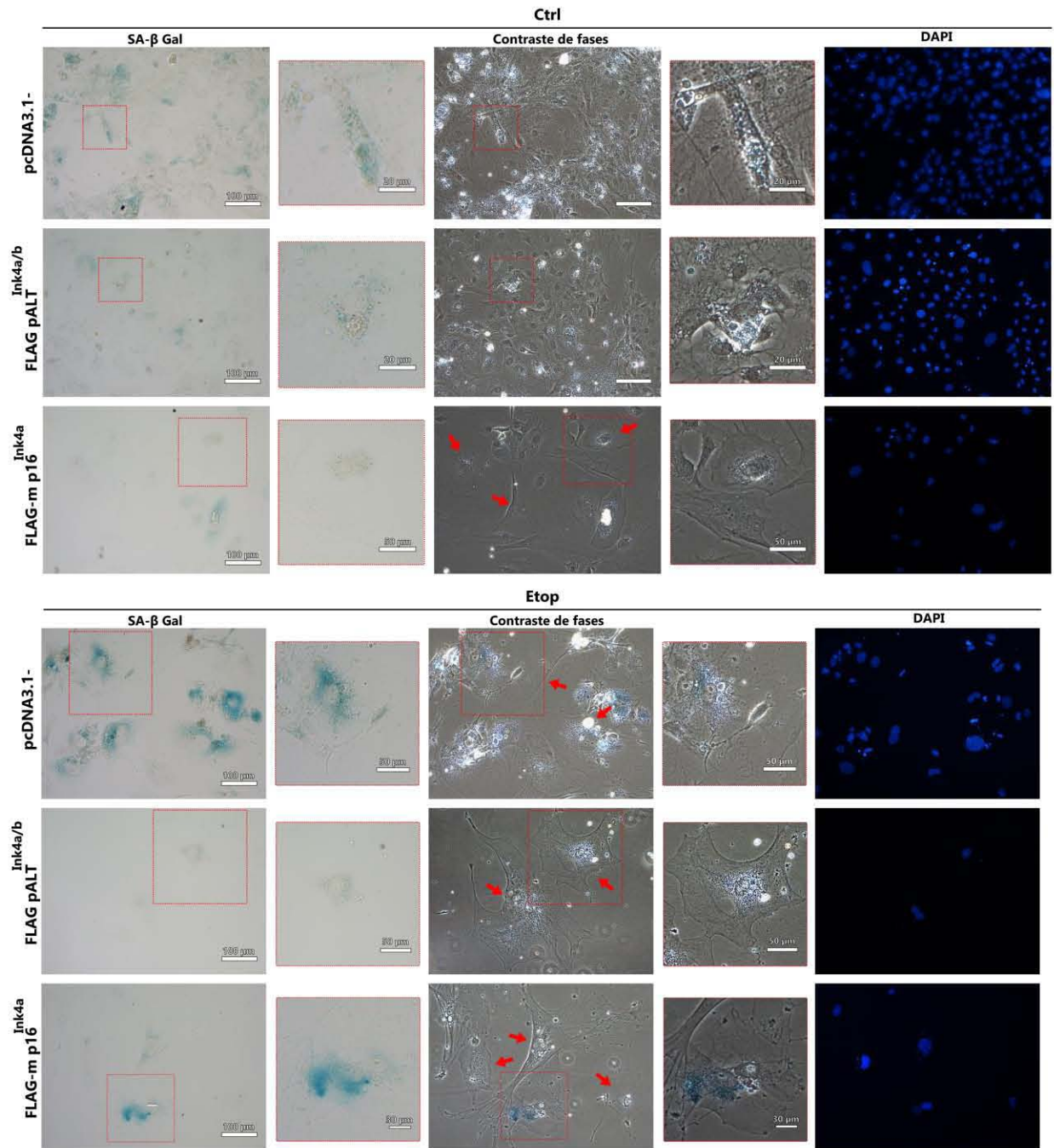
Figura 23. Comprobación de la expresión heteróloga de FLAG pALT^{Ink4a/b}. Se transfectaron MEFs y células HEK293T con el vector vacío o bien la construcción pcDNA3.1⁻ FLAG pALT^{Ink4a/b}. **(A)** Se realizó la inmunodetección de pALT^{Ink4a/b} con un anticuerpo contra el epítipo FLAG por Western Blot. **(B)** Se cuantificó la señal de FLAG y se normalizó con respecto a la proteína total.

2.4 La expresión de pALT^{Ink4a/b} previno el establecimiento de la senescencia celular inducida por daño al DNA

2.4.1 La expresión de pALT^{Ink4a} disminuyó la actividad de SA-β Gal

Una vez observada la expresión de FLAG pALT^{Ink4a/b}, se prosiguió a estudiar si pALT^{Ink4a/b} disminuye el establecimiento de la senescencia celular inducida por daño al DNA. Se transfectaron MEFs con pcDNA3.1⁻ FLAG pALT^{Ink4a/b}, pcDNA3.1⁻ FLAG p16^{Ink4a}, como un control positivo de inducción de senescencia celular por la sobre expresión de p16^{Ink4a} o el vector vacío y 24 horas después se trataron con etopósido. Se realizó ensayo de SA-β Gal tras 6 días *in vitro* (figura 24). Se observó que las células tratadas con etopósido adquirieron una morfología aplanada y un incremento en la actividad de SA-β Gal, el porcentaje de células SA-β Gal positivas en las células que expresaron FLAG pALT^{Ink4a} fue menor que en las células que expresaron FLAG p16^{Ink4a} o las células transfectadas con el vector vacío (figura 24).

A



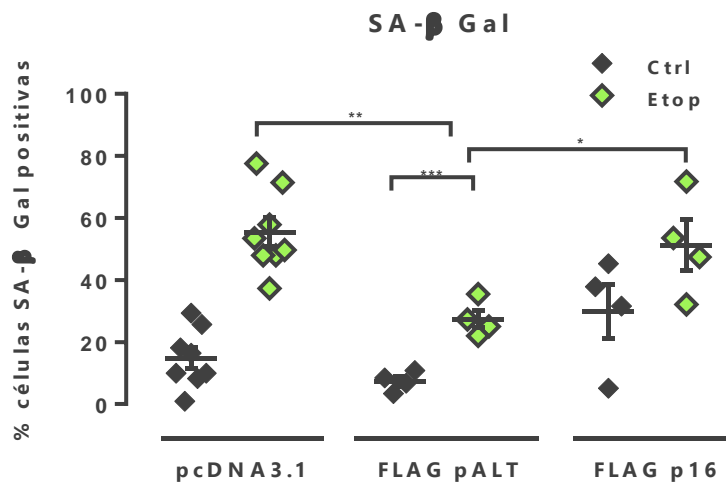


Figura 24. La expresión de pALT^{Ink4a/b} previno el incremento en la actividad de SA-β Gal inducida por el etopósido. Se transfectaron MEFs con el vector vacío, la construcción pcDNA3.1-FLAG pALT^{Ink4a/b} o la construcción pcDNA3.1-FLAG p16^{Ink4a} y se trataron con etopósido. **(A)** Imágenes representativas de la detección de la actividad de SA-β Gal tras 6 días *in vitro*. Se resalta la hipertrofia y aplanamiento celular (flechas en rojo) y **(B)** se graficó el promedio obtenido de células SA-β Gal positivas entre experimentos independientes. N=5 experimentos independientes. (ANOVA de un factor; *P < 0.01, **P < 0.05, ***P < 0.001) Las barras de error representan el error estándar de la media.

2.4.2 La expresión de pALT^{Ink4a/b} alteró la expresión de inhibidores del ciclo celular y del represor transcripcional HES1

Para confirmar que las células transfectadas con FLAG pALT^{Ink4a/b} son más resistentes a la senescencia celular y si se encuentran en un estado quiescente, se prosiguió a evaluar la expresión de los marcadores de senescencia celular p21^{Cip1}, p16^{Ink4a} y de quiescencia, HES1. Se transfectaron MEFs con FLAG pALT^{Ink4a/b}, FLAG p16^{Ink4a} o el vector vacío y tras 24 horas se trataron con etopósido. Se evaluó la expresión de las proteínas indicadas por ICW tras 6 días de inducción de senescencia con etopósido. Con respecto a la expresión de p21^{Cip1}, se observó un pequeño aumento en las células transfectadas con el vector vacío tratadas con etopósido con respecto al control. Sin embargo, en contra de lo esperado la expresión de p21^{Cip1} no cambió en las células transfectadas con FLAG pALT^{Ink4a/b} ni en aquellas

transfectadas con FLAG p16^{Ink4a} (figura 25). Finalmente, se evaluó la expresión de p16^{Ink4a}. En las células transfectadas con el vector vacío o con p16^{Ink4a} se observó un aumento en la expresión de p16^{Ink4a} tras el tratamiento con etopósido, con respecto al control. En cambio, las células transfectadas con FLAG pALT^{Ink4a/b} no se observó una inducción de la expresión de p16^{Ink4a} en respuesta al etopósido con respecto a aquellas sin tratamiento (Figura 26). Como se esperaba, la expresión de HES 1 disminuyó en respuesta a la inducción de senescencia con etopósido en células transfectadas con el vector vacío, lo cual no ocurrió en las células transfectadas con FLAG pALT^{Ink4a/b} o aquellas transfectadas con FLAG p16^{Ink4a} (figura 27).

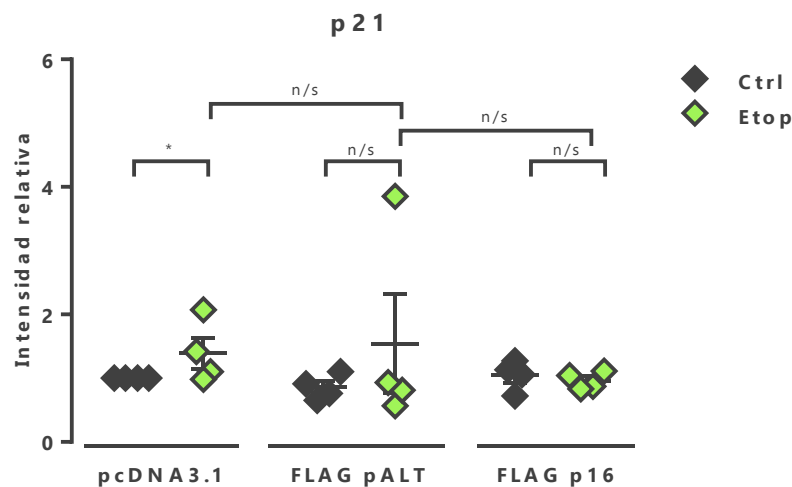


Figura 26. La expresión de pALT^{Ink4a/b} no previno el aumento en la expresión de p21^{Cip1} inducida por el etopósido. Se transfectaron MEFs con el vector vacío, la construcción pcDNA3.1- FLAG pALT^{Ink4a/b} o la construcción pcDNA3.1- FLAG p16^{Ink4a} y se trataron con etopósido. Se detectó la expresión de p21^{Cip1} por ICW. La intensidad de la señal de p21^{Cip1} se normalizó con respecto al total de células. Se graficó la intensidad relativa de fluorescencia de la señal de p21^{Cip1} en las células tratadas con etopósido con respecto a las células transfectadas con el vector vacío sin etopósido, n=4 experimentos independientes. Cada punto es el promedio de 3 réplicas de cada experimento. (ANOVA de un factor; P = sin significancia estadística). Las barras de error representan el error estándar de la media.

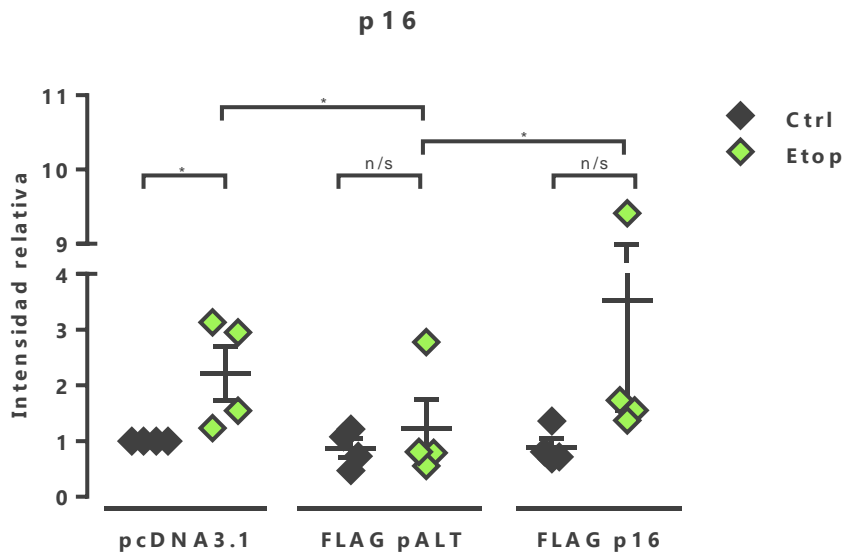


Figura 27. La expresión de pALT^{Ink4a/b} redujo el aumento en la expresión de p16^{Ink4a} inducida por el etopósido. Se transfetaron MEFs con el vector vacío, la construcción pcDNA3.1- FLAG pALT^{Ink4a/b} o la construcción pcDNA3.1- FLAG p16^{Ink4a} y se trataron con etopósido. Se detectó la expresión de p16^{Ink4a} por ICW. La intensidad de la señal de p16^{Ink4a} se normalizó con respecto al total de células. Se graficó la intensidad relativa de fluorescencia de la señal de p16^{Ink4a} en las células tratadas con etopósido con respecto a las células transfetadas con el vector vacío sin etopósido, n=4 experimentos independientes. Cada punto es el promedio de 3 réplicas de cada experimento. (ANOVA de un factor; P = sin significancia estadística). Las barras de error representan el error estándar de la media.

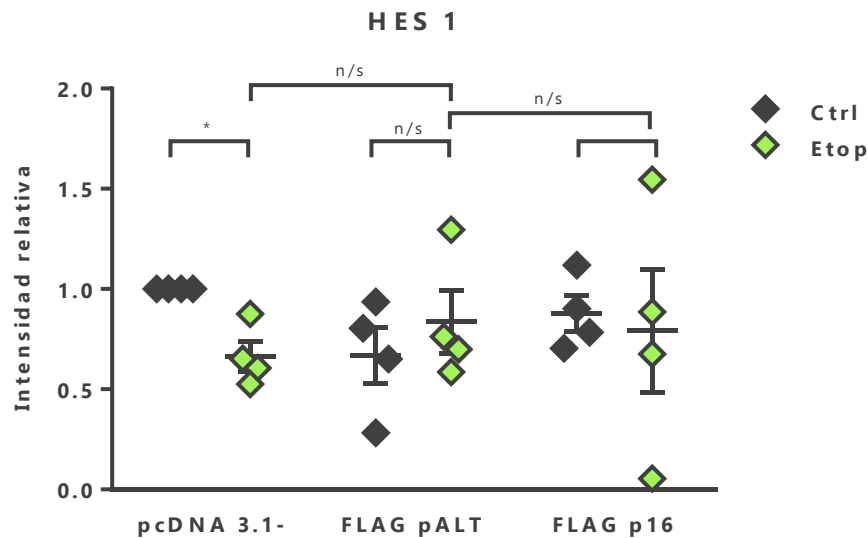
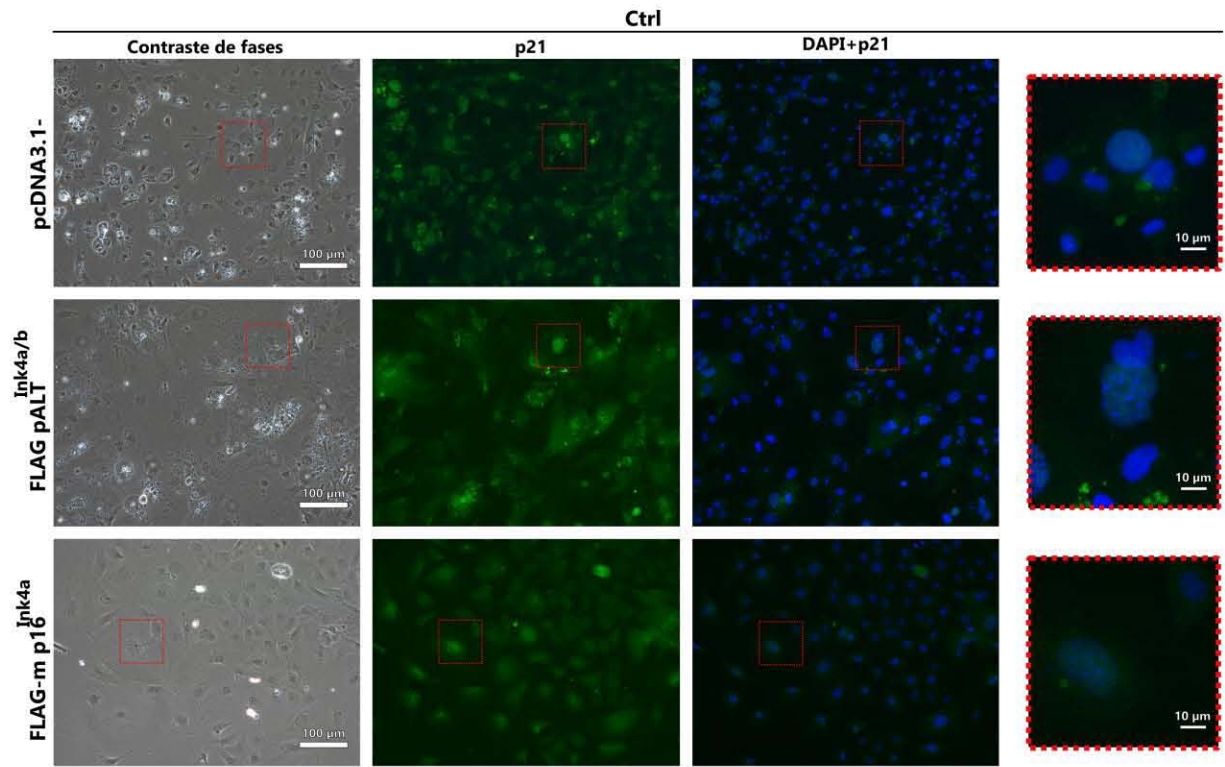
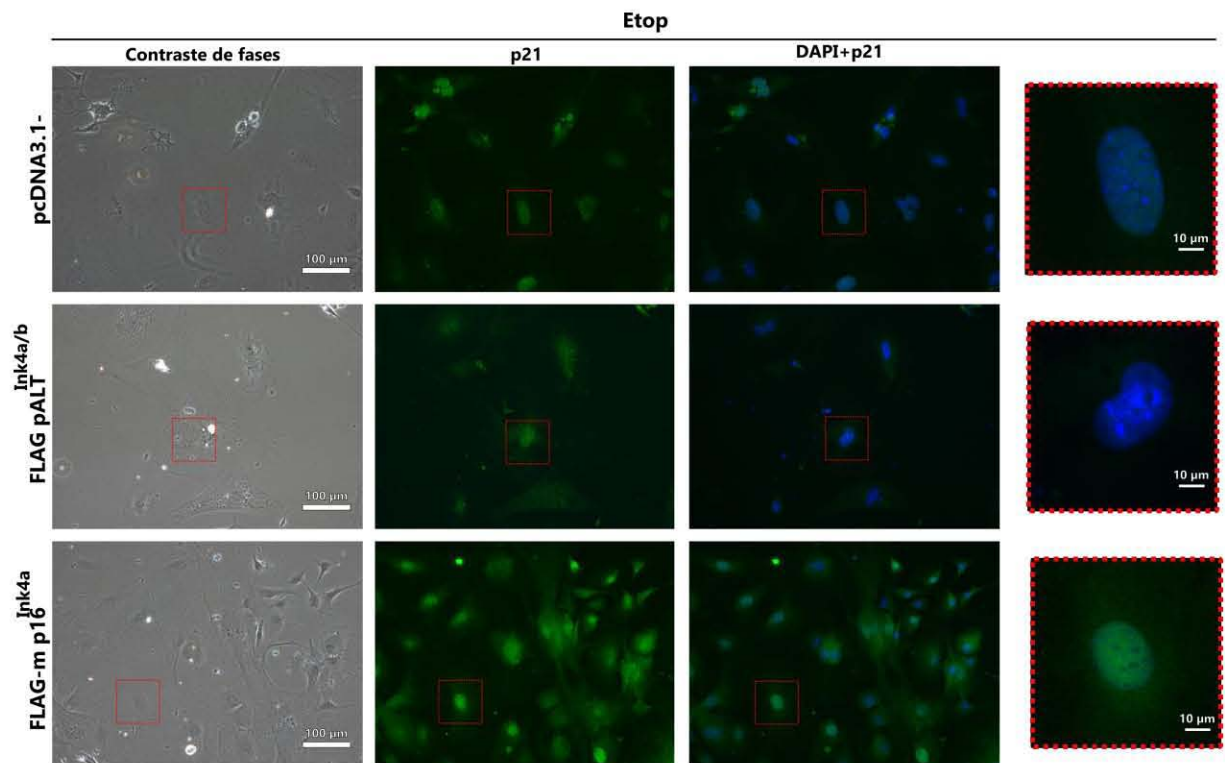


Figura 25. La expresión tanto de pALT^{Ink4a/b} como de p16^{Ink4a} evitaron que disminuyera la expresión de HES1 en respuesta al etopósido. Se transfectaron MEFs con el vector vacío, la construcción pcDNA3.1-FLAG pALT^{Ink4a/b} o la construcción pcDNA3.1-FLAG p16^{Ink4a} y se trataron con etopósido. Se detectó la expresión de HES1 por ICW. La intensidad de la señal de HES1 se normalizó con respecto al total de células. Se graficó la intensidad relativa de fluorescencia de la señal de HES1 en las células tratadas con etopósido con respecto a las células transfectadas con el vector vacío sin etopósido, n=4 experimentos independientes. Cada punto es el promedio de 3 réplicas de cada experimento. (ANOVA de un factor; *P < 0.01). Las barras de error representan el error estándar de la media.

p21^{Cip1} tiene una gran variedad de funciones que dependen de su localización subcelular. En el citoplasma cumple un papel principalmente anti apoptótico, pues se une a la caspasa 3 inhibiendo su actividad, así como a otros blancos, tales como JNK o ASK1. Su función como inhibidor de CDKs, se lleva a cabo de manera exclusiva en el núcleo⁸⁴. Dado que no se observaron diferencias significativas en la expresión p21^{Cip1} tras el tratamiento con etopósido, se consideró que podría cambiar su localización subcelular. Se observó por inmunofluorescencia que la localización nuclear de p21^{Cip1} aumenta en respuesta al etopósido, y que este aumento se previno al expresar pALT^{Ink4a/b}, pero no al expresar p16^{Ink4a}. (figura 28).

A**B**

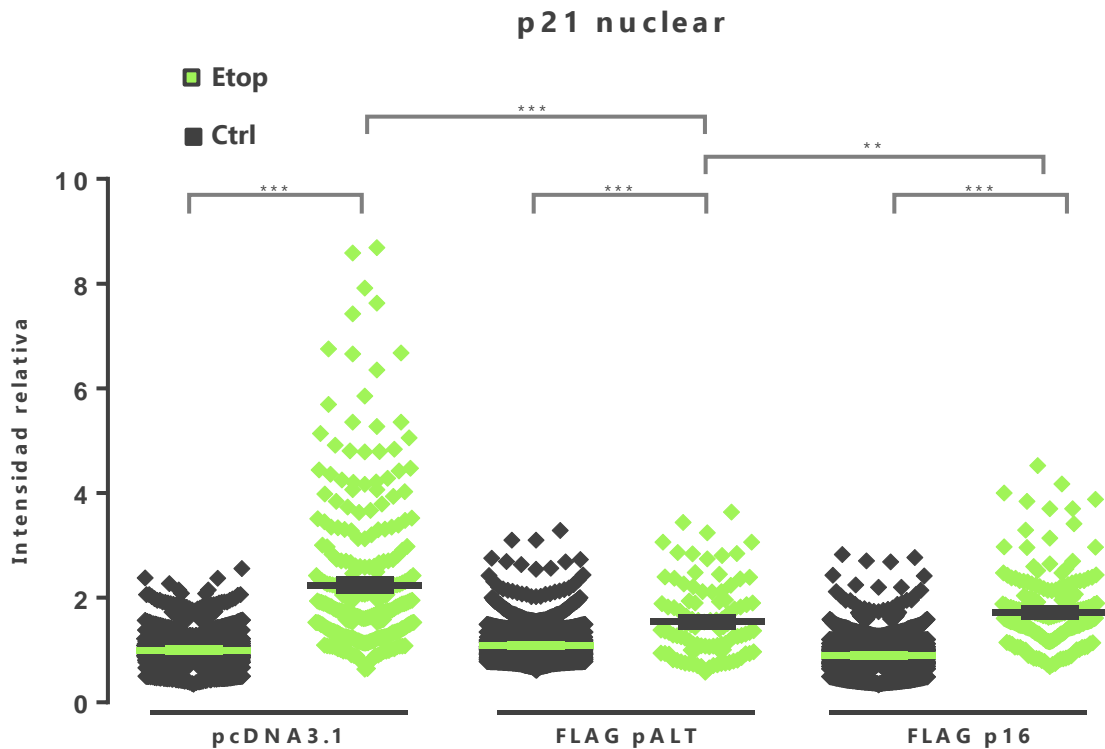


Figura 28. La expresión de pALT^{Ink4a/B} previene la traslocación nuclear de p21^{Cip1} inducida por el etopósido. Se transfectaron MEFs con el vector vacío, la construcción pcDNA3.1- FLAG pALT^{Ink4a/b} o la construcción pcDNA3.1- FLAG p16^{Ink4a} y se trataron con etopósido. **(A)** Se muestran imágenes representativas la morfología celular en contraste de fases, la inmunolocalización de p21^{Cip1} por epifluorescencia en verde y los núcleos teñidos con DAPI en las células transfectadas con los vectores indicados, tratadas o no con etopósido. **(B)** Se graficó la intensidad nuclear relativa de p21^{Cip1}. La intensidad de la señal nuclear de p21^{Cip1} se normalizó con respecto al promedio de la intensidad nuclear de las células transfectadas con el vector vacío sin tratamiento de cada experimento independiente n=3 experimentos independientes. Cada punto representa la intensidad nuclear de p21^{Cip1} normalizada de cada célula de cada experimento. Las barras representan el error estándar de la media. (ANOVA de un factor; **P < 0.05, ***P < 0.001)

2.4.3 La expresión de pALT^{Ink4a/b} previno la hipertrofia celular.

Por último, se evaluaron las características morfométricas de las células transfectadas con pALT^{Ink4a/b} tratadas con etopósido. Las células senescentes tanto en cultivo como *in vivo*,

tienen un marcado aumento en la superficie celular (hipertrofia), el cual se ha usado como un marcador para identificarlas⁶² así como un aumento en el tamaño nuclear⁸⁵. La relación entre la hipertrofia y el envejecimiento aún no se esclarece, sin embargo, en la literatura se sugiere una relación causal entre el tamaño celular y la longevidad. En experimentos realizados con levaduras se observó que la manipulación genética que favorece un aumento en el tamaño celular, reduce la longevidad, mutantes nulas como *cln3Δ*, *pph3Δ* o *apn1Δ*, un homólogo de la ciclina D en mamíferos, una serin/treonin fosfatasa y una endonucleasa respectivamente, presentan un aumento de tamaño que correlaciona directamente con una disminución en la longevidad cronológica⁸⁶. De manera congruente, la prevención en el aumento en el tamaño celular incrementa la longevidad en células de mamífero⁸⁷. Existe evidencia que sugiere que la activación persistente de la vía de mTOR en las células senescentes es el mecanismo principal por el cual ocurre la hipertrofia, pues induce la activación de vías anabólicas y la inhibición de vías catabólicas⁸⁸. De manera similar, la activación de mTOR en células quiescentes es suficiente para iniciar el proceso de geroconversión⁷³. Para comprobar si la expresión heteróloga de pALT^{Ink4a/b} previene el aumento en el área celular y nuclear. Se comparó la superficie celular (figura 29) y la superficie nuclear de células que expresaron pALT^{Ink4a/b} o p16^{Ink4a} y fueron tratadas o no con etopósido para inducir senescencia. Como se muestra en la figura 29, se observó que la expresión de pALT^{Ink4a/b} previene el incremento en el tamaño celular inducido por el tratamiento con etopósido si se compara con las células que expresaron FLAG p16^{Ink4a/b} o fueron transfectadas con el vector vacío. De manera sorprendente se observó que el tamaño del área nuclear en las células transfectadas con FLAG pALT^{Ink4a/b} tras el tratamiento con etopósido fue mayor que el de aquellas transfectadas con el vector vacío, pero menor con respecto a aquellas transfectadas con FLAG p16^{Ink4a/b}, aunque no de manera estadísticamente significativa (figura 30).

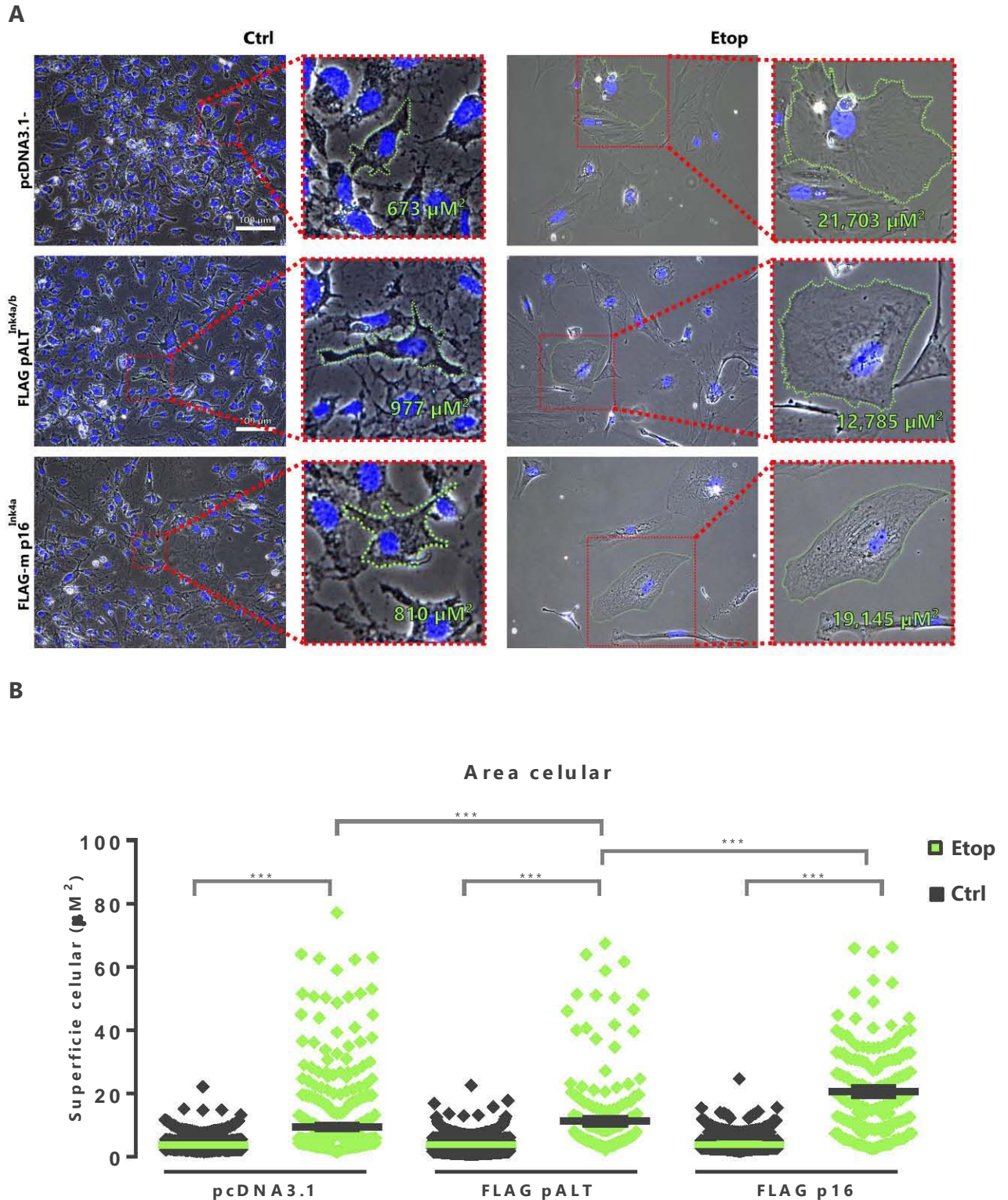
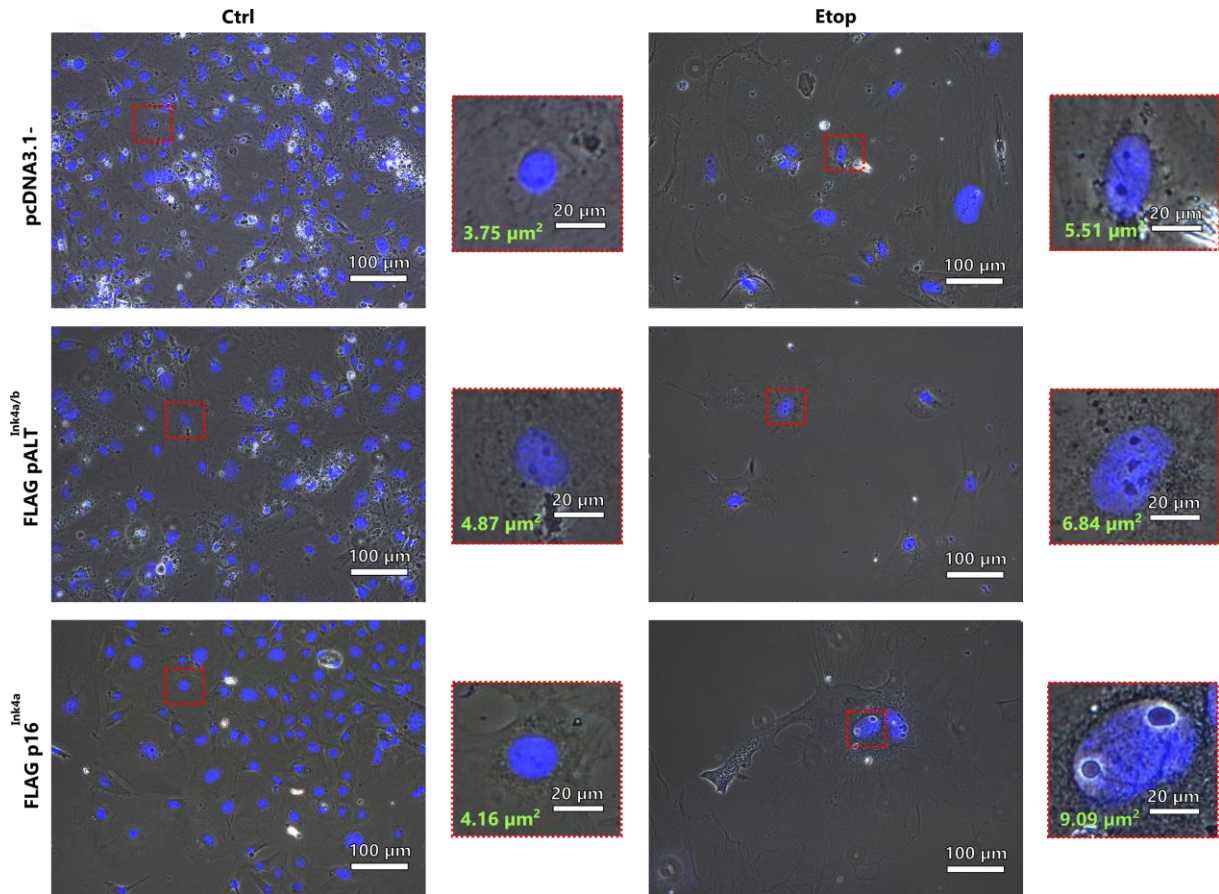


Figura 29. La expresión de pALT^{Ink4a/b} previno moderadamente el aumento en el área celular inducido por el etopósido. Se transfectaron MEFs con el vector vacío, la construcción pcDNA3.1- FLAG pALT^{Ink4a/b} o la construcción pcDNA3.1- FLAG p16^{Ink4a} y se

trataron con etopósido **(A)** Se muestran imágenes representativas en contraste de fases de las células transfectadas con los vectores indicados, tratadas o no con etopósido, se muestra la morfología celular en contraste de fases y los núcleos teñidos con DAPI. Se muestra una amplificación, indicando el tamaño celular en μm^2 **(B)** Se graficó la superficie celular en μm^2 , $n=4$ experimentos independientes. Cada punto representa el área celular de cada célula de cada experimento. (ANOVA de un factor; $P^* > 0.001$).

A



B

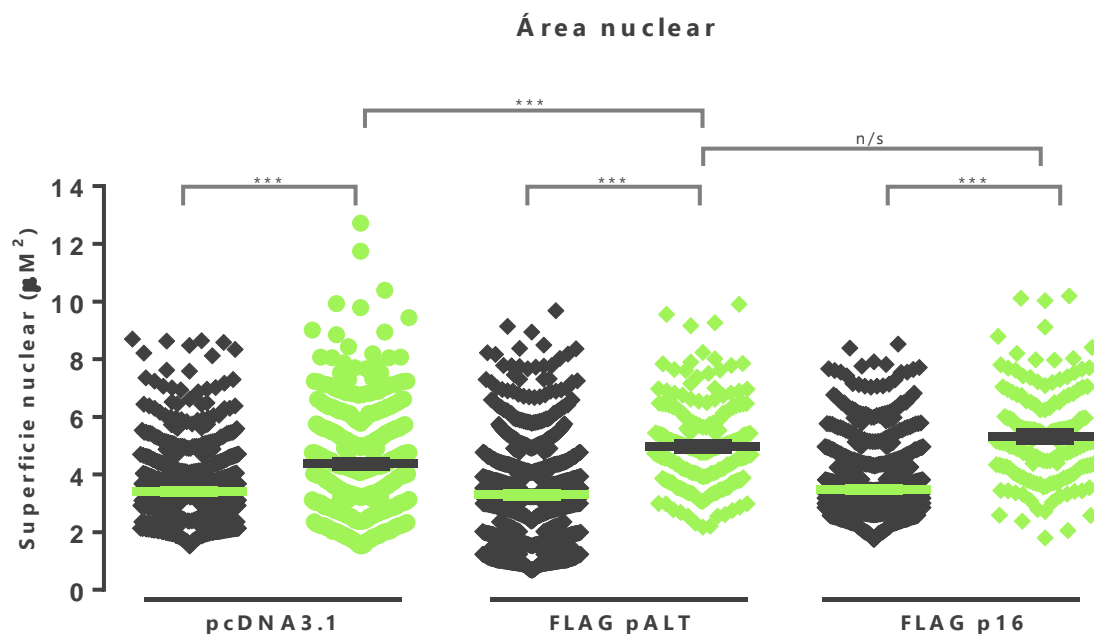


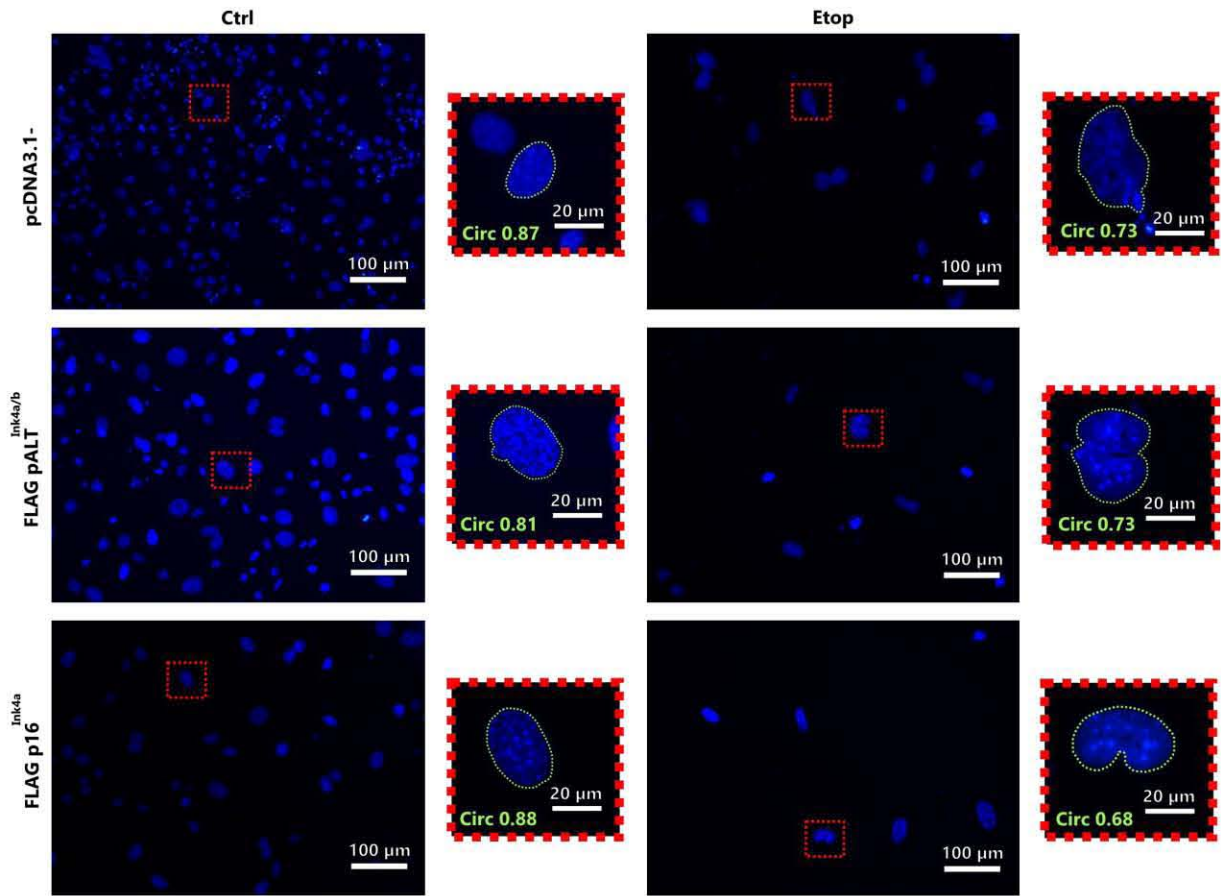
Figura 30. La expresión de pALT^{Ink4a/b} no previno el incremento en el área nuclear inducido por el etopósido. Se transfectaron MEFs con el vector vacío, la construcción pcDNA3.1- FLAG pALT^{Ink4a/b} o la construcción pcDNA3.1- FLAG p16^{Ink4a} y se trataron con etopósido **(A)** Se muestran imágenes representativas en contraste de fases de las células transfectadas con los vectores indicados, tratadas o no con etopósido, se muestra la morfología celular en contraste de fases y los núcleos teñidos con DAPI. Se muestra una amplificación, indicando el tamaño nuclear en μm^2 **(B)** Se graficó la superficie nuclear en μM^2 , n=6 experimentos independientes. Cada punto representa el área nuclear de cada núcleo de cada célula de cada experimento. (ANOVA de un factor; *P < 0.001). Las barras de error representan el error estándar de la media.

2.4.4 La expresión de pALT^{Ink4a/b} previno la deformación nuclear

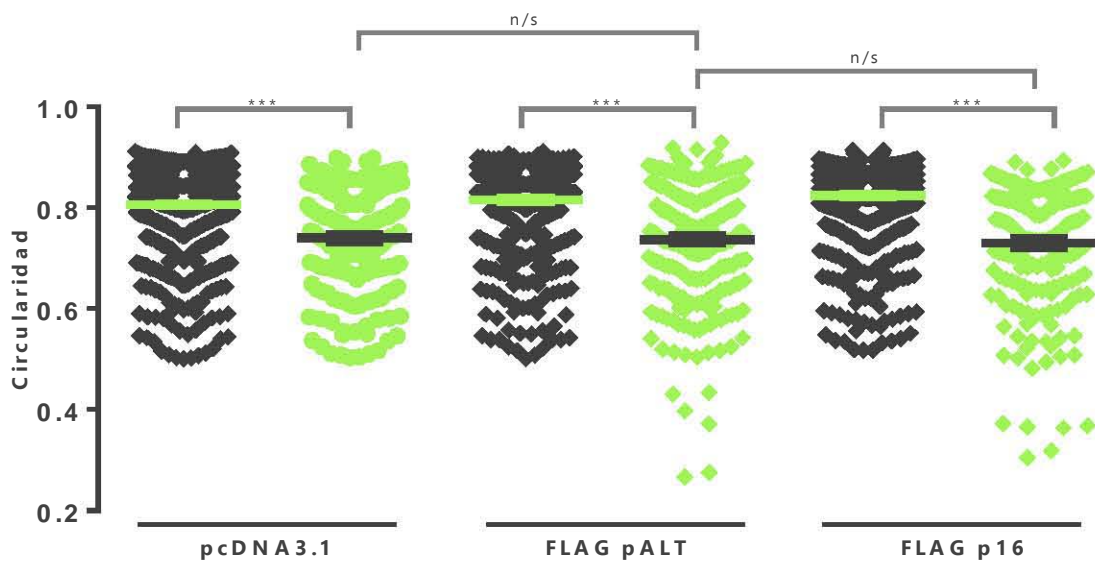
Finalmente, se evaluó la forma nuclear. Hoy en día se empieza a aceptar que hay una relación muy importante entre el tamaño y la morfología nuclear con una variedad de patologías como el cáncer, en la senescencia celular o inclusive durante el envejecimiento fisiológico⁸⁹. La morfología del núcleo está regulada principalmente por la lámina nuclear, que está formada por proteínas perinucleares que dan sostén y forma al núcleo. Sin embargo, esta no

es su única función, pues se ha demostrado que la lámina nuclear interactúa con la cromatina y tiene un papel importante en la regulación de la expresión genética. El síndrome de Hutchinson-Gilford es uno de los ejemplos de síndromes de progeria más estudiados. La enfermedad se debe a una mutación en la lámina A, resulta en la producción de una forma alternativa de splicing de la proteína, llamada progerina. Durante su procesamiento, la lámina A es farnesilada y des farnesilada para su transporte a la envoltura nuclear externa, en cambio la progerina permanece farnesilada, lo que favorece que permanezca en la envoltura nuclear interna y se produzcan alteraciones en la expresión genética y la forma del núcleo⁹⁰. Debido a esta única mutación, a partir de los primeros años de vida los pacientes recapitulan algunas características del envejecimiento en un tiempo acelerado, tales como enfermedades cardíacas, distrofia muscular, alopecia, osteoporosis, y artritis. De manera interesante, durante el envejecimiento se ha observado la acumulación de progerina, así como una disminución de la lámina A, lo que produce deformaciones en el núcleo^{91,92}. En las células senescentes, también hay un cambio drástico y evidente en la morfología nuclear, el cual puede ser medido para su identificación⁸⁵. En este trabajo se midió la circularidad de núcleos teñidos con DAPI, como una descripción de la morfología nuclear. Aquellos núcleos que se aproximen más a una forma con radio idéntico medido desde cualquier punto de la periferia, es decir un círculo, tendrán una circularidad que se aproxima a 1, mientras que aquellas que tienen un radio disimilar medido desde cualquier punto de la periferia hacia el centro, se aproximarán a un valor de 0. Se observó que las células transfectadas con el vector vacío, con pcDNA3.1- FLAG pALT^{Ink4a/b} o pcDNA3.1- FLAGp16^{Ink4a} que no fueron tratadas con etopósido, tuvieron una circularidad aproximada de 0.81, en cambio, las células tratadas con etopósido tuvieron una circularidad menor, que se aproximó a 0.70, sin importar si fueron transfectadas con el vector vacío, o expresaron FLAGpALT^{Ink4a/b} o FLAGp16^{Ink4a} (Fig. 31).

A



Circularidad nuclear



B

Figura 31. La expresión de pALT^{Ink4a/b} no previno la reducción en la circularidad nuclear inducida por el etopósido. Se transfectaron MEFs con el vector vacío, la construcción pcDNA3.1- FLAG pALT^{Ink4a/b} o la construcción pcDNA3.1- FLAG p16^{Ink4a} y se trataron con etopósido. **(A)** Se muestran imágenes representativas de la morfología nuclear de núcleos teñidos con DAPI. **(B)** Se midió y graficó la circularidad de los núcleos de células de 5 experimentos independientes. Cada punto representa la circularidad de cada núcleo de cada célula de cada experimento. (ANOVA de un factor; *P < 0.001). Las barras de error representan el error estándar de la media.

CONCLUSIÓN

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la expresión heteróloga de pALT^{Ink4a/b} de *H. glaber* en células de ratón redujo el establecimiento de la senescencia celular inducida por daño al DNA, ya que observamos que se evitó el incremento en la actividad de SA-β Gal, redujo la expresión de p16^{Ink4a}, y la localización nuclear de p21^{Cip1}, así como la hipertrofia celular, aunque no previno la deformación del núcleo. Con respecto al mantenimiento de la quiescencia, la expresión de heteróloga de pALT^{Ink4a/b} previno la disminución en la expresión del marcador de quiescencia celular HES1 tras el tratamiento con etopósido, sugiriendo que la expresión de pALT^{Ink4a/b} y quizá es suficiente para promover algunos mecanismos que ayudan a mantener la quiescencia.

DISCUSIÓN

H. glaber es un ejemplo de longevidad exitosa, pues no recapitula el deterioro progresivo y disminución en la capacidad reproductiva en función del tiempo característico de los organismos que envejecen. *H. glaber* es un animal fosorial de clima árido, que de manera natural tiene que soportar altos niveles de CO₂, bajos niveles de oxígeno, acceso limitado a alimentos y otros tipos de estrés relacionados a la vida subterránea. Paradójicamente, la vida subterránea tiene amplios beneficios sobre la vida al aire libre. Las madrigueras subterráneas permiten que las condiciones de temperatura y humedad sean estables por periodos

prolongados de tiempo independientemente de las condiciones climatológicas a lo largo del año o durante los ciclos de día y noche, este mismo hábitat hace difícil la depredación. Un riesgo bajo de depredación y un hábitat estable reducen el riesgo de mortalidad extrínseca, lo que permite la evolución de estrategias reproductivas en las cuales existen pocas crías por camada, con un tiempo juvenil prolongado, pero muchos eventos reproductivos a lo largo de la vida. Esta estrategia reproductiva favorece la aparición de fenotipos longevos, pues para que sea exitosa, desde un punto de vista evolutivo, una manera de aumentar el número de crías del organismo, es favorecer un tiempo prolongado de vida y por consiguiente maximizar el número de eventos reproductivos⁹³. Paralelamente, este tipo de estrategias de historia de vida favorecen fuertemente la selección negativa de características que disminuyan el tiempo de vida reproductivo, como enfermedades degenerativas asociadas a la edad, y en general el envejecimiento. Los elefantes, las ballenas, los murciélagos o las tortugas son ejemplos de animales longevos con una baja depredación.

La acumulación de células senescentes en los tejidos es considerada uno de los pilares del envejecimiento. Hasta el día de hoy, no se sabe si esta acumulación también ocurre en *H. glaber* como en el resto de los mamíferos. En 2016 se demostró que ante estímulos de daño al DNA, las células de *H. glaber* se vuelven senescentes, aunque requieren mayor estímulo de daño que las células de ratón⁷⁹. Pero de manera aún más interesante para el estudio del envejecimiento, se observó que, durante el desarrollo, aparecen poblaciones transitorias de células en senescencia programada en nichos muy específicos, como es usual en el desarrollo de otros organismos como el ratón⁹⁴ o anfibios. Esto es importante, pues demuestra que, de manera fisiológica, el programa genético para establecer el fenotipo de senescencia celular existe en *H. glaber*, pero aún más porque sugiere que en este organismo existen mecanismos que evitan ya sea el daño que provocan las células senescentes durante el envejecimiento, o bien la acumulación de células senescentes no ocurre. Estudiar cuál es el mecanismo por el cual *H. glaber* evita el deterioro asociado al envejecimiento provocado por la acumulación de las células senescentes, es un campo que aún no se ha estudiado, pero que promete ser una interesante fuente de información sobre cómo ha evolucionado el envejecimiento, y cómo se

puede intervenir clínicamente. En este trabajo se aborda por primera vez cuál puede ser uno de los mecanismos moleculares que ha evolucionado en *H. glaber* para contender con el efecto deletéreo de las células senescentes.

El daño al DNA es uno de los desencadenantes de senescencia celular a los que las células adultas están más expuestas, el daño al DNA ocurre en consecuencia de muchos procesos celulares como la replicación celular, la señalización redox, la activación de oncogenes o el acortamiento de los telómeros⁴⁸. La radiación ionizante también es uno de los desencadenantes ambientales de la respuesta de daño al DNA más comunes a los que las células están expuestas constantemente. Las células de *H. glaber* son más resistentes a la senescencia celular inducida por daño al DNA tanto por radiación ionizante como por expresión de oncogenes. En este trabajo se demostró que la expresión heteróloga de pALT^{Ink4a/b} de *H. glaber* en células de ratón, fue suficiente para prevenir el incremento de ciertos marcadores de senescencia celular inducida por daño al DNA. Hasta el día de hoy solamente existe un reporte sobre la función de pALT^{Ink4a/b}, se sabe que es un inhibidor del ciclo celular y que participa en la inhibición por contacto⁸⁰. En nuestro trabajo se demostró que la secuencia de proteína de pALT^{Ink4a/b} es muy similar tanto a p16^{Ink4a}, como a p15^{Ink4b}. Las repeticiones de anquirina son secuencias conservadas que constituyen motivos de interacción proteína-proteína⁹⁵. En el caso de p15^{Ink4b} y p16^{Ink4} se sabe que tienen un dominio con 4 repeticiones de anquirina y que estas repeticiones son requeridas para la interacción con CDK4 y CDK6, pero son particularmente importantes las últimas 2, que constituyen el dominio mínimo funcional de p16^{Ink4a}⁹⁶. Un análisis más detallado de la secuencia de aminoácidos muestra que el dominio con repeticiones de anquirina, también se encuentra conservado en pALT^{Ink4a/b} (Figura 32), lo que sugiere fuertemente que también inhibe el ciclo celular a través de la vía de Rb/E2F. En contraste, los aminoácidos que sufren modificaciones postraduccionales y que son importantes en la regulación de la actividad de p16^{Ink4a} no se encuentran conservados en pALT^{Ink4a/b}, lo que sugiere algunas cosas sobre su función.

Alineamiento múltiple de proteínas con pALT^{Ink4a/b}

Longitud: 141 nucleótidos

	pALT^{Ink4a/b}	1	MREEDKSMLSGGGCDVDLANAAARGQVETVRHLLDAGADPNVAVNRFGRRIQ	52
p15 ^{Ink4b}	<i>M. musculus</i>	1	-----ML-GGSSDAGLA T AAARGQVETVRQLLEAGADPNALNRFGRRIQ	44
p15 ^{Ink4b}	<i>H. sapiens</i>	1	MREENKGMPSGGGSDGLA S AAARGLVEKVRQLLEAGADPNGVNRFGRRAIQ	52
p16 ^{Ink4a}	<i>M. musculus</i>	1	ME-----SAADRLARAAAQGRVHVRALLEAGVSPNAPNSFGRTPIQ	42
p16 ^{Ink4a}	<i>H. sapiens</i>	1	M-EPAAG SS MEPSA-DWLATAAARGRVVWVRALLEAGALPNAPNS V GRRIQ	50
			Repetición de ankyrina	
	pALT^{Ink4a/b}	53	VMMMGNTQVAALLLLHGADPNCADPVTLTLPVHDAARAGFLDTLVALHRAGA	105
p15 ^{Ink4b}	<i>M. musculus</i>	45	VMMGSAQVAEALLLLHGAEPNCADPATLTPRVHDAAREGFLDTLVVLRHAGA	97
p15 ^{Ink4b}	<i>H. sapiens</i>	53	VMMGSAQVAEALLLLHGAEPNCADPATLTPRVHDAAREGFLDTLVVLRHAGA	105
p16 ^{Ink4a}	<i>M. musculus</i>	43	VMMMGNVHVAALLLLNYGADSNCEPDTTFSRPVHDAAREGFLDTLVVLRHAGA	95
p16 ^{Ink4a}	<i>H. sapiens</i>	51	VMMGSAQVAEALLLLHGAEPNCADPATLTPRVHDAAREGFLDTLVVLRHAGA	103
			Repetición de ankyrina	
	pALT^{Ink4a/b}	106	RLDVRDTWGRLPVDLAEEQGHREVARYLRDVVGDV -----	141
p15 ^{Ink4b}	<i>M. musculus</i>	98	RLDVCD A WGRLPVDLAEEQGH R DIARYLHAATGD-----	131
p15 ^{Ink4b}	<i>H. sapiens</i>	106	RLDVRD A WGRLPVDLAEEQGH R DVAGYLRATATGD-----	140
p16 ^{Ink4a}	<i>M. musculus</i>	96	RLDVRD A WGRLPLDLA Q ERGHQ D IVRYL R SAGCSLCSAGWSLCTAGNV-AQT	147
p16 ^{Ink4a}	<i>H. sapiens</i>	104	RLDVRD A WGRLPVDLAEE L GH R DVARYL R AAAGGT R GSNHARIDAAEGP S DI	156
			Repetición de ankyrina	
	pALT^{Ink4a/b}	141	-----	141
p16 ^{Ink4a}	<i>M. musculus</i>	148	DGHSFSSSTPRALELRGQ S Q E Q S	170
p16 ^{Ink4a}	<i>H. sapiens</i>	157	PD-----	158

Figura 32. Análisis de la secuencia de pALT^{Ink4a/b}. Se realizó un alineamiento múltiple de proteínas entre la secuencia de aminoácidos de pALT^{Ink4a/b} y p15^{Ink4b} o p16^{Ink4a} tanto de ratón (*M. musculus*) como de humano (*H. sapiens*). Se destacan las repeticiones de anquirina (rojo) y los aminoácidos que sufren modificaciones postraduccionales como fosforilaciones (verde) y metilaciones (azul).

IKK β fosforila a p16^{Ink4a} en la serina 8 e inhibe su actividad⁹⁷, de manera similar la fosforilación de la serina 140 también tiene un efecto inhibitorio. La metilación de la arginina 138, que tampoco se encuentra conservada en pALT^{Ink4a/b} favorece la interacción con CDK4 y por consiguiente la inhibición del ciclo celular. El único residuo de aminoácidos que sufre modificaciones postraduccionales y que se encuentra conservado entre p16^{Ink4a} y pALT^{Ink4a/b}, es la arginina 131, que es metilada antes de la entrada a la fase G1, lo cual inhibe la actividad de p16^{Ink4a}, y permite la progresión del ciclo celular⁹⁸. Pero de manera más interesante, se ha observado que las fosforilaciones en la serina 7, serina 8, serina 140 y serina 152 ocurren en fibroblastos humanos senescentes, pero de ellos solamente se ha observado la fosforilación de la serina 152 en el complejo de p16^{Ink4}/CDK4⁹⁹, lo que sugiere que la fosforilación en la serina 7, 8 y 140 puede tener un efecto no relacionado con la detención del ciclo celular, pero

con la regulación y mantenimiento de la senescencia celular que aún no se ha descrito, y que no comparte con otros productos de locus como pALT^{Ink4a/b} y p15^{Ink4b} pues se sabe que la expresión de p16^{Ink4a} es suficiente para iniciar el programa de senescencia⁵⁴, sin embargo el mecanismo por el cual sucede aún no se conoce del todo. Se sabe que la expresión de p16^{Ink4a} es necesaria para la formación del SAHF⁴², pero no se sabe cuál es el mecanismo, y quizá podría estar relacionado con modificaciones postraduccionales como las que se mencionan. El SAHF es una característica conservada en la mayoría de las células senescentes¹⁰⁰, y esta remodelación de la heterocromatina es fundamental para el silenciamiento de genes asociados a la progresión del ciclo celular¹⁰¹. Otra función poco estudiada de p16^{Ink4a} es que se asocia al dominio carboxilo terminal de la RNA polimerasa II e impide su fosforilación, implicando a p16^{Ink4a} en la regulación transcripcional⁵⁶, sin embargo el papel de esta interacción en la senescencia celular no se ha investigado. Finalmente, una observación importante, es que durante el ciclo celular, los productos del locus *Ink4* como p15^{Inkb} y p16^{Ink4a} compiten y desplazan del complejo CDK/Ciclina a otros inhibidores del ciclo celular como p27^{Kip1}, el cual está implicado en la detención del ciclo celular principalmente en las células en quiescencia, este desplazamiento facilita la degradación del inhibidor de CDKs desplazado⁷⁶. En este trabajo se observó que la expresión de pALT^{Ink4a/b} ocurre en paralelo con una disminución en la expresión de p16^{Ink4a}, sugiriendo que quizá pALT^{Ink4a/b} es capaz de desplazarlo y favorecer su degradación, previniendo la formación del SAHF y la senescencia celular. Estas diferencias en las modificaciones postraduccionales y en la regulación podrían explicar por qué la expresión de p16^{Ink4a} induce senescencia celular, pero no la expresión de pALT^{Ink4a/b}. Por otro lado, p16^{Ink4a} es considerado un supresor tumoral, y mutaciones puntuales que generan la sustitución de residuos de aminoácidos y reducen su actividad como inhibidor de CDKs, generalmente se asocian al desarrollo de tumores y de cáncer. Existen algunas variaciones en la secuencia de p16^{Ink4a} asociadas a diferentes tipos de cáncer, que existen en la secuencia de pALT^{Ink4a/b}, la sustitución R24P se ha reportado en pacientes con melanoma, la E33D en familias con antecedentes de melanoma, y en tumores de tracto biliar y R80L en cáncer de cuello y cabeza¹⁰². A pesar de que la secuencia de pALT^{Ink4a/b}, y por consiguiente también su secuencia de p16^{Ink4a} tiene estas sustituciones que pueden ser

deletéreas en p16^{Ink4a} de humano, *H. glaber* es resistente al desarrollo de tumores. En este trabajo se observó que la expresión heteróloga de pALT^{Ink4a/b} previene el establecimiento de la senescencia celular, que es un mecanismo antitumoral, pero no se observó ninguna transformación maligna, lo que sugiere que las sustituciones en la secuencia no son suficientes para producir el desarrollo de tumores. Esta observación apoya la idea de que las modificaciones postraduccionales que pueden ocurrir en p16^{Ink4a}, pero no en pALT^{Ink4a/b} pueden ser la explicación por la cual pALT^{Ink4a/b}, a pesar de tener una secuencia similar a p16^{Ink4a} detiene el ciclo celular, pero evita la senescencia, y porqué a pesar de contener sustituciones que son deletéreas en su homóloga humana, *H. glaber* es más resistente a la transformación maligna, y en consecuencia entender cómo es que pueden evolucionar mecanismos que favorecen la longevidad y evitan el envejecimiento en este increíble animal.

CONCLUSIÓN

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la expresión heteróloga de pALT^{Ink4a/b} de *H. glaber* en células de ratón redujo el establecimiento de la senescencia celular inducida por daño al DNA, ya que observamos que se evitó el incremento en la actividad de SA-β Gal, redujo la expresión de p16^{Ink4a}, y la localización nuclear de p21^{Cip1}, así como la hipertrofia celular, aunque no previno la deformación del núcleo. Con respecto al mantenimiento de la quiescencia, la expresión de heteróloga de pALT^{Ink4a/b} previno la disminución en la expresión del marcador de quiescencia celular HES1 tras el tratamiento con etopósido, sugiriendo que la expresión de pALT^{Ink4a/b} quizá es suficiente para promover algunos mecanismos que ayudan a mantener la quiescencia.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Beatriz Aguilar Maldonado por su apoyo en el área técnica y profesional y por los comentarios que ayudaron a guiar el trabajo. Al Dr. Jorge Antolio Domínguez, a la Dra. Melanie Hüttenrauch, a la M. en C. Pilar Sarah Acevo Rodríguez, al M. en C. Daniel Moreno

Blas, al M. en C. Gabriel Muciño Hernández, a la Lic. Elisa Gorostieta Salas y al Lic. Alexander Pommer Alba por sus comentarios y discusiones. Al Dr. Francisco Torres, a la Dra. Mina Konnigsberg, al Dr. Gustavo Pedraza, a la Dra. Soledad Funes y al Dr. Bulmaro Cisneros por sus comentarios sobre el trabajo escrito. Al CONACYT por el apoyo económico recibido durante la duración de la maestría, y A PAPYT-UNAM IN206015 por el apoyo económico recibido para la realización del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Walker, L. C. & Herndon, J. G. Mosaic aging. *Med Hypotheses* **74**, 1048–1051 (2010).
2. Camarda, C. G. *et al.* Diversity of ageing across the tree of life. *Nature* **9**, 169–173 (2013).
3. Kirkwood, T. B. L. Understanding the odd science of aging. *Cell* **120**, 437–447 (2005).
4. Hughes, K. A. Mutation and the evolution of ageing: From biometrics to system genetics. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **365**, 1273–1279 (2010).
5. Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R. & Buttemer, W. A. Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. *Physiol. Rev.* **87**, 1175–1213 (2007).
6. Schieber, M. & Chandel, N. S. ROS function in signaling and oxidative stress. *NIH public access* **24**, 453–462 (2014).
7. Andziak, B., O'Connor, T. P. & Buffenstein, R. Antioxidants do not explain the disparate longevity between mice and the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 1206–1212 (2005).
8. Kirkwood, T. The evolution of aging. *Rev. Clin. Gerontol.* **5**, 3 (1995).
9. Carter, A. J. R. & Nguyen, A. Q. Antagonistic pleiotropy as a widespread mechanism for the maintenance of polymorphic disease alleles. *BMC Med. Genet.* **12**, 160 (2011).
10. Kirkwood, T. B. L. Evolution of ageing. *Nature* **270**, 301–303 (1977).
11. Shenoi, V. N., Ali, S. Z. & Prasad, N. G. Evolution of increased adult longevity in *Drosophila melanogaster* populations selected for adaptation to larval crowding. **29**, 407–417 (2016).
12. Morbey, Y. E., Brassil, C. E. & Hendry, A. P. Rapid Senescence in Pacific Salmon. *Am. Nat.* **166**, 556–568 (2005).

13. Fabian, D. & Flatt, T. Life History Evolution. *Nat. Educ.* **3**, 24 (2014).
14. Roff, D. A. in *Mechanisms of Life History Evolution* (eds. Flatt, T. & Heyland, A.) 469 (Oxford University Press, 2011).
15. Valcu, M., Dale, J., Griesser, M., Nakagawa, S. & Kempenaers, B. Global gradients of avian longevity support the classic evolutionary theory of ageing. *Ecography (Cop.)* **37**, 930–938 (2014).
16. Austad, S. N. & Fischer, K. E. Mammalian Aging, Metabolism and Ecology. Evidence From the Bats and Marsupials. *J. Gerontol.* **46**, 47–53 (1991).
17. Murphy, W. J. *et al.* Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature* **409**, 614–618 (2001).
18. Buffenstein, R. The naked mole-rat: A new long-living model for human aging research. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **60**, 1369–1377 (2005).
19. Park, T. J. *et al.* Fructose-driven glycolysis supports anoxia resistance in the naked mole-rat. *Science (80-.)* **356**, 307–311 (2017).
20. Goldman, B. D., Goldman, S. L., Lanz, T., Magaurin, A. & Maurice, A. Factors influencing metabolic rate in naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*). *Physiol. Behav.* **66**, 447–459 (1999).
21. Buffenstein, R. & Yahav, S. Is the naked mole-rat *Heterocephalus glaber* an endothermic yet poikilothermic mammal? *J. Therm. Biol.* **16**, 227–232 (1991).
22. Edrey, Y. H., Hanes, M., Pinto, M., Mele, J. & Buffenstein, R. Successful Aging and Sustained Good Health in the Naked Mole Rat: A Long-Lived Mammalian Model for Biogerontology and Biomedical Research. **52**, 41–53 (2011).
23. Williams, S. A. & Shattuck, M. R. Ecology, longevity and naked mole-rats: Confounding effects of sociality? *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **282**, 1–3 (2015).
24. Faulkes, C. G. & Bennett, N. C. Plasticity and constraints on social evolution in African mole-rats: Ultimate and proximate factors. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **368**, 20120347 (2013).
25. Boomsma, J. J. Lifetime monogamy and the evolution of eusociality. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **364**, 3191–3207 (2009).
26. Delaney, M. A. *et al.* Initial Case Reports of Cancer in Naked Mole-rats (*Heterocephalus glaber*). *Vet. Pathol.* **53**, 691–696 (2015).
27. Sherman, P. W. & Jarvis, J. U. M. Extraordinary life spans of naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*). *J. Zool.* **258**, 307–311 (2002).
28. Ruby, J. G., Smith, M. & Buffenstein, R. Naked mole-rat mortality rates defy gompertzian laws by not increasing with age. *Elife* **7**, (2018).

29. Zhao, S. *et al.* High autophagy in the naked mole rat may play a significant role in maintaining good health. *Cell. Physiol. Biochem.* **33**, 321–332 (2014).
30. Tian, X. *et al.* High molecular weight hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole-rat. *Nature* **499**, 346–349 (2013).
31. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **153**, (2013).
32. Hayflick, L. & Moorhead, P. S. Hayflick and Moorhead Characterize Cellular Senescence in Primary Human Cells. *Exp. Cell Res.* **1**, 585–621 (1961).
33. Chen, J. H., Hales, C. N. & Ozanne, S. E. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: Causal or correlative? *Nucleic Acids Res.* **35**, 7417–7428 (2007).
34. Tacutu, R., Budovsky, A., Yanai, H. & Fraifeld, V. E. Molecular links between cellular senescence, longevity and age-related diseases - A systems biology perspective. *Aging (Albany, NY)*. **3**, 1178–1191 (2011).
35. Coppé, J.P., Desprez, P.Y., Krtolica, A. C. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **5**, 99–118 (2010).
36. Jeyapalan, J. C. & Sedivy, J. M. Cellular senescence and organismal aging. *Mech. Ageing Dev.* **129**, 467–474 (2008).
37. Lee, B. Y. *et al.* Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187–195 (2006).
38. Höhn, A. & Grune, T. Lipofuscin: Formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biol.* **1**, 140–144 (2013).
39. Zhang, R. *et al.* Formation of macroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev. Cell* **8**, 19–30 (2005).
40. Rogakou, E. P. & Sekeri-Pataryas, K. E. Histone variants of H2A and H3 families are regulated during in vitro aging in the same manner as during differentiation. *Exp. Gerontol.* **34**, 741–754 (1999).
41. Funayama, R. & Ishikawa, F. Cellular senescence and chromatin structure. *Chromosoma* **116**, 431–440 (2007).
42. Narita, M. *et al.* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703–716 (2003).
43. Shay, J. W., Pereira-Smith, O. M. & Wright, W. E. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp. Cell Res.* **196**, 33–39 (1991).
44. Beauséjour, C. M. *et al.* Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and

- p16 pathways. *EMBO J.* **22**, 4212–4222 (2003).
45. Hickman, E. S., Moroni, M. C. & Helin, K. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 60–66 (2002).
 46. Kuo, L. J. & Yang, L. X. γ -H2AX- A novel biomaker for DNA double-strand breaks. *In Vivo (Brooklyn)*. **22**, 305–310 (2008).
 47. Pan, M. R., Li, K., Lin, S. Y. & Hung, W. C. Connecting the dots: From DNA damage and repair to aging. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
 48. D’Adda Di Fagagna, F. Living on a break: Cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 512–522 (2008).
 49. Sharpless, N. E. & Sherr, C. J. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 397–408 (2015).
 50. Sherr, C. J. Ink4-Arf locus in cancer and aging. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **1**, 731–741 (2012).
 51. Ouelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R. A. & Sherr, C. J. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* **83**, 993–1000 (1995).
 52. Harada, K. & Ogden, G. R. An overview of the cell cycle arrest protein, p21(WAF1). *Oral Oncol.* **36**, 3–7 (2000).
 53. Bieging, K. T., Mello, S. S. & Attardi, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 359–370 (2014).
 54. Coppé, J. P. *et al.* Tumor suppressor and aging biomarker p16INK4a induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J. Biol. Chem.* **286**, 36396–36403 (2011).
 55. Macip, S. *et al.* Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J.* **21**, 2180–2188 (2002).
 56. Serizawa, H. Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p16INK4A Inhibits Phosphorylation of RNA Polymerase II by General Transcription Factor TFIIH. *J. Biol. Chem.* **273**, 5427–5430 (1998).
 57. Bracken, A. P. *et al.* The Polycomb group proteins bind throughout the. *Genes Dev.* **21**, 525–530 (2007).
 58. Gil, J. & Peters, G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: All for one or one for all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 667–677 (2006).
 59. Muñoz-Espín, D. & Serrano, M. Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 482–496 (2014).

60. Rajagopalan, S. & Long, E. O. Cellular senescence induced by CD158d reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 20596–20601 (2012).
61. Demaria, M. *et al.* An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. **31**, 722–733 (2014).
62. Biran, A. *et al.* Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell* **16**, 661–671 (2017).
63. Sato, S. *et al.* Ablation of the p16 INK4a tumour suppressor reverses ageing phenotypes of klotho mice. *Nat. Commun.* **6**, 7035 (2015).
64. Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184–189 (2016).
65. Van Deursen, J. M. The role of senescent cells in ageing. *Nature* **509**, 439–446 (2014).
66. Campisi, J. & D'Adda Di Fagagna, F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 729–740 (2007).
67. Yang, N. C. & Hu, M. L. The limitations and validities of senescence associated- β -galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Exp. Gerontol.* **40**, 813–819 (2005).
68. Dikovskaya, D. *et al.* Mitotic Stress Is an Integral Part of the Oncogene-Induced Senescence Program that Promotes Multinucleation and Cell Cycle Arrest. *Cell Rep.* **12**, 1483–1496 (2015).
69. Aramburu, J., Ortells, M. C., Tejedor, S., Buxadé, M. & López-Rodríguez, C. Transcriptional regulation of the stress response by mTOR. *Sci. Signal.* **7**, 1–11 (2014).
70. Laplante, M. & Sabatini, D. M. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J. Cell Sci.* **126**, 1713–1719 (2013).
71. Pattingre, S., Espert, L., Biard-Piechaczyk, M. & Codogno, P. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie* **90**, 313–323 (2008).
72. Terzi, M. Y., Izmirli, M. & Gogebakan, B. The cell fate: senescence or quiescence. *Mol. Biol. Rep.* **43**, 1213–1220 (2016).
73. Leontieva, O. V., Demidenko, Z. N. & Blagosklonny, M. V. Contact inhibition and high cell density deactivate the mammalian target of rapamycin pathway, thus suppressing the senescence program. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 8832–8837 (2014).
74. Liu, Z. H., Dai, X. M. & Du, B. Hes1: A key role in stemness, metastasis and multidrug resistance. *Cancer Biol. Ther.* **16**, 353–359 (2015).
75. Sang, L., Collier, H. A. & Roberts, J. M. Control of the Reversibility of Cellular Quiescence by the Transcriptional Repressor HES1. *Science (80-.).* **321**, 1095–1100 (2008).

76. Gheghiani, L. & Gavet, O. Cell Cycle Oscillators. **1342**, 157–171 (2016).
77. Kim, E. B., Fang, X., Fushan, Al. A., Gladyshev, V. N. & et al. Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat. *Nature* **479**, 223–227 (2011).
78. Miyawaki, S., Kawamura, Y., Hachiya, T., Shimizu, A. & Miura, K. Molecular cloning and characterization of the INK4a and ARF genes in naked mole-rat. *Inflamm. Regen.* **35**, 42–50 (2015).
79. Zhao, Y. *et al.* Naked mole rats can undergo developmental, oncogene-induced and DNA damage-induced cellular senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 1801–1806 (2018).
80. Tian, X. *et al.* *INK4* locus of the tumor-resistant rodent, the naked mole rat, expresses a functional p15/p16 hybrid isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 1053–1058 (2015).
81. Montecucco, A., Zanetta, F. & Biamonti, G. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J.* **14**, 95–108 (2015).
82. Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J. & van Deursen, J. M. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* **15**, 1139–1153 (2014).
83. Ambrosio, S. *et al.* Cell cycle-dependent resolution of DNA double-strand breaks. *Oncotarget* **7**, 4949–4960 (2016).
84. Čmielová, J. & Řezáčová, M. Protein and its function based on a subcellular localization. *J. Cell. Biochem.* **112**, 3502–3506 (2011).
85. Filippi-Chiela, E. C. *et al.* Nuclear morphometric analysis (NMA): Screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS One* **7**, (2012).
86. Yang, J. *et al.* Cell size and growth rate are major determinants of replicative lifespan. *Cell Cycle* **10**, 144–155 (2011).
87. Foust, K. D. & Kaspar, B. K. A growig role for hypertrophy in senescence. *FEMS Yeast Res* **8**, 4017–4018 (2010).
88. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, 2009–2011 (2012).
89. Scaffidi, P., Gordon, L. & Misteli, T. The Cell Nucleus and Aging: Tantalizing Clues and Hopeful Promises. *PLoS Biol.* **3**, 1855–1859 (2015).
90. González Morán, M. G. Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford. Causas, investigación y tratamientos farmacológicos. *Educ. Quim.* **25**, 432–439 (2014).
91. Scaffidi, P. & Misteli, T. Lamin A defects in human Aging. *NIH public access* **1**, 233–245 (2012).

92. McClintock, D. *et al.* The mutant form of Lamin A that causes Hutchinson-Gilford progeria is a biomarker of cellular aging in human skin. *PLoS One* **2**, (2007).
93. Neill, D. Evolution of lifespan. *J. Theor. Biol.* **358**, 232–245 (2014).
94. Muñoz-Espín, D. *et al.* XProgrammed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* **155**, 1104–18 (2013).
95. Kosar, M. *et al.* Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- And insult-dependent manner, and follow expression of p16ink4a. *Cell Cycle* **10**, 457–468 (2011).
96. Tu, Z., Aird, K. M. & Zhang, R. Chromatin remodeling, BRCA1, SAHF and cellular senescence. *Cell Cycle* **12**, 1653–1654 (2013).