



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Reprogramación Celular en Fibroblastos Próximos a la Senescencia**

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O**  
**P R E S E N T A:**

**Luis Carlos Ríos Tapia**

**DIRECTOR Y CODIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Juan José Acevedo Fernández**  
**Mtra. Diana Toledo Hernández**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**NOVIEMBRE, 2023**

# ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	4
INDICE DE FIGURAS.....	6
INDICE DE TABLAS.....	8
Agradecimientos.....	9
<b>1.-Introducción.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1-Diferenciación Celular.....</b>	<b>10</b>
1.1.1- Factores Epigenéticos.....	12
1.1.2- Metilación de DNA.....	13
1.1.3.- Interacción celular con la matriz extracelular y el entorno (microambientes).....	14
<b>1.2.- Reprogramación Celular.....</b>	<b>16</b>
1.2.1.- Métodos de reprogramación.....	18
1.2.1.1- Retrovirus (lentivirus).....	18
1.2.1.2.-Integrasa PhiC31.....	19
1.2.1.3.-Escisión de exógenes.....	20
1.2.1.4.-Escisión con lentivirus.....	20
1.2.1.5.- Escisión de Transposón.....	20
1.2.1.6.- Métodos no integrativos.....	22
1.2.1.7.- Virus Sendai (SeV).....	22
1.2.1.8.- mRNA Sintético.....	24
<b>1.3.-Senescencia.....</b>	<b>26</b>
1.3.1.- Vía de p53/p21 <sup>cip1</sup> .....	26
1.3.2.- Vía de p16 <sup>INK4A</sup> /PRB.....	27
1.3.3.-Características que permiten identificar senescencia.....	28
1.3.4.- Clasificación de Senescencia.....	28
1.3.4.2.-Senescencia prematura.....	29
1.3.4.3- Senescencia inducida por estrés.....	29
1.3.4.4- Senescencia inducida por oncogenes.....	29
1.3.4.5.- Senescencia inducida por pérdida de supresores de tumor.....	29
<b>1.4.-Inmortalización.....</b>	<b>29</b>
<b>2.- Antecedentes.....</b>	<b>30</b>
2.1.- Reprogramación en fibroblastos senescentes.....	30
2.2.- Antecedentes directos del grupo de investigación.....	30
<b>3.- Justificación.....</b>	<b>34</b>
<b>4.- Pregunta de investigación.....</b>	<b>34</b>

<b>5.- Hipótesis.....</b>	<b>34</b>
<b>6.- Objetivos .....</b>	<b>34</b>
<b>6.1.- General: .....</b>	<b>35</b>
<b>6.2.- Particulares.....</b>	<b>35</b>
<b>7.- Estrategia Experimental.....</b>	<b>35</b>
<b>8.- Materiales y métodos .....</b>	<b>36</b>
<b>9.- Metodología .....</b>	<b>37</b>
<b>9.1.- Criopreservación y descongelamiento de fibroblastos .....</b>	<b>37</b>
<b>9.2.- Subcultivo de Fibroblastos .....</b>	<b>37</b>
<b>9.3.- Medición de confluencia con ImageJ .....</b>	<b>38</b>
<b>9.4.- Extracción y purificación de RNA.....</b>	<b>38</b>
<b>9.5.- Preparación de gel de agarosa .....</b>	<b>39</b>
<b>9.6.- Análisis de pureza de RNA por medio de Biodrop .....</b>	<b>39</b>
<b>9.7.- Análisis de integridad de RNA.....</b>	<b>39</b>
<b>9.8.- Síntesis de cDNA .....</b>	<b>39</b>
<b>9.9.- Detección de mRNA por PCR.....</b>	<b>40</b>
<b>9.10- Electroforesis en gel de agarosa.....</b>	<b>40</b>
<b>9.11.- Medición de intensidad por ImageJ .....</b>	<b>41</b>
<b>10.- Resultados.....</b>	<b>41</b>
<b>10.1.- Cultivo de fibroblastos en medio mesenquimal .....</b>	<b>41</b>
<b>10.2.- Cultivo de fibroblastos en medio MM y medio UDMM-EPI.....</b>	<b>42</b>
<b>10.3.- Viabilidad, rendimiento, número de divisiones celulares y horas por división.....</b>	<b>45</b>
<b>10.4.- Cultivos con medio MM y medio UDMM-EPI en pases tardíos .....</b>	<b>48</b>
<b>11.- Obtención de RNA y análisis de pureza.....</b>	<b>52</b>
<b>12.- Evaluación de integridad del RNA de las muestras.....</b>	<b>53</b>
<b>13.- Segunda evaluación de pureza.....</b>	<b>56</b>
<b>14.-Segunda evaluación de integridad.....</b>	<b>56</b>
<b>15.- Evaluación de los cDNA por medio de expresión de GAPDH.....</b>	<b>58</b>
<b>16.- Evaluación de los cDNA para SOX2 y OCT4 .....</b>	<b>59</b>
<b>16.1.-SOX2 .....</b>	<b>59</b>
<b>16.2.-OCT4.....</b>	<b>61</b>
<b>17.-Discusión .....</b>	<b>61</b>
<b>17.1.- Propagación de la línea celular de fibroblastos PCS-201-010. ....</b>	<b>61</b>
<b>17.2.- Marcadores de pluripotencia (SOX2 y OCT4). ....</b>	<b>63</b>

<b>18.-Conclusiones .....</b>	<b>64</b>
<b>19.-Perspectivas .....</b>	<b>65</b>
<b>20.- Literatura citada .....</b>	<b>66</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**(-) RNP** RNA de sentido negativo

**AKT** Cinasa de serina/treonina

**ATM** Ataxia telangiectasia mutada

**cDNA** DNA complementario

**CIP's** Proteínas inhibidoras de CDK (Del inglés CDK Inhibitory Proteins)

**cMYC** Gen de c-mielocitomatosis

**CTD** Dominio terminal carboxilo (Carboxyl Terminal Domain)

**DDE transposasa** Aspartato-Aspartato-Glutamato transposasa

**DDR** Respuesta de daño al DNA (Del inglés DNA Damage Response)

**DIRS** Secuencia repetida *Dictyosemya*

**EGF** Factor de crecimiento epidermal

**ERK** Cinasa regulada por señal extracelular

**ESC's** Célula troncal embrionaria (Del inglés Embryonic Stem Cell)

**FAK** Cinasas de adhesión focal (Del inglés Focal Adhesion Kinase)

**FOXO1** Proteína O1 de la caja *Forkhead*

**Gp160** Glicoproteína de superficie 160

**H2AK119ub1** Monoubiquitinización de histona 2<sup>a</sup> en la lisina 11

**H3K27me3** Trimetilación de la histona 3 en la lisina 27

**HDFn** Fibroblastos neonatos de dermis humana

**iPSC's** Células troncales pluripotentes inducidas (Del inglés Induced Pluripotent Stem Cells)

**ITR** Terminales de repetición invertidas (Del inglés Inverted Terminal Repeat)

**KLF4** Factor 4 similar a Krupper

**kpb** mil pares de bases

**LBR** Receptor de Lámina B (Del inglés Lamin B Receptor)

**LINE** Elementos nucleares largos interespaciados (Del inglés Long Interspaced Nuclear Elements)

**LTR** Terminal de repetición larga (Del inglés Long Terminal Repeat)

**MCI** Masa celular interna

**MEC** Matriz extracelular

**MM** Medio Mesenquimal

**mTOR** Blanco mamífero para rapamicina

**OCT4** Factor de transcripción 4 de unión a octamero

**OSKM** OCT4, SOX2, Klf-4 y c-Myc

**pb** Pares de bases

**PcG** Proteínas del grupo polycomb

**pDNA** Plásmido de DNA

**PLE** Elementos semejantes a Penélope (Del inglés Penelope Like Elements)

**Proteínas MA** Proteínas de la Matriz

**Proteínas NC** Proteínas de la Nucleocápside

**PSC's** Células troncales pluripotentes (del inglés Pluripotent Stem Cells)

**Ras** Proteína del virus del sarcoma de rata

**ROS** Especies reactivas de oxígeno

**RTns** Retrotransposón

**SAHF** Focos de heterocromatina asociados a senescencia (Del inglés Senescence Associated Heterocromatin Foci)

**SASP** Fenotipo secretor asociado a senescencia (Del inglés Senescence Associated Secretary Phenotype)

**SeV** Virus sendai (Del inglés Sendai Virus)

**Sevdp** Virus Sendai deficiente y persistente (Del inglés Sendai Virus Deficient and Persistent)

**SINE** Elementos nucleares cortos interespaciados (Del inglés Short Interspaced Nuclear Elements)

**SOX2** Genes de la caja HMG relacionados a SRY

**STEMCCA** casete de célula troncal (Del inglés Stem Cell Cassette)

**TERT** Telomerasa retrotranscriptasa

**Tns DNA** Transposón de DNA

**UDMM-EPI** Medio Epidermal

**UDMM-Epi** Medio Epidermal de la Unidad de Diagnóstico en Medicina Molecular

**UTR** Región no traducida (Del inglés Untranslated Region)

OCT4SOX2c-Myc

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Las células troncales tienen la capacidad de auto-renovación y diferenciación.....	11
<b>Figura 2.</b> Reclutamiento dinámico de las proteínas PcG.....	12
<b>Figura 3.</b> Escala universal de la micro rigidez de los tejidos.....	16
<b>Figura 4.,</b> Rutaestocástica de la reprogramación celular.....	25
<b>Figura 5.</b> Caracterización por PCR de células epidermales durante su propagación.....	31
<b>Figura 6.</b> Expresión de marcadores de precursores y pérdida de marcadores de identidad.....	32
<b>Figura 7.</b> Rendimiento celular de fibroblastos en pases tardíos.....	32
<b>Figura 8.</b> Número de divisiones celulares de fibroblastos en pases tardíos.....	33
<b>Figura 9.</b> horas por división celular de fibroblastos.....	33
<b>Figura 10.</b> Conservación morfológica durante pases 3, 7 y 12. .....	42

<b>Figura 11. Conservación morfológica durante los 3 últimos pases de la primera fase.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 12. Diferencia morfológica en fibroblastos cultivados con medio UDMM-EPI.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 13. Mayor confluencia en fibroblastos con medio UDMM-EPI.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 14. Viabilidad celular óptima utilizando el medio MM.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 15. Rendimiento celular de fibroblastos con medio MM.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 16. Número de divisiones celulares de fibroblastos durante 17 pases con medio MM.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 17. horas por división de fibroblastos durante 17 pases con medio MM.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 18. Mayor viabilidad celular en fibroblastos con medio UDMM-EPI.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 19. Mayor rendimiento celular en fibroblastos con medio UDMM-EPI.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 20. Mayor número de divisiones celulares con medio UDMM-EPI.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 21. Menor número de horas/división con medio UDMM-EPI.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 22. Integridad parcialmente óptima de las muestras de RNA.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 23. Pérdida de integridad del RNA de las muestras.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 24. Expresión óptima de GAPDH en todas las muestras .....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 25. Ubicación del marcador de peso molecular .....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 26. SOX2 Evaluación de la expresión de SOX2 por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.7%.....</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Materiales y Métodos.....	36
<b>Tabla 2.-</b> Lecturas de espectrofotometría para evaluar la pureza de las 17 muestras de RNA.....	53
<b>Tabla 3.-</b> Datos de intensidad entre subunidades 28s y 18s de los RNA.....	55
<b>Tabla 4.-</b> Posible contaminación en las muestras de RNA.....	56
<b>Tabla 5.-</b> Segundos datos de intensidad entre subunidades 28s y 18s.....	58



## **Agradecimientos**

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis padres. Quienes a través de todas las adversidades me han apoyado de manera constante, económica y emocionalmente, sin queja alguna. Muestra del increíble amor que tienen por mí y que algún día les voy a poder devolver. También quiero agradecer al Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia, Q.E.P.D. Por haberme aceptado en su laboratorio cuando ingresé, por haberme apoyado y haber destinado tiempo y recursos para mí. Por haberme otorgado el proyecto y haber creído en mí. Al Dr. Juan José Acevedo Fernández, Por haberme dado apoyo después de la dolorosa partida del Dr. Santa-Olalla. A la M. en C. Diana Toledo Hernández, por su admirable carácter y sus enseñanzas sobre técnicas de laboratorio incluso a distancia incluso cuando su situación no era la más favorable, sin las cuales, no habría podido dar seguimiento ni terminar esta tesis. A Sandra Teresa Mendiola Sotelo, por su paciencia durante todos los días de cultivo y su apoyo y seguimiento a mi metodología de tesis. A Alitzel Arizmendi Heras, por su cuidado y amor durante las últimas etapas de la tesis. Por el apoyo incansable demostrado todos esos días en los que pudo haber descansado y se quedó conmigo, y todas las veces que me llevó cosas de comer o ella misma las cocinó. A la Dra. Zugey Elizabeth Cárdenas Conejo, por todo el trabajo que realizamos juntos y todas las charlas y comidas motivacionales. Por nunca haberme juzgado durante los procesos de tesis y estar apoyándome en su realización. Al Dr. Eduardo Lira Díaz, por haberme apoyado en las revisiones finales de la tesis con mucha paciencia y comprensión. Finalmente, quisiera agradecer a mi comité sinodal por toda la paciencia otorgada a los tiempos inmensos que me tomó terminar esta tesis. Muchas gracias a todos.

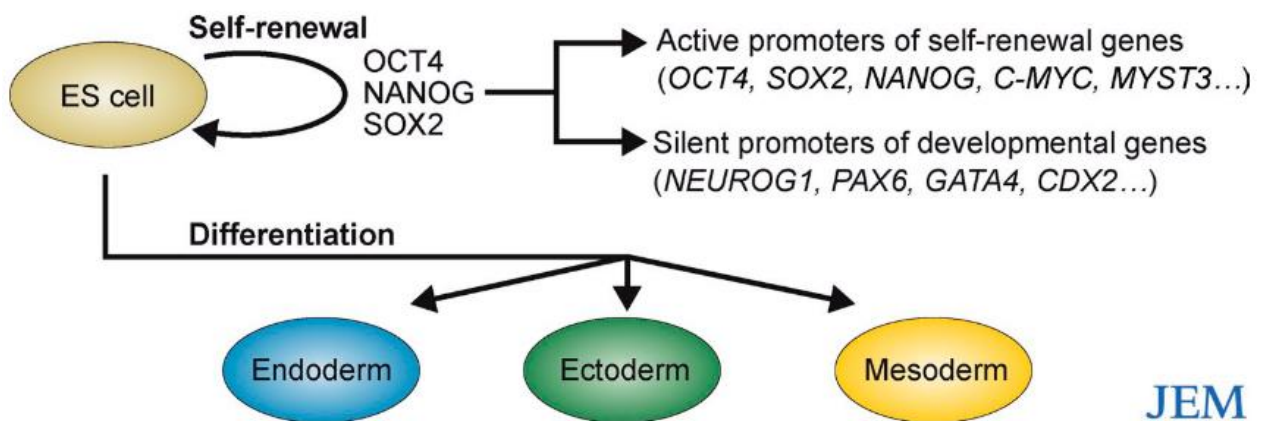
# **1.-Introducción**

## **1.1-Diferenciación Celular**

La diferenciación celular es el proceso por el cual una célula troncal puede generar distintos linajes celulares, esto por medio del establecimiento de un patrón de expresión genética definido que otorga a la célula la generación de proteínas específicas, así como un cambio morfológico. Este proceso se caracteriza por la pérdida progresiva del potencial de diferenciación y la creación de un nuevo tipo celular que cumplirá con funciones específicas (Christophersen et al., 2010; Meissner, 2010; Arteaga-Martínez y García-Peláez, 2013). Este proceso inicia después de la fecundación, con el cigoto y la generación de las dos primeras blastómeras que son consideradas células totipotenciales, es decir, que tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo celular incluso en los que generar los anexos embrionarios pudiendo generar organismos completos y se conocen como células troncales embrionarias (ESC's) (Arteaga-Martínez y García Peláez, 2013; Singh et al., 2015). Después de pasar por la etapa de mórula, donde se generaron de 16 a 32 blastómeras, se forma el blastocisto temprano, donde se pueden distinguir 3 estructuras: Trofoblasto: que son las células encargadas de formar los anexos extraembrionarios (corión y placenta), la masa celular interna (MCI) o Embrioblasto: Células encargadas de generar la mayor parte de los anexos embrionarios (cordón umbilical, alantoides, amnios y saco vitelino) y el cuerpo del embrión, así estas células son consideradas pluripotenciales (PSC's), es decir, que son capaces de diferenciarse en los tipos celulares de las 3 capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) pero no se diferencian en las células que conforman los anexos embrionarios, y el blastocele: que es una

cavidad que facilita la migración celular (Arteaga-Martínez y García Peláez, 2013). Así las células pertenecientes a alguna de las capas embrionarias pueden dar origen a distintos linajes de esa capa exclusivamente (células troncales mesenquimales que dan origen a hueso, cartílago, tejido adiposo, etc.) entonces a estas se les denomina células multipotentes (Krampera et al., 2007). Luego las células que se restringen a un solo linaje celular son consideradas oligopotentes y las que generan solo un tipo celular se definen como unipotentes (Singh et al., 2015).

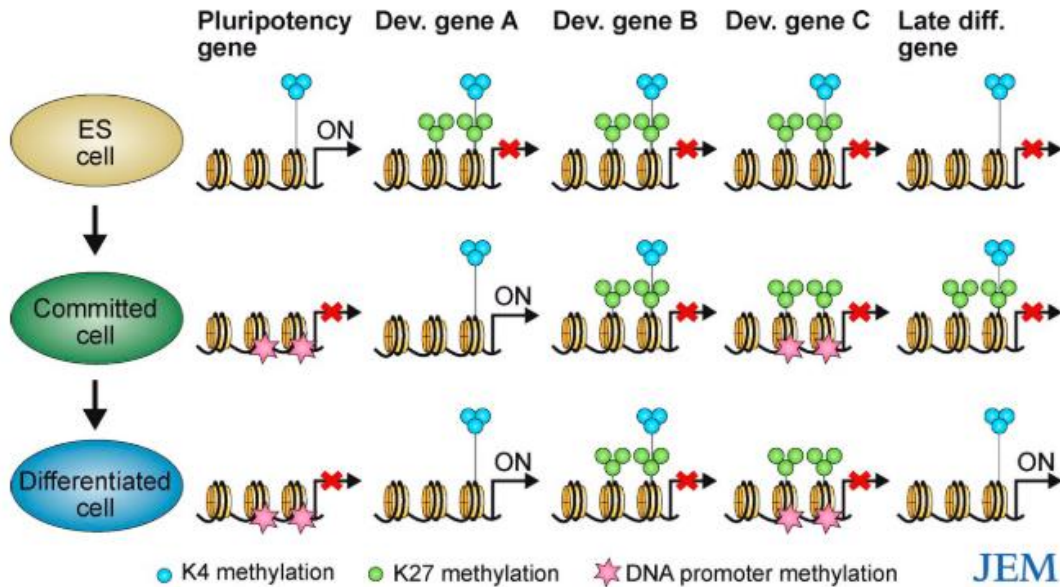
Con el potencial de diferenciarse en distintos linajes celulares y la plasticidad innata de las células troncales, aumenta la necesidad de regular el crecimiento, diferenciación y expresión fenotípica (Guilak et al., 2009). Los mecanismos que funcionan como reguladores en los cambios de los patrones de expresión genética río abajo del proceso de diferenciación, son generados mediante dos factores principales: Epigenéticos (Internos) y por medio de interacciones con la matriz extracelular y el entorno (Externos) (Christophersen et al., 2010; Guilak et al., 2009; Engler et al., 2006; Smith et al., 2018):



**Figura 1. Las células troncales tienen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse.** Las células troncales mantienen un estado pluripotente por medio de la expresión de una red de factores de pluripotencia (OCT4, SOX2, NANOG, c-Myc, KLF4) y a medida que se diferencian, estos se van silenciando y los genes del desarrollo adquieren mayor expresión para generar las 3 capas embrionarias (Christophersen et al., (Christophersen et al., et al., 2010).

### **1.1.1- Factores Epigenéticos**

Hay factores de transcripción encargados de mantener el estado de pluripotencia en las células troncales, de estos se conoce que SOX2, OCT4, y NANOG tienen los papeles principales en el mantenimiento de pluripotencia y la auto-renovación, se encuentran interconectados transcripcionalmente, es decir, que co-ocupan regiones promotoras de genes que inducen la auto-renovación (KLF4) y también las regiones promotoras de genes que inducen diferenciación para silenciarlos (Christophersen et al., 2010). Así estos factores, promueven o silencian la expresión de genes mediante el empaquetamiento de la cromatina, las modificaciones post-traduccionales de histonas y la metilación del DNA donde estos factores producen cambios heredables en la expresión genética y que son independientes de la secuencia de nucleótidos (Epigenéticos) (Christophersen et al., 2010). Las regiones promotoras de los genes silenciados por SOX2, OCT4 y NANOG también se encuentran ocupadas por los complejos represores proteicos del grupo polycomb (Proteínas PcG), al ser estudiados se determinó que la función de estos complejos es reprimir los genes inductores de diferenciación a lo largo de los ejes corporales y normalmente están conformados en dos complejos como multímeros y son: PRC2 y PRC1 (Christophersen et al., 2010). PRC2 cataliza la di y tri metilación de la histona 3 en la lisina 27 (H3K27me2/3) reprimiendo transcripciones, también sirve como sitio de anclaje para PRC2 y para PRC1 que cataliza la monoubiquitinización de la histona H2A en la lisina 119 (H2AK119ub1) y así bloquea la actividad de la RNAPII por medio de la atenuación del proceso de elongación de esta. Aunque H2AK119ub1 puede ocurrir sin el complejo PRC2-PRC1 y ambos complejos pueden generar represión genética por medio de conformaciones alternativas (Christophersen et al., 2010). La marca H3K27me2/3 está enriquecida en regiones que presentan la marca H3K4me3 que se encuentra cerca de los sitios de inicio de transcripción, esta marca se encuentra mediada por los complejos metil transferasa SETD1/MLL que son factores activadores de cromatina y son antagonistas de la represión por proteínas PcG, esto le otorga a estas regiones dominios bivalentes que mientras los genes se mantienen silenciados por las proteínas PcG la marca H3K4me3 los “prepara” para activarse aunque la expresión genética puede suceder sin que esto necesariamente ocurra, además se ha observado que la marca H3K27me2/3 puede silenciar genes durante la diferenciación, contribuyendo a un destino celular específico. Así la marca H3K27me2/3 es más común entre células troncales y células diferenciadas que la marca H3K4me3 que es más común en células troncales (Christophersen et al., 2010).



**Figura 2. Reclutamiento dinámico de las proteínas PcG.** Se observa la represión de genes de diferenciación durante el estado de célula embrionaria por medio de los dominios bivalentes establecidos por PcG. A medida que la célula se compromete a una ruta de diferenciación se retiran las marcas K27 y se activan los genes que permanecen con K4, esto mismo los protege de la metilación (Christophersen et al., 2010).

### 1.1.2- Metilación de DNA

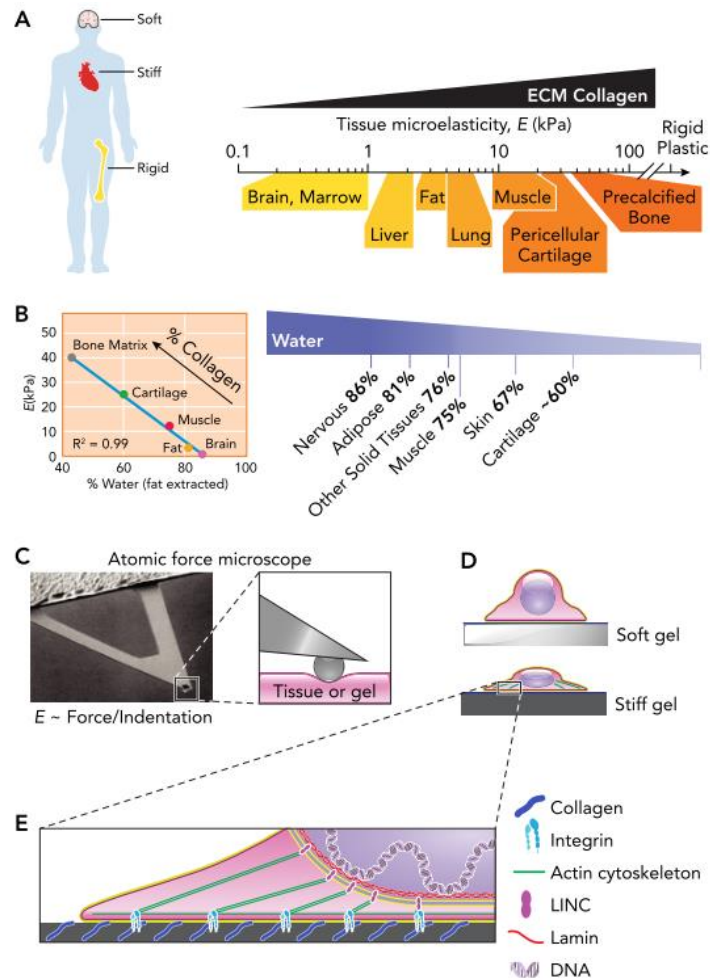
La metilación de residuos de citosina en regiones promotoras CpG catalizadas por DNA metil transferasas DNMT's es una marca represora longeva que regula la transcripción controlando la accesibilidad al DNA. Esta marca es esencial para el desarrollo y esto es evidente porque el blastocisto pasa por una etapa de desmetilación global inmediatamente antes de la diferenciación de las ESC's (Christophersen et al., 2010). Las regiones promotoras pueden clasificarse de acuerdo con el contenido de CpG's alrededor del inicio de los sitios de transcripción, así se muestran diferencias entre sus niveles de metilación y, por ende, como son regulados. En ESC's las regiones promotoras con alto contenido CpG tienen bajos niveles de metilación mientras que las regiones con bajo contenido CpG son altamente metiladas. Los promotores con alto contenido CpG se asocian con nucleosomas con la marca H3K4me3 y con otros con la marca H3K27me3 (Christophersen et al., 2010). Para estos promotores existe una asociación con CPF1 que tiene afinidad por regiones no metiladas con alto contenido CpG y al asociarse con la H3K4 metil-transferasa induce a que estas regiones porten la marca H3K4me3, como las DNMT's se unen a

promotores no metilados estas dos marcas protegen a los que tienen alto CpG de la metilación, mientras que los promotores con bajo contenido CpG son metilados y reprimidos en ESC's (Christophersen et al., 2010). Así, la conversión de ESC's a células diferenciadas requiere de cambios modestos en la metilación del ADN y estos se mantienen a lo largo de la diferenciación, siendo un pequeño número de genes los que se metilan durante el desarrollo acompañado del silenciamiento de sus promotores asociados y en su mayoría suelen ser genes asociados a pluripotencia, genes de célula troncal, y los factores de transcripción asociados a pluripotencialidad, evitando la desdiferenciación (Christophersen et al., 2010).

### **1.1.3.- Interacción celular con la matriz extracelular y el entorno (microambientes)**

Además de los factores epigenéticos, se necesita de una gama de factores físicos para coordinar los efectos de diferenciación que llevarán a las células troncales a un destino celular específico (Smith et al., 2018; Guilak et al., 2009). El principal de estos factores es la interacción celular con la matriz extracelular (MEC) y sus propiedades mecánicas, específicamente su geometría, su topografía, su rigidez, y su habilidad de transmisión de factores biofísicos a la célula (Guilak et al., 2009). Muchos efectos del desarrollo embrionario y de la diferenciación están influenciados por la geometría celular ya que es un factor fundamental en el crecimiento y fisiología celular (Guilak et al., 2009). Esta resulta de las interacciones adhesivas alteradas entre la célula y su sustrato, siendo los cambios por factores físicos como el estrés mecánico (fuerza aplicada por unidad de área) los más influyentes y estos producen una respuesta mediada por módulos elásticos variados a través de los tejidos, donde el cerebro es suave con un módulo menor a 1kPa y los huesos siendo rígidos con un módulo mayor a 1GPa. (Guilak et al., 2009; Smith et al., 2018). Con esto se observa una reducción del contenido de agua entre mayor es la rigidez del tejido y aumentan en peso componentes de la MEC, en particular el colágeno (Smith et al., 2018). Se ha reportado que, para tipos celulares específicos como los condrocitos, en cultivos celulares tridimensionales, se mantiene su fenotipo celular, mientras que en cultivos bidimensionales se puede observar un evento de desdiferenciación acompañado de una transición a un fenotipo fibroblástico (Guilak et al., 2009). Esto se traduce en que los ligandos de adhesión celular son cruciales para que la célula regule su morfología por la interacción con su entorno y que esta es sensible a la rigidez y suavidad de este, estos ligandos

están presentes en la MEC y esta contiene factores de crecimiento dependientes de las propiedades mecánicas para ser liberados, así como fibrillas de colágeno (1,2,3,5,6) que se alinean en dirección del estrés y se vuelven rígidas bajo tensión (Smith et al., 2018). Los tejidos con mayor estrés mecánico tienen la mayor cantidad de colágeno y rigidez, los tejidos protegidos del estrés mecánico tienen menos colágeno y son más suaves (Smith et al., 2018). Los componentes no fibrilares de colágeno, los proteoglicanos y otros componentes, modulan las propiedades mecánicas de la MEC por interacciones con la red de fibrillas de colágeno o individualmente (Smith et al., 2018). Esta interacción de adhesión de la célula a la MEC genera fuerza de jale por parte de la célula, esto es producido por los mini filamentos de miosina II que jalan el citoesqueleto de actina y las adhesiones para contraer la célula y la MEC (Guilak et al., 2009; Smith et al., 2018). Para poder soportar estas fuerzas se necesita de adhesiones estables a la MEC, estas son producidas por las integrinas que se unen en complejos de adhesión focal mientras se unen a sus ligandos específicos en la MEC (Smith et al., 2018). Así, hay factores de transcripción cuya activación o desactivación requiere de procesos mecanotransduccionales desde la MEC hasta el núcleo por medio de las cinasas de adhesión focal (FAK) en conjunto con las adhesiones focales por integrinas que inician rutas mecanosensitivas como ERK, JNK, Wnt- $\beta$ -catenina, TGF- $\beta$  Rho/ROCK e Hippo que son rutas reguladoras de factores de transcripción como YAP/TAZ (participan en diferenciación) que suelen encontrarse en el citosol cuando la MEC es suave y se translocan al núcleo cuando es rígida, además, esta inducción cambia con el estado de diferenciación celular (Guilak et al., 2009; Smith et al., 2018). Lo que hace este proceso posible, es la conexión desde los puntos focales de integrina con el citoesqueleto de actina, donde este se conecta con los filamentos intermedio y estos con las nesprinas en la membrana nuclear, estas activas a las proteínas SUN que están en la membrana interior del núcleo y se conectan con las láminas A y B que determinan las propiedades mecánicas del núcleo y aumentan proporcionalmente al colágeno con la rigidez de la MEC (Smith et al., 2018). A su vez, las láminas regulan factores de transcripción como el factor de respuesta al suero y los receptores de ácido retinoico que tienen roles en la diferenciación e interactúan con las proteínas integrales de membrana como el receptor de lámina B (LBR) que regula factores de cromatina, así, se completa la red de conexión desde la MEC hasta el ADN que permite la transducción de señales por recepción mecanosensitiva (Guilak et al., 2009; Smith et al., 2018).



**Figura 3. Escala universal de la micro rigidez de los tejidos.** A. Las células troncales derivan tejidos que difieren en una escala de rigidez, siendo algunos suaves (cerebro) y otros rígidos (hueso) y como la rigidez o suavidad de los tejidos se relaciona con su micro elasticidad. B. Pérdida de agua proporcional al aumento en niveles de colágeno. C. Diseño de matrices por medio de microscopios de fuerza atómica. D. Cambios morfológicos de acuerdo con la rigidez del sustrato. E. Todos los componentes involucrados en la recepción mecánica (Smith et al., 2019).

## 1.2.- Reprogramación Celular

La reprogramación celular es una técnica que promueve la inducción de la dediferenciación de una célula somática, obteniendo una célula troncal pluripotente, que es capaz de diferenciar en distintos linajes celulares (Takahashi et al., 2014). Esta técnica tiene sus inicios en 1952 con Thomas J. King y Robert Briggs, donde experimentaron con células de *Rana pipiens*. El objetivo de su investigación fue determinar si al diferenciarse las células, los núcleos adquirirían un juego de



genes distinto y permanente. Para comprobar esto, trasplantaron núcleos de células de blástula tardía por ser similares a células diferenciadas en tamaño y morfología, donde tuvieron como resultado que los núcleos trasplantados podían formar blástulas enteras indicando que los núcleos (al menos de células de blástula tardía) no sufrían un cambio genético irreversible al diferenciarse las células (Briggs & King, 1954). Más tarde, en 1958, John Gurdon trasplantó núcleos de células epiteliales de *Xenopus laevis*, específicamente, de células del intestino a óvulos enucleados, donde, después de ser implantados y favorecer su desarrollo, se observó el desarrollo completo de un nuevo organismo con el primer trasplante y si este fallaba, se utilizaban trasplantes seriados que resultaban en lo mismo, un organismo completo y funcional. Siendo la primera vez que se describió la posibilidad de generar clones de dicha especie; demostrando que era posible cambiar el patrón de expresión de una célula diferenciada a una condición en donde el genoma podría ser empleado para permitir la generación de un nuevo individuo. Después de estos descubrimientos, Evans y Kaufman en 1981 establecieron la primera línea de cultivo de células pluripotenciales obtenidas de ratones. Estas fueron obtenidas de blastocitos en un estado de pre-implantación, en donde al ser inyectadas en ratones formaban teratocarcinomas y compartían características de crecimiento similares a las células de carcinoma embrionario además de poder dar origen a ratones quimera, comprobando su pluripotencialidad y estableciendo el campo experimental para ensayos de pluripotencialidad en mamíferos (Evans & Kaufman, 1981). Así, en 1996 surgieron los experimentos de Ian Willmut donde también utilizó el trasplante nuclear y determinó que los óvulos en meiosis II tienen actividad de un factor promotor de maduración que degrada la membrana de los núcleos transferidos y permite una exposición completa al citoplasma del óvulo, teniendo como resultado una reprogramación más efectiva y la clona de una oveja (Campbell et al., 1996). Luego, en 1998 James Thomson estableció una línea de células pluripotenciales humanas derivadas de blastocitos, en donde el cultivo se mantuvo en condiciones proliferativas y se comprobó que se mantuvo el estado pluripotencial mediante la actividad de la telomerasa, formación de teratomas, por presencia de marcadores de pluripotencia (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81) y por fosfatasa alcalina, abriendo las puertas a experimentación *in vitro* con células pluripotenciales humanas (Thomson et al., 1998). En 2001, Masako Tada descubrió que la reprogramación era posible mediante la fusión de células embrionarias con timocitos, donde obtuvo células híbridas en la formación de las 3 capas germinales, sin embargo, su trabajo presentó problemas éticos por utilizar embriones humanos (Tada et al., 2001). Con base en estos experimentos, en 2006 Shinya

Yamanaka y Kazutoshi Takahashi llegaron a la conclusión de que debían existir factores específicos en el citoplasma del óvulo, que favorecían la reprogramación. Así, establecieron un experimento con fibroblastos de ratón y con factores citoplásmicos aislados de un óvulo y por método de eliminación encontraron que un conjunto de OCT4, SOX2, KLF4 y c-Myc (OSKM) introducido a la célula por un vector retroviral era el más efectivo en inducir la reprogramación (Takahashi et al., 2006). Consecuente a este experimento en 2007, descubrieron que la reprogramación por medio del conjunto OSKM era posible en fibroblastos humanos y denominaron a estas, células troncales pluripotentes inducidas (iPSC's) evitando la necesidad de utilizar embriones o trasplante nuclear para la obtención de células pluripotentes (Takahashi et al., 2007). Actualmente, se han desarrollado nuevas tecnologías para la reprogramación celular.

## **1.2.1.- Métodos de reprogramación**

### **1.2.1.1- Retrovirus (lentivirus)**

El método más comúnmente utilizado para la transfección es el lentivirus HIV-1 cuyo genoma consiste en RNA de una sola cadena de sentido positivo, con 3 estructuras principales: *Gag*, que codifica para 3 proteínas: Las proteínas de la matriz (proteínas MA), las de la cápside (proteínas CA) y las proteínas de la nucleocápside (proteínas NC) (Applied Biological Materials [ABM], 2016). El gen *pol* que codifica para las enzimas proteasa viral, la retro transcriptasa e integrasa y el gen *env* que codifica para la glicoproteína de superficie 160 (gp160) que genera la gp120 y la gp41 que son esenciales para la entrada del virus a la célula (ABM, 2016). Además, el genoma contiene genes reguladores *tat* que activan la transcripción viral y *rev* regula el splicing y el transporte de los transcritos virales (ABM, 2016). También se encuentran 4 genes accesorios *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* donde *vpr* actúa como un transactivador transcripcional débil, que permite la infección de células en un estado no proliferativo, en las terminales de repetición larga (LTR) normalmente el genoma viral está rodeado por 2 secuencias LTR's que participan en la integración y transcripción viral y entre estas se encuentra el elemento  $\Psi$  que participa en la dimerización del genoma (ABM, 2016). Así se formuló el vector lentiviral de tercera generación que presenta menos riesgos al hacer separar los componentes del genoma viral dentro de 4 vectores: 1) Con los genes *pol* y *gag*, 2) gen *rev* 3) gen *env* y 4) regiones LTR, el transgén deseado y el elemento  $\Psi$  (ABM, 2016). El de segunda generación que divide los componentes del genoma viral en tres plásmidos: 1) las LTR's, el transgén, el elemento  $\Psi$ , 2) genes *rev*, *gag*, *pol* y *tat* y 3) gen *env* y este vector de

segunda generación es el que tiene más eficiencia para generar retrovirus (ABM, 2016). Para poder utilizar la transfección por retrovirus, se requiere de una línea celular que tenga tiempos de replicación cortos para poder generar los virus, además debe ser específica para el virus que se planea usar ya que no todos infectan de manera constante a distintas células (Brouwer et al. 2016). Las líneas celulares más comunes y convencionales para uso como “embalaje” viral son las líneas 293T y Phoenix (ABM, 2020) que tienen los mecanismos de transducción descritos anteriormente y la Plat-E que tiene como novedad el uso del promotor EF1- $\alpha$  en combinación con la secuencia Kozak, que es 100 veces más potente que el vector LTR de las líneas convencionales (Morita et al., 2000). Así, para la producción de virus (titulación) se subcultiva la línea celular de “embalaje” hasta estar en un rango de 70-75% de confluencia, al día siguiente se transfecta la célula con los plásmidos virales, se recolecta el sobrenadante al siguiente día y se cambia el medio si se necesitan cultivar más virus, luego el sobrenadante recolectado se centrifuga y se filtra con un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  para recolectar solo los virus y estos pueden almacenarse a 4°C durante una semana o a -80°C para más tiempo (ABM, 2020).

Dado que el uso de retrovirus para la inducción de reprogramación tiene como consecuencia la integración de material exógeno que no se pierde a través de las divisiones celulares, este método tiene el riesgo de inducir tumorigénesis además de que al expresarse continuamente los factores de pluripotencia, puede desencadenar una respuesta de senescencia celular resultando en una reducción de la eficiencia de reprogramación con retrovirus (Chang et al., 2019).

### **1.2.1.2.-Integrasa PhiC31**

Otro método de integración exógena es el que involucra la acción de la PhiC31 integrasa, la cual se aisló del Fago PhiC31. Esta integrasa reconoce dos sitios específicos denominados *attP* con 34 pb en el genoma del fago y *attB* con 39 pb para el genoma de las bacterias del género *Streptomyces* (Chalberg et al., 2006). A través de diversos estudios se descubrió que el genoma de los mamíferos contiene varias regiones con una identidad similar a la de *attB*, que se denominan como pseudo-*attP* (Chalberg et al., 2006). Después de que la integrasa se une a su sitio específico, ambos sitios no vuelven a reaccionar con PhiC31 entonces se dice que esta reacción es unidireccional (Calos, 2006). Este método tiene una alta precisión de inserción exógena, sin embargo, posee el riesgo de activar oncogenes y reprimir a los supresores oncogénicos por medio de mutaciones insercionales en las regiones cercanas a dichos genes, producir deleciones, además de que se ha observado la

inducción de un re-arreglo de los cromosomas donde tienen lugar translocaciones, las cuales también presentan un riesgo relacionado a tumorigénesis (Calos, 2006).

### **1.2.1.3.-Escisión de exógenos**

Este tipo de métodos tienen como objetivo eliminar los residuos exógenos producidos por la inserción exógena debido al uso de vectores retrovirales o por integrasas y así evitar los problemas relacionados a estos métodos como la mutación insercional, traslocaciones, deleciones, tumorigénesis, el bajo tamaño de las secuencias de los virus (7 pares kb) además del carácter tedioso de su elaboración, el costo elevado, y el tener que utilizar células de “embalaje” para la producción de los virus y engloba los siguientes métodos (Sommer et al., 2010; Kumar et al., 2020; Chang et al., 2019):

### **1.2.1.4.-Escisión con lentivirus**

Se produce una única inserción de genes (inserción exógena) por medio de un casete lentiviral policistrónico de célula troncal (STEMCCA) que contiene el cóctel de genes pluripotenciales (OSKM) y se encuentra flanqueado por secuencias LoxP. Este sistema requiere que ambas secuencias LoxP se encuentren en la misma orientación para que en presencia de la recombinasa Cre se produzca una escisión de los exógenos en el momento que se desee (Sommer et al., 2010), liberando así a la progenie de las iPSC's de residuos exógenos que puedan inducir mutaciones. Sin embargo, se ha reportado que hay células que no logran el evento de recombinación con Cre y las células que mantienen su STEMCCA, se ven afectadas en su desarrollo y las células que lograron recombinarse con Cre y escindieron su STEMCCA mostraban trisomía en el cromosoma 8, algo similar a las ESC's, pero anormal en iPSC's (Sommer et al., 2010). Para este método se reportan eficiencias del 0.1-1.5% (Malik y Rao, 2013).

### **1.2.1.5.- Escisión de Transposón**

Los transposones son elementos móviles del genoma capaces de generar inserciones genéticas desde una ubicación genética a otra por medio de distintos mecanismos lo que los hace un método viable para reprogramar células, además pueden escindirse después de que los factores de reprogramación (OSKM) se expresaron (Kesselring et al., 2020; Babakhani y Oloomi, 2018). Existen varios tipos utilizados en reprogramación como TC1/Mariner, Sleeping beauty o

Piggyback y se dividen en 2 grupos: A) Clase I Retrotransposón (RTNs) y B) Clase II Transposón de DNA (Tns DNA) (Babakhani y Oloomi, 2020).

Clase I: Se dividen en autónomos por poseer genes *pol*, *gag* y *ORF* que codifican para sus proteínas de transposición, y en no autónomos que son incapaces de generar sus propias proteínas y utilizan las sintetizadas a través de los autónomos (Babakhani y Oloomi, 2020). Pueden clasificarse de acuerdo con su estructura y tipo de transposición en las siguientes categorías: Terminales largas de repetición (LTR), elementos nucleares largos interespaciados (LINE), elementos nucleares cortos interespaciados (SINE), secuencia repetida *Dyctyosemia* (DIRS) y elementos semejantes a Penélope (PLE) (Babakhani y Oloomi, 2020).

Clase II: Estos comparten un mecanismo de “cortado y pegado” por el que pueden transposicionarse y son más cortos que los RTNs, se encuentran flanqueados en las regiones terminales de su secuencia por terminales de repeticiones invertidas (ITR) y un gen que codifica para una enzima transposasa que al unirse a las ITR induce el mecanismo de transposición (Babakhani y Oloomi, 2018; Kumar et al., 2020; Kesselring et al., 2020). Se dividen en 3 grupos por el mecanismo de translocación: 1) Cortado y pegado, 2) Círculo rodante y 3) autosíntesis, pudiendo tener transferencia replicativa (al transposicionar una copia del transposón mientras el original mantiene su posición) o no replicativa (al ser transposicionado el transposón original) (Babakhani y Oloomi, 2020). Las transposasas normalmente contienen una triada de aminoácidos que son aspartato-aspartato-glutamato (DDE Transposasa) que coordina los iones  $Mg^{2+}$  que permiten el inicio de la transposición al liberar grupos 3-OH en cada terminal por hidrólisis mediada por la transposasa, así, la primera cadena de DNA es liberada del plásmido que contiene el transposón (Kesselring et al., 2020). Luego se puede inducir una segunda hidrólisis (Para las transposasas TC1/Mariner) o se escinde la cadena complementaria de DNA por medio de un hairpin intermediario para liberar completamente la secuencia del transposón (Kesselring et al., 2018). Entonces, los grupos 3-OH liberados producen un ataque nucleofílico a la secuencia blanco para unir finalmente al transposón con esta y por medio de re-expresión transitoria de la transposasa (logrado en Piggyback) puede escindir al transposón una vez que se expresaron los genes deseados, aunque para aproximadamente el 75% de los casos esto produce eventos de reinserción y por ende, reexpresión de los factores (Kesselring et al., 2020). Esto ha sido modificado con la creación de la transposasa Sleeping Beauty, que tiene modificaciones en la lisina 248 que la vuelven una transposasa competente en escindir, pero incompetente en integrar (Kesselring et al., 2020). Así,

este método presenta varias ventajas frente al uso de vectores virales: 1) Capacidad de carga genética de 100 pares kb, 2) Sin preferencia por sitios de unión como genes expresados o regiones promotoras, 3) Se pueden escindir, 4) La producción de los plásmidos es barata, 5) Tienen inmunogenicidad innata reducida y 6) No necesitan de una instalación de bioseguridad (Kumar et al., 2020). Sin embargo, presentan una eficiencia de reprogramación del 0.02% que las pone al mismo nivel que los vectores retrovirales y por encima de algunos métodos no integrativos, Sin embargo, los más efectivos son el uso de virus sendai y el RNAm sintético, y mantiene el riesgo de inducir mutaciones insercionales si muchos vectores entran a una célula (Kumar et al., 2020).

#### **1.2.1.6.- Métodos no integrativos**

Este tipo de métodos se enfocan en la expresión ectópica de los factores de reprogramación (OSKM) reduciendo el riesgo de mutagénesis insercional, de inserciones aleatorias, y expresión permanente de dichos factores (Nishimura et al., 2011).

#### **1.2.1.7.- Virus Sendai (SeV)**

Es un virus de RNA no segmentado de cadena negativa (sin intermediario de ADN) perteneciente a la familia *paramyxoviridae* y al género *respirovirus*, con forma esférica y con un diámetro de aproximado de 260nm (Nakanishi y Makoto, 2012; Tai et al., 2018; Nishimura et al., 2011; Nagai, 2013). Su virión está conformado por la nucleocápside compuesta por proteínas NP, P (unidad pequeña de la RNA polimerasa), L (unidad grande la RNA polimerasa), también conocido como complejo interior ribonucleótido y que contiene el RNA de su genoma con aproximadamente 15,384 nucleótidos compuesto por 6 cistrones, una bicapa lipídica conformada por proteínas F (Para la fusión de membranas) y HN (reconocimiento de receptor) que forma la envoltura, la matriz conformada por la proteína M que une a la envoltura con la nucleocápside, las proteínas “accesorio” V, un conjunto de proteínas denominadas C; la secuencia genética que codifica para todas las proteínas estructurales tiene el orden 3'-N-P/C/V-M-F-HN-L-5'. Este virus no es patógeno para los humanos (Nishimura et al., 2011; Nakanishi y Makoto, 2012; Nagai, 2013; Borgohain et al., 2019). Este virus tiene como receptor al ácido siálico encontrado generalmente en casi todas las células animales, teniendo una amplia gama de células blanco, y para su expresión requiere de la codificación de su RNA polimerasa viral y tubulina (Nakanishi y Makoto, 2012). Hubo intentos de reemplazar la expresión de las proteínas F, HN y M con los factores para terapia o reprogramación, pero no fue posible, ya que para estas no se presenta un intermediario de ADN que conlleve a su

expresión (Nakanishi y Makoto, 2012). Después, se generaron virus sendai en cuatro generaciones (Borgohain et al., 2019): 1) Compuesta de todo el genoma viral y las dos proteínas accesorias en donde se insertaba el gen de interés entre las secuencias que codifican para NP y P/V/C, sin embargo al contener el genoma completo se generaban partículas infecciosas del virus (Nagai, 2013; Borgohain et al., 2019), 2) Un Virus Sendai deficiente y persistente (SeVdp) deficiente en proteínas como F, M o HN, esto reducía su capacidad para replicarse, sin embargo, está seguía presente y generaba partículas infecciosas aun provocando citopatogenicidad (Nishimura et al., 2011; Borgohain et al., 2019). 3) Un SeVV/ $\Delta$ F sensible a la temperatura para la posterior eliminación de los factores OSKM y los residuos víricos, creado a partir de la modificación de 3 aminoácidos en las secuencias de los genes M y HN resultando en un número reducido de partículas infecciosas (Borgohain et al., 2019). 4) Un vector deficiente en 3 genes F, M y HN denominado SeV/ $\Delta$ F/ $\Delta$ M/ $\Delta$ HN con una alta capacidad transgénica por la eliminación de sus proteínas estructurales y con el espacio suficiente para cargar con el cóctel genético OSKM de reprogramación y este puede ser eliminado mediante un siRNA contra la proteína L (Borgohain et al., 2019). Así, el mecanismo de entrada se da por la fusión de membranas entre la célula blanco y el virus sendai por medio de la proteína HN que reconocerá a su receptor, el ácido siálico esto inducirá la fusión de la membrana viral con la membrana celular por medio de la proteína F (Nagai, 2013; Borgohain et al., 2019). Una vez dentro de la célula, el RNA de sentido negativo ((-)RNP) sirve como plantilla para replicación y transcripción y pasa por dos procesos de transcripción mediados por la RNA polimerasa viral compuesta por L y P, el primero es un proceso de replicación y el segundo de transcripción para obtener más proteínas en un gradiente de expresión donde NP se expresa más y L tiene los niveles más bajos, luego, las proteínas se unen a las réplicas del (-)RNP y migran hacia la membrana celular donde se encuentra M que otorga soporte a las proteínas HN y F después de ser procesadas en Golgi para la integración de un nuevo virus (Nagai, 2013; Borgohain et al., 2019). Entonces, al eliminar los genes para F, M y HN se evita que el virus exprese proteínas que le permitan salir de la célula e infectar otras, así solo obtenemos expresión de nuestros genes blanco (Borgohain et al., 2019). Sin embargo, este método presenta varias desventajas para reprogramar células ya que es muy laborioso, necesita de células “embalaje” para producir los virus, es muy caro, se mantiene la preocupación de que en algún momento pueda ser citopatógeno, y aunque su inmunogenicidad es reducida con el vector SeV/ $\Delta$ F/ $\Delta$ M/ $\Delta$ HN aún se mantiene en niveles bajos (Nishimura et al., 2017; Borgohain et al., 2019).

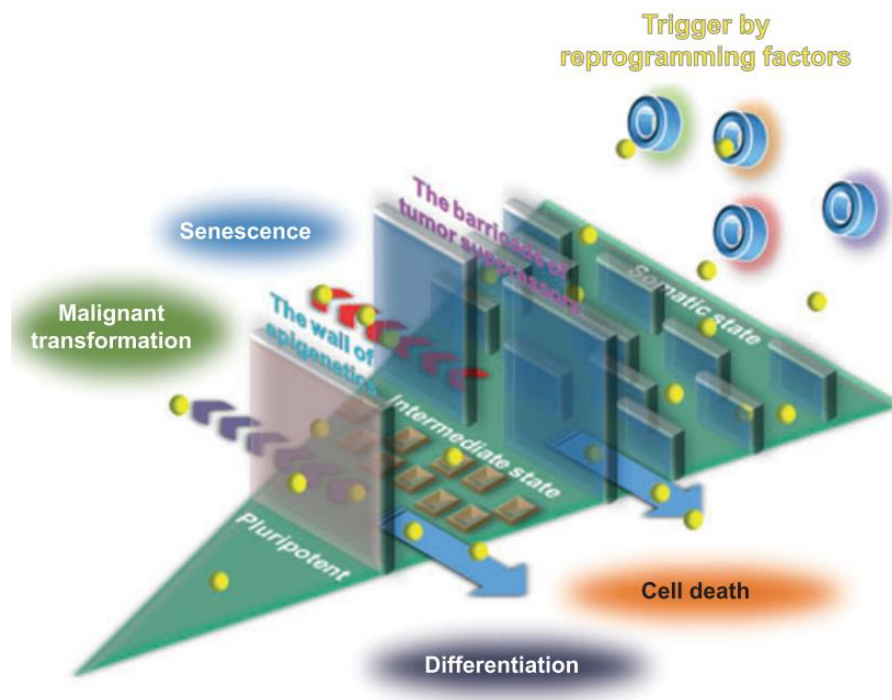
### **1.2.1.8.- mRNA Sintético**

Es una molécula artificial que ha sido utilizada desde 1980 como una herramienta de investigación, y en 2010 fue cuando se estableció como un sistema de reprogramación (Warren, 2019). Esta construcción consta de una cap 5', el gen de interés, flanqueado por las regiones no traducidas (UTR), una cola poli A, aunque se puede omitir el incluir una cola poli A de longitud conocida y emplear el uso de la poli A polimerasa, pero la longitud variará además de que esta enzima tiene un alto costo, de no añadirse, se puede observar una disminución en la expresión de los genes blanco y puede emplearse el uso de miRNA para estabilizar la expresión (Warren, 2019). Puede ser transcrito in vitro por medio de un vector que contenga promotores de bacteriófago (SP6, T3 o T7) desde una plantilla de cDNA que suele ser DNA plásmido (pDNA) (Schlake et al., 2012; Warren, 2019). Introducir un RNAm sin modificaciones a la célula induce la activación de respuestas inmunes antivíricas que impiden la generación de proteínas, esto se ha logrado evadir por medio de la sustitución de nucleósidos, específicamente de uridina y citidina por pseudouridina y 5-metilcitidina, aunado a esto, se utiliza un receptor señuelo de Interferon I del virus *vaccinia*, llamado B18R que sirve para reducir drásticamente dicha respuesta inmune, también se puede utilizar siRNA para reducir dicha respuesta inhibiendo genes del sistema inmune (Warren, 2019). Para su introducción a la célula se emplea el uso de transportes catiónicos (Lipofección) en conjunto con electroporación a un pH adecuado, sin embargo, como se siguen presentando aunque en bajo número las complicaciones relacionadas a la activación de la respuesta inmune acoplado con que el mRNA normalmente se degrada de 12-14h (produciendo una vida media más corta para los factores de transcripción), para una expresión estable de los genes blanco se requiere de la aplicación de dosis diarias durante dos semanas con los métodos más convencionales haciendo que el uso de electroporación sea agresivo y limita su uso, restringiendo como, blanco de reprogramación a las células sanguíneas (Warren, 2019) Para la inducción de reprogramación se ha usado solamente el factor OCT4 en condiciones de hipoxia y se reportan eficiencias de reprogramación más altas (dos veces las de los métodos integrativos) para pases tempranos de fibroblastos después de 20-30 días (Warren, 2019). Los métodos más eficientes reducen el número de transfecciones a 4 (Warren, 2019) e incluyen el uso de la familia miRNA-367/302s de miRNA que son específicas para ESC's y mejoran la eficiencia del mRNA para reprogramación en conjunto con ciclina D1 y el uso de una versión modificada de OCT4 fusionada con el dominio de



transactivación MyoD en combinación con los factores SOX2, KLF4, c-Myc, LIN28 y NANOG y las células comienzan a mostrar marcadores de iPSC's alrededor de los 10-14 días (Kogut, 2018; Alvarez-Palomo, 2021). Este método evita las mutaciones ya que no requiere de inserción genética y no deja rastro genético después de eliminarse, sin embargo, la inducción de pluripotencia requiere de atención continua para suministrar las dosis diarias (Warren, 2019).

Un obstáculo importante para la reprogramación ha sido la senescencia celular, ya que, al activarse, las células pierden su potencial proliferativo. Esta afecta a todos los métodos de reprogramación porque una vez inducido el estado senescente es difícil que los factores de reprogramación vuelvan a expresarse y su inhibición presenta el riesgo de generar mutaciones que conlleven a la transformación celular limitando totalmente las aplicaciones clínicas.



**Figura 4. Ruta estocástica de la reprogramación celular.** Esquema que describe las barreras que debe superar un método de reprogramación, es decir, poder inducir un fenotipo pluripotencial en

una población celular blanco, sin el riesgo de transformaciones tumorales y al mismo tiempo, evadiendo los mecanismos de senescencia o muerte celular (Takahashi et al., 2010).

### **1.3.-Senescencia**

La senescencia celular es un estado natural de arresto del ciclo celular particularmente inducido durante los puntos de restricción en las fases G1 y G2 del ciclo celular y que es inducido por factores externos o internos que se interpretan como señales de estrés o daño genético. En el segundo caso se genera un estímulo denominado “respuesta al daño del DNA” (DDR), para evitar la propagación de dichos daños a la progenie celular. Este estado es inducido principalmente por las vías de p53/p21 y p16/PRB. En células senescentes se presenta un estado de diafonía entre ambas vías, esto juega un rol crítico en el mantenimiento de dicho estado (Mijit et al., 2020). p53 suele ser reversible al inhibir su expresión y p16 irreversible por concluir su señalización con la inducción de la formación de focos de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF) para inhibir la expresión de genes (Campo-Trapero et al., 2008) que tienen vías complementarias río debajo de su activación (TGFβ/BMP, MAPK, Wnt/β-Catenina, FGF, IGF, etc) (Wang et al., 2019). Las células senescentes generadas por DDR secretan factores (IL-6, 7, 8, 13, 15, Quimiocinas CXCL, CCL, EGF, NGF, etc) (Coppé et al., 2010) que constituyen un fenotipo de secreción asociado a senescencia (SASP), esto permite identificarlas y diferenciarlas lo que favorece la inducción de apoptosis para su eliminación (Lujambio, 2015). Este estado puede ser transitorio, ya que, para su inducción, se requiere de un estímulo estable. Si el daño a DNA no es muy severo o el estímulo de estrés no es constante, se presenta un estado senescente transitorio en el que la célula puede reparar los daños, en cambio si el daño es severo o el estímulo es constante, el estado senescente será permanente (Mijit et al., 2020)

#### **1.3.1.- Vía de p53/p21<sup>cip1</sup>**

p53 funciona como un factor de transcripción con alrededor de 3661 genes blanco y juega uno de los papeles principales en determinar el destino celular en un tipo de respuesta dependiente de DDR o independiente de DDR (Mijit et al., 2020). En el caso de ser dependiente de DDR, se activan las cinasas ataxia telangiectasia mutada (ATM) o las relacionadas con Rad3 y ataxia telangiectasia (ATR) que activan el eje de p53/p21<sup>cip1</sup> por medio de la fosforilación de p53 y su ligasa de ubiquitina Mdm2 para estabilizar los niveles de concentración de p53 dentro de la célula (Mijit et al., 2020). Sin embargo, a través de diversos estudios se ha comprobado que la concentración de

p53 no es el único factor que afecta su actividad. El splicing alternativo del mRNA de p53 y las modificaciones post-traduccionales producen isoformas como  $\Delta 40p53$ ,  $\Delta 133p53\alpha$ , y  $p53\beta$  que tienen actividad importante en los inicios de la inducción del estado senescente (Mijit et al., 2020). Por ejemplo,  $\Delta 133p53\alpha$  tiene una acción antagónica contra p53 induciendo estabilización del estado proliferativo, esto mientras se mantenga en niveles bajos la concentración de  $p53\beta$  siendo esta abundante en células senescentes y regulado positivamente por medio de splicing de SRSF3 así, en este estado  $\Delta 133p53\alpha$  es regulado negativamente por STUB-1 por medio de degradación autofágica. Luego,  $\Delta 40p53$  que regula el estado senescente de 2 dos maneras: 1) por medio de la regulación de la vía IGF-1, 2) regulando la actividad transcripcional de p53 uniéndose a este en sus genes blanco (Mijit et al., 2020). Otro factor involucrado en la inducción del estado senescente es la acetilación de p53 en ciertos sitios, esto previene la fosforilación de serinas del amino terminal de p53 así, se permite la activación de genes con alta afinidad por p53 como CDKN1A que codifica para uno de los efectores más importantes de p53,  $p21^{cip1}$ . Si se acetilan otras zonas puede inducir a la hiperfosforilación de p53 teniendo como resultado la activación de genes con poca afinidad por p53 como los genes pro-apoptóticos (Mijit et al., 2020).  $p21^{cip1}$  es considerado como un efector principal ya que, en mamíferos, es el miembro fundador de la familia de proteínas inhibitoras de CDK's (CIP's) y su activación modula la expresión de genes blanco de p53 (CDC25C, CDC25B, survivinas, etc.) a través del reclutamiento del complejo E2F4. También puede inhibir, por medio de unión, agentes apoptóticos como las caspasas, así,  $p21^{cip1}$  promueve el estado senescente por medio de la inhibición de las vías apoptóticas (Mijit et al., 2020).

### **1.3.2.- Vía de $p16^{INK4A}$ /PRB**

$P16^{INK4A}$  Funciona como control negativo de la vía PRB/E2F. Las proteínas que involucra pertenecen a la familia de proteínas de retinoblastoma y principalmente son PRB/p105, p107 y PRB/p130. Siendo el papel principal el de PRB2/p130 al inhibir la ciclina A, mientras que la proteína de retinoblastoma clásica sólo está presente en fases tempranas (Mijit et al., 2020). Durante  $G_0$  y en la fase  $G_1$  temprana, PRB es hipofosforilado y forma complejos con factores de transcripción pertenecientes a la familia de E2F. Estos complejos secuestran a E2F y prohíben su acceso a promotores de la proliferación celular como ciclina B1, dihidrofolato reductasa, protooncogen Jun B y la timidin-cinasa 1 (Junan et al., 2011). La acción concreta de  $p16^{INK4A}$  es la de unirse a las CDK4/6 para aumentar los niveles de PRB e inhibir las actividades de las cinasas,

dentro de las que se incluyen la hiperfosforilación de PRB en G<sub>1</sub> tardía por lo que se separa de E2F y permite la transición a la fase S del ciclo celular. Otra acción de p16 es la de romper complejos de CDK4/6 con inhibidores de CDK's distintos a p16, esto permite liberar dichos inhibidores como p27 y así suprimir la actividad de CDK2 (Junan et al., 2011). Puede contribuir al estado senescente a través de vías alternas e independientes de dos maneras: 1) Por medio de su interacción con TFIID para inhibir la fosforilación del dominio terminal carboxilo (CTD) de la unidad grande de la RNA polimerasa II por la CDK7. 2) Por el contacto con el bucle rico en glicina de la N-terminal de las cinasas c-jun (JNK1, JNK3) y suprime su actividad de cinasa (Junan et al., 2011). Así, en el momento de su activación se reduce la concentración de p53 mientras los niveles de p16<sup>INK4A</sup> se mantienen altos. Un efecto de la activación de esta vía es la formación de SAHF's que pueden ser identificados por medio de anticuerpos contra H3K9me3 (Lapasset et al., 2011; Aird y Zhang, 2013). Esto nos proporciona una característica para identificar una etapa temprana senescente reversible (p53) y una etapa tardía senescente irreversible (p16<sup>INK4A</sup>) (Mijit et al., 2020).

### **1.3.3.-Características que permiten identificar senescencia**

Las células senescentes pueden identificarse por medio del SASP, o por otras características frecuentes en estas células como telómeros más cortos, baja o nula proliferación, una morfología más alargada, por medio de detección de actividad de p53 o p16, y uno de los marcadores más confiables de senescencia como la actividad de SA-β-Galactosidasa que es un remanente de la actividad de β-Galactosidasa ocurriendo a pH 6.0 en los lisosomas y que se puede detectar ya que en las células senescentes se ha observado un aumento en la producción de lisosomas relacionado a la activación de vías autofágicas (Lee et al, 2006).

### **1.3.4.- Clasificación de Senescencia**

La senescencia celular se clasifica de dos maneras:

#### **1.3.4.1.-Senescencia replicativa**

Ocurre cuando los telómeros alcanzan una longitud crítica después de acortarse con cada división celular, ocurriendo aproximadamente a las 60 duplicaciones de la población, esto se recibe el nombre de límite Hayflick. Este acortamiento es interpretado como daño al ADN y activa las vías de p53/p21 y p16/PRB. Si el daño se repara la célula regresa a su estado normal, si no, permanece en senescencia para ser eliminada posteriormente (Wang et al., 2019).

### **1.3.4.2.-Senescencia prematura**

Definida como la senescencia alcanzada antes del límite Hayflick y normalmente es inducida por factores de estrés y de daño directo al ADN. Tiene las siguientes categorías (Wang et al., 2019):

### **1.3.4.3- Senescencia inducida por estrés**

Cuando la población celular se encuentra en condiciones de cultivo sin apoyo de matriz extracelular, con pocos nutrientes, con factores de crecimiento anómalos y con niveles bajos de oxígeno (hipoxia) donde se induce la generación de oxidantes o especies reactivas de oxígeno (ROS:  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^-$ ) activando p53 y p16/PRB (Wang et al., 2019).

### **1.3.4.4- Senescencia inducida por oncogenes**

Es generada por la activación de oncogenes (un cambio estructural en protooncogenes o un aumento en su expresión) y se incluyen BRAF, Ras, Raf, E2F1 generando una senescencia usualmente irreversible ocasionada por las vías p53 y p16/PRB (Wang et al., 2019).

### **1.3.4.5.- Senescencia inducida por pérdida de supresores de tumor**

Generada por la pérdida de las contrapartes de los oncogenes, los supresores de tumor. Se incluyen NF1, BTG3, VHL, PTEN y suelen ser activados por la vía de p53 (Wang et al., 2019).

## **1.4.-Inmortalización**

Al ser inhibidos los mecanismos de supresión de tumores y al activarse oncogenes, se pueden llevar a cabo dos procesos:

**Inmortalización:** La adquisición de un potencial proliferativo que puede sobrepasar el límite Hayflick sin necesariamente implicar algún tipo de daño genómico celular, esto normalmente se genera por la re-expresión de la telomerasa (endógena o exógena) (Mondello y Chiodi, 2013).

**Transformación:** La acumulación de mutaciones en el genoma celular acompañada de un potencial proliferativo por encima del límite Hayflick obtenido por la estabilización telomérica por mutaciones en la región promotora del gen de la telomerasa reverso transcriptasa (TERT) que es la unidad catalítica de la telomerasa (Shay y Wright, 2005).

El proceso de inmortalización es usado en muchos experimentos donde se requiere mantener una línea celular viable durante periodos extendidos de tiempo ya que las células inmortales tienen una

capacidad proliferativa infinita y puede inducirse por diferentes métodos (Re-expresión de TERT y por oncogenes virales). (ABM, 2020):

## **2.- Antecedentes**

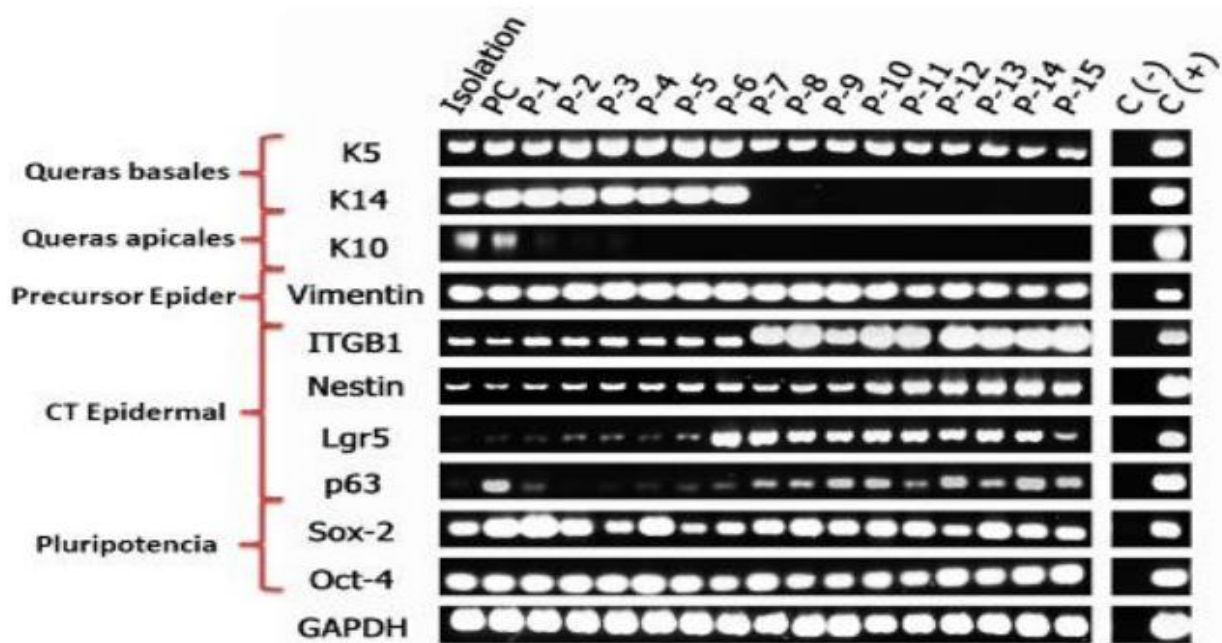
### **2.1.- Reprogramación en fibroblastos senescentes**

En 2011 se realizaron experimentos de reprogramación en células senescentes, este estado senescente se verificó mediante la presencia de p21, p16, SAHF's, y la expresión de SA-beta-galactosidasa. Estos experimentos tuvieron como resultado células que expresaban marcadores de reprogramación de superficie (TRA-1-60, SSEA-4), re-expresión endógena de genes de pluripotencia (OCT4, SOX2, NANOG y REX1), la generación de las 3 capas embrionarias, lo cual se identificó con marcadores para endodermo (SMA), mesodermo (FOXA2) y ectodermo (MAP2) (Lapasset et al., 2011). Sin embargo, esto se llevó a cabo mediante la infección de un cóctel de 6 factores OCT4, SOX2, KLF4, c-Myc, Lin28 y NANOG con un lentivirus como vector, presentando dos desventajas: Que los lentivirus son un vector integrativo de material genético, lo que puede generar mutaciones (Brouwer et al., 2016) y que los genes del coctel han tenido varios reportes de activación de las vías de senescencia por presentar riesgos mutagénicos y esto remueve las posibilidades de aplicaciones clínicas (Brouwer et al., 2016).

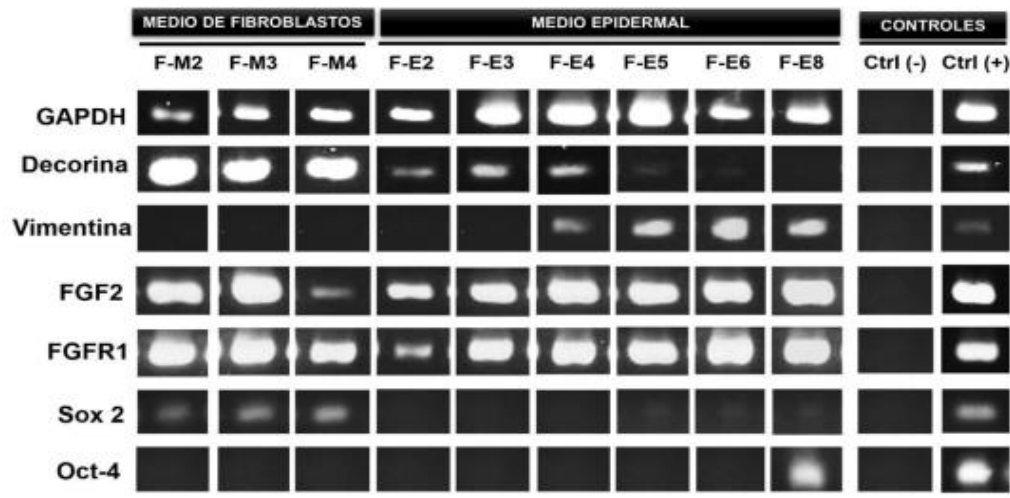
### **2.2.- Antecedentes directos del grupo de investigación**

En el Laboratorio de Células Troncales perteneciente a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y que fue dirigido por el Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia, se tienen reportes de experimentos con un medio epidermal (UDMM-Epi) (Insulina, factor de crecimiento epidermal (EGF), Hidrocortisona, DMEM nutrient mezclature F12 sin HEPES, SFB, antibiótico y Adenina) elaborado en la Unidad de Diagnóstico de Medicina Molecular del Hospital del Niño y el Adolescente Morelense, primero probado en células epidermales. En 2017, se realizaron cultivos con queratinocitos en el medio UDMM-Epi y a partir del pase 3 se observó la expresión de vimentina como marcador de progenitores celulares y la pérdida de expresión de K14 y K10 que son queratinas marcadoras de diferenciación (Esquivel-Estudillo, 2017). Luego, en 2019, se comparó el medio de cultivo mesenquimal (normal para fibroblastos) contra UDMM-Epi en cultivos de fibroblastos, donde se observó que para UDMM-Epi hubo acortamientos del tiempo de replicación (reducido a la mitad), la obtención de la morfología característica de los fibroblastos

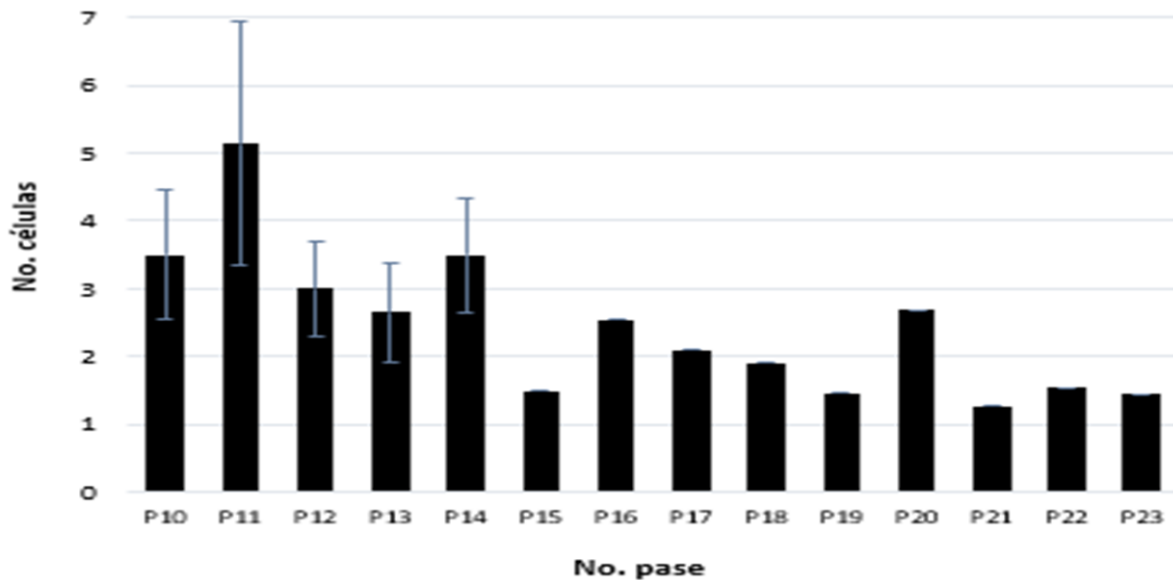
(fusiforme) (Ravikanth et al., 2011; LeBleu y Neilson, 2020) en el primer pase, se obtuvieron densidades de población al doble y se observó la expresión endógena de OCT4, la expresión de vimentina y la pérdida de marcadores de diferenciación para fibroblastos (Decorina) alrededor del pase 8 (Mendiola-Sotelo, 2019). Con base en ambos antecedentes podemos inferir que el medio UDMM-Epi tiene características que le proporcionan la inducción de dediferenciación para células epidermales y mesenquimales (Esquivel-Estudillo, 2017; Mendiola-Sotelo, 2019). Adicionalmente se estableció una cinética celular para fibroblastos hasta el pase 23, en esta se pudo observar que para los fibroblastos neonatos de dermis humana (HDFn) se comenzaba a ver una disminución de la proliferación celular, de las divisiones celulares y una reducción en las horas por división alrededor del pase 18 (Mendiola-Sotelo, 2019).



**Figura 5. Caracterización por PCR de células epidermales durante su propagación.** Se evaluó la expresión de distintos marcadores de identidad para queratinocitos donde desde los pases 7 y 1 se perdieron marcadores de diferenciación (K14 y K10) para las células cultivadas con el medio UDMM-Epi (Mendiola-Sotelo, 2019).

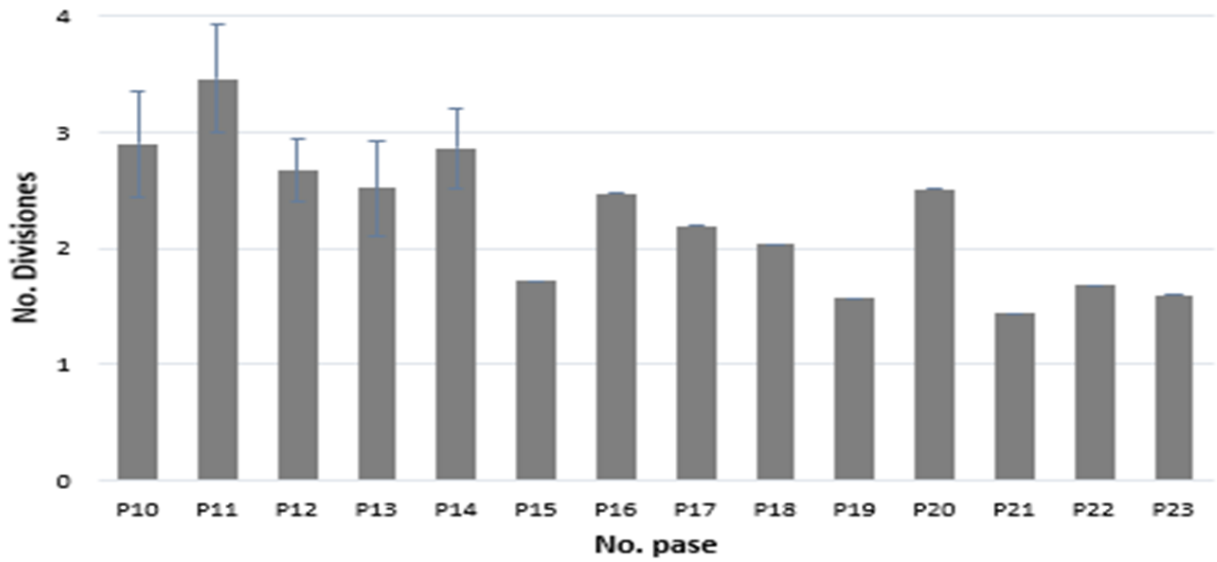


**Figura 6. Expresión de marcadores de precursores y pérdida de marcadores de identidad.** Para los fibroblastos cultivados en medio UDMM-Epi se observó la pérdida de marcadores de identidad (decorina) y la expresión de marcadores de precursores (vimentina) así como de marcadores de pluripotencia (OCT4) (Mendiola-Sotelo, 2019).

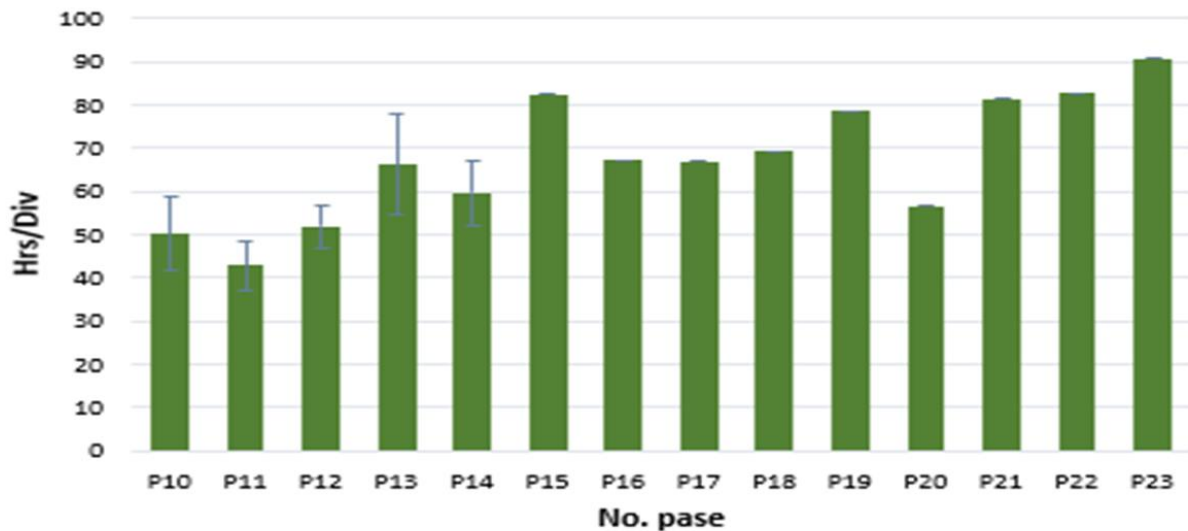


**Figura 7. Rendimiento celular de fibroblastos en pases tardíos.** Se propagaron fibroblastos hasta pases tardíos en donde se observó que a partir del pase 18 hubo una reducción en el número de células obtenidas (Mendiola-Sotelo, 2019).





**Figura 8. Número de divisiones de fibroblastos en pases tardíos.** Se observa que después del pase 18 hubo una reducción en el número de divisiones que las células realizaron durante el cultivo (Mendiola-Sotelo, 2019).



**Figura 9. horas por división celular de fibroblastos.** Durante la propagación de fibroblastos se observó un aumento en las horas por división después del pase 18 (Mendiola-Sotelo, 2019).

### **3.- Justificación**

Actualmente, existe una necesidad por establecer protocolos de reprogramación celular que sean más efectivos que los actuales. Esto no solo repercutirá en el mundo de la investigación in vitro, aumentando la efectividad de la reprogramación y acortando el tiempo necesario para inducir en los cultivos celulares, si no que, también podría extender sus aplicaciones a trasplantes para terapia celular. Es necesario innovar la metodología de reprogramación de manera que no se involucren factores con potencial mutagénico, así mismo, que conlleve reducción de costos y de complejidad (evitando el uso de vectores y de medios de transporte que puedan involucrar afecciones celulares por su uso continuo) además de poder superar barreras a la reprogramación como lo es la senescencia celular. Se debe Emplear un método que no involucre factores de reprogramación de naturaleza oncogénica ni la inhibición de las vías de senescencia (p53, p16) para poder diseñar tratamientos de terapia celular en pacientes de la tercera edad resultando en la generación de, estudios preclínicos para enfermedades neurodegenerativas in vitro. Por ende y con base en los antecedentes, creemos que el método que proponemos (Medio UDMM-Epi) puede ser una respuesta a las necesidades actuales de los medios de reprogramación y es necesario establecer pruebas con células próximas a senescencia para determinar el alcance de este método.

### **4.- Pregunta de investigación**

¿Podrá el medio epidermal, reprogramar fibroblastos cercanos a senescencia hacia un fenotipo pluripotencial?

### **5.- Hipótesis**

El cultivo de fibroblastos próximos a senescencia en medio UDMM-Epi, generará poblaciones de fibroblastos reprogramados a un fenotipo pluripotencial.

### **6.- Objetivos**

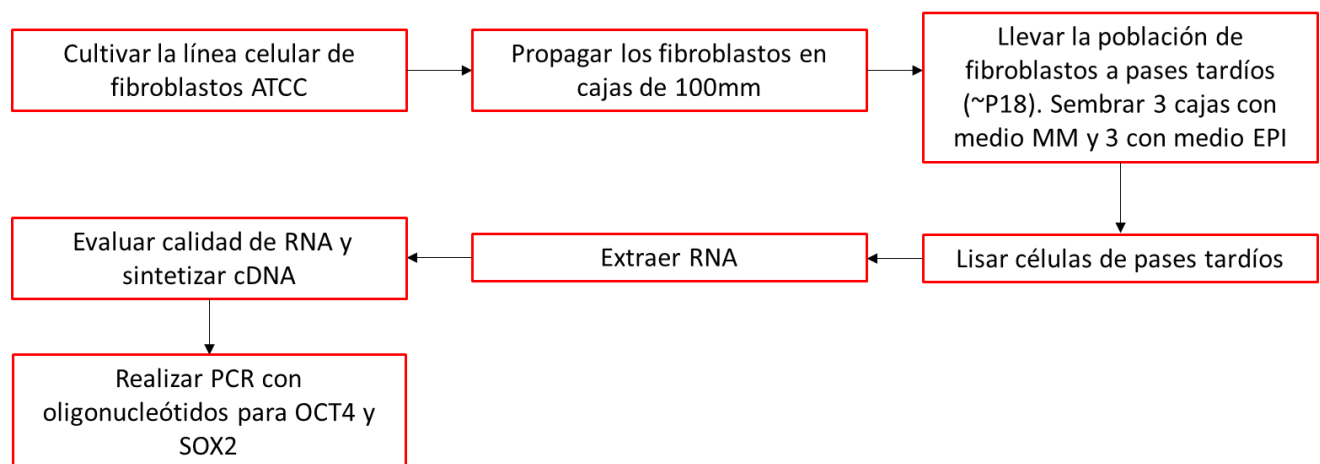
## 6.1.- General:

Evaluar características de reprogramación de fibroblastos próximos a senescencia sembrados en medio epidermal UDDM-EPI.

## 6.2.- Particulares

- Cultivar la línea celular de fibroblastos HDFn (Neonatos de dermis humana) PCS-201-010™ de ATCC.
- Identificar la actividad de factores asociados a senescencia (p53, p16) en las poblaciones celulares por medio de PCR.
- Identificar características de reprogramación por pérdida de actividad de los factores asociados a senescencia y adquisición de marcadores de pluripotencialidad (SOX2, OCT4) mediante PCR.

## 7.- Estrategia Experimental



## 8.- Materiales y métodos

**Tabla 1.- Materiales, equipos y reactivos.**

Reactivo, material o equipo	Marca	Modelo	No. de catálogo	País
Fibroblastos	American Type Cell Culture (ATCC)	N/A	PCS-201-010™	Estados Unidos
Tanque de nitrógeno Líquido	Thermo Scientific	8142	04-979-258	Estados Unidos
Tubos falcon 15mL	Crnglobe	N/A	PD1003N	México
DMEM Nutrient mixture F12	Thermo Scientific	N/A	12500062	Estados Unidos
Suero Fetal Bovino	Thermo Scientific	N/A	16000-0440	Estados Unidos
Antibiótico antimicótico	Thermo Scientific	N/A	15140-23	Estados Unidos
Piruvato de Sodio	Thermo Scientific	N/A	11360070	Estados Unidos
Glutamax	Thermo Scientific	N/A	35050061	Estados Unidos
Tubos Falcon 50mL	Argos Technologies	N/A	TC5000	México
Crioviales de 1.2mL	Corning	N/A	430658	Estados Unidos
Baño María	LabTech	LWB-106D	N/A	Indonesia
Micropipeta 1mL	Gilson	F123602	10387322	Estados Unidos
Centrífuga Escolar	Velaquin	80-2	N/A	México
Azúl de tripano	Thermo Scientific	N/A	3640	Estados Unidos
Cámara de Neubauer	Marienfeld	N/A	640130	Alemania
Caja de cultivo de 10cm	Corning	N/A	CLS430167	Estados Unidos
Incubadora	Binder	CB210	N/A	Alemania
Microscopio invertido	Nikon	TS100	N/A	Japón
Tripsina	Thermo Scientific	N/A	15090-046	Estados Unidos
Trizol	Invitrogene	N/A	155960018	Estados Unidos
Tubos eppendorf 1.5mL	Axygen	N/A	MCT-150-C	Estados Unidos
Cloroformo	J.T. Baker	N/A	917503	Estados Unidos
Isopropanol	J.T. Baker	N/A	908403	Estados Unidos
Vortex	Scientific Industries	G-560	SI-0236	Estados Unidos
Minífuga	Benchmark	C-1008P	N/A	Estados Unidos
Baño seco	Labnet	D1100	N/A	Estados Unidos
Balanza analítica	Scientech	SA210	N/A	Estados Unidos
Horno de microondas	Whirlpool	WM1811D	N/A	Estados Unidos
Agitador	Labline	3508	N/A	India
Espectrofotómetro	Biochrom	80-3006-57	N/A	Inglaterra
2X RNA Loading dye	Thermo Scientific	N/A	R0641	Estados Unidos
Cámara de electroforesis	Thermo Scientific	A2	N/A	Estados Unidos
Tubos eppendorf 0.2mL	Axygen	N/A	PCRT-20F	Estados Unidos
Termociclador	Labnet	TC9610	N/A	Estados Unidos
6X DNA Loading dye	Thermo Scientific	N/A	R0611	Estados Unidos
100bp plus DNA ladder	Thermo Scientific	N/A	SM0321	Estados Unidos
Tritrack Buffer	Thermo Scientific	N/A	R1161	Estados Unidos
Fuente de alimentación	Thermo Scientific	EC-300XL	N/A	Estados Unidos
Transiluminador	Ultraviolet Products (UVP)	TFS-20V	N/A	Alemania

## **9.- Metodología**

### **9.1.- Criopreservación y descongelamiento de fibroblastos**

La línea de fibroblastos PCS-201-010 obtenida de ATCC® (*American Type Cell Culture*), se ha propagado, expandido y se mantiene congelada en un tanque de nitrógeno líquido hasta su uso. Para cultivarlos se prepararon, previamente, un tubo falcon conteniendo 1 mL de medio para fibroblastos ture, Piruvato de sodio y Glutamax y un tubo falcon de 50ml conteniendo medio para fibroblastos. Se sacó un crio vial del tanque de nitrógeno líquido y se colocó en una gradilla de foami para introducirlo en baño maría, previamente calentado, y se mantuvo ahí durante 1 min y así las células se descongelaron gradualmente. se tomó el volumen contenido en el criovial y se depositó en el tubo falcon de 15 mL. Después se centrifugó Se adicionaron de 1-3 ml de medio de fibroblastos. Enseguida se resuspendió el precipitado. Se preparó un tubo Eppendorf al que se le agregó azul de tripano y el medio contenido en el tubo falcon de 15mL, se tomaron 10  $\mu$ L de esta mezcla y se procedió al conteo celular con la cámara Neubauer. Se harán los cálculos pertinentes para obtener el número de células vivas totales, células muertas totales el promedio de células vivas y muertas, y el porcentaje de viabilidad celular para determinar la condición de nuestro cultivo. Posteriormente, se calculó el número de células a cultivar y se sembró el doble de densidad de población celular (1,000,000 de células) en cajas de cultivo de 10 cm para que estas se recuperaran más rápido de los efectos del congelamiento.

### **9.2.- Subcultivo de Fibroblastos**

Se sacaron las células de la incubadora y se visualizaron en el microscopio invertido para crear un registro fotográfico que nos permitiera subir las fotos al programa ImageJ y calcular porcentaje de confluencia celular además de monitorear morfología. Se introdujeron las cajas de cultivo de 10 cm a la campana de flujo laminar, donde posteriormente, se les retiró el medio y se lavaron 2 veces con medio base. Luego se agregó tripsina a cada caja durante 3 min y se introdujeron a la incubadora. Terminado ese tiempo, se verificó que las células se habían desprendido y entonces se inactivó la tripsina agregando. Se transfirió el medio de las cajas a tubos falcon de 15mLy se

centrifugaron, luego, se retiró el sobrenadante hasta dejar el precipitado celular solamente, a continuación, se agregó de medio de fibroblastos y se procedió a hacer el conteo celular y el sembrado de cada caja.

### **9.3.- Medición de confluencia con ImageJ**

Por medio de image J, se cambió el color de las imágenes a blanco y negro Posteriormente, se ajustó un espectro de color rojo hasta que cubrió el área total de las células en la imagen. Después, se selecciona la opción “Analizar”, en seguida la opción “Histograma” y aquí es donde se presentan los niveles de confluencia en las células como una relación de los píxeles ocupados por las células sobre los píxeles totales en la imagen.

### **9.4.- Extracción y purificación de RNA**

Para la extracción de RNA primero se procedió a lisar las células, para esto se adiciona a un tubo falcon de 15mL, donde se tienen las células centrifugadas obtenidas de un cultivo, trizol y se disgregaron mecánicamente, luego, se transfirió el lisado a un tubo eppendorf rotulado. A estos tubos se le adicionó cloroformo y se agitaron por rotación Después, se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 3 min y posteriormente, se centrifugaron. Mientras, se rotularon tubos eppendorf de 1.5 mL para cada muestra, y la fase acuosa recolectada se transfirió a estos. Se adicionó Isopropanol a temperatura ambiente a la fase acuosa y se homogeneizó por medio de un agitador y luego se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y se colocaron los tubos sobre papel absorbente para eliminar el isopropanol restante, se adicionó etanol para homogeneizarlo con agitador e incubarlo a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Se centrifugó y se desechó el sobrenadante conteniendo el etanol. Se agregaron 85 uL de Agua MiliQ libre de ARNasas para resuspender el precipitado celular. Se homogeneizó por vórtex y centrifugó durante 1 min para llevarlo a baño seco, terminando esto, el volumen contenido en el tubo eppendorf se volvió a homogeneizar y centrifugar para colocarlo en hielo. Después, se añadió cloroformo al tubo, se incubó y se transfirió la fase acuosa a nuevos tubos agregando isopropanol y haciendo lavados con etanol frío y se resuspendió el RNA agregando agua MiliQ.

### **9.5.- Preparación de gel de agarosa**

Se prepararon 3 tipos de geles de agarosa, al 1.5% (Análisis de integridad de RNA), al 1.70% y 2.00% (Visualización de productos de PCR). Para esto, primero se pesaron en una balanza analítica las cantidades necesarias de agarosa. Una vez pesada la cantidad deseada, se procedió a verter en un matraz erlen meyer., después, se agregó TBE 0.5% para poder disolver los restos de agarosa que pudieron haberse adherido a las paredes del matraz. Entonces, se calentó la mezcla en un horno de microondas por intervalos. Al final de cada intervalo, se sacó el matraz del horno de microondas para mezclar ligeramente la agarosa. Al terminar se procedió a añadir bromuro de etidio al matraz con agarosa y se colocó en un agitador. Al final, se vertió la agarosa en un molde para geles. Después de 40 min. Los geles se solidifican, se almacenan y usan.

### **9.6.- Análisis de pureza de RNA por medio de Biodrop**

Una vez extraído el RNA, se procedió a colocar 1uL de cada muestra en un espectrofotómetro. Primero se limpió el lector del Biodrop con agua miliQ, luego, se procedió a medir las muestras en un rango de A260/A230 y A260/A280. Donde se puede verificar que tanta luz se absorbe de acuerdo con los niveles de contaminación de las muestras. Los valores aceptados para ambos rangos van de 1.8-2.1. Al mismo tiempo, se obtuvo la concentración de RNA por cada muestra en ug/mL.

### **9.7.- Análisis de integridad de RNA**

Para verificar la integridad de los RNA (Que estén conformados por sus dos subunidades 28S y 18S) se calculó cuánto volumen se debía tomar de las muestras para obtener 1ug de RNA. Entonces, se transfirió el volumen necesario a un tubo de 0.6mL. Luego, se aforó el nivel con agua MiliQ. A cada tubo entonces, se le adicionó 2X RNA Loading dye. Las muestras se homogeneizaron y centrifugaron. Después, se colocaron en baño seco. Una vez finalizado el proceso, se volvieron a centrifugar y luego se colocaron en hielo. Para finalizar se volvieron a centrifugar y se cargaron en un gel de agarosa 1.5% sumergido en TBE 0.5% en una cámara de electroforesis.

### **9.8.- Síntesis de cDNA**

Ya que se verificó la pureza de los RNA y su concentración, se realizaron cálculos para determinar en cuánto volumen de cada muestra podíamos obtener 1ug de RNA (Análisis dimensional). Una

vez teniendo los resultados, se tomó el volumen necesario por cada muestra, se depositó en tubos eppendorf y se aforó con Agua MiliQ. Después las muestras se incubaron a 65°C). Mientras tanto, se descongelaron, homogeneizaron (10 s) y centrifugaron (5 s) los reactivos necesarios para una mezcla de reacción de síntesis de cDNA y se colocaron en un tubo eppendorf. Al término de la incubación de los RNA, se procedió a añadir 20 uL de la mezcla al tubo de cada muestra, al sobrante del tubo de mezcla, se le añadió agua MiliQ para utilizarse como control negativo de síntesis de cDNA en los PCR futuras. Luego, cada tubo de muestra se homogeneizó y centrifugó posteriormente de colocarlos de nuevo en el termociclador en dos ciclos:

### **9.9.- Detección de mRNA por PCR**

Primero, se descongelan todos los reactivos a emplearse para homogeneizar y centrifugarse cada uno posterior a su aplicación (H<sub>2</sub>O MiliQ Buffer para Taq Polimerasa, Cloruro de Magnesio, dNTPs, Oligo directo del gen de interés, oligo reverso del gen de interés y las muestras de interés). Mientras tanto, se prepararon y rotularon tubos para cada muestra. Estos se introdujeron en un enfriador para tubos de PCR y se mantuvieron a -20°C. Una vez descongeladas, homogeneizadas y centrifugadas las muestras, se procedía a hacer cálculos para determinar la cantidad de reactivo a emplearse según el número de muestras, esto, para realizar una mezcla de PCR. Una vez todos los componentes mezclados, se sacó el enfriador con los tubos rotulados y a cada tubo se le agregó mezcla de PCR, luego se agregó la cantidad necesaria de taq polimerasa y entonces se agregaron 1.5 uL de cada muestra a su tubo correspondiente. Entonces, se procedió a colocarlos en el termociclador ya con un programa estandarizado específico para cada gen. Al término del tiempo programado para el termociclador, se agregan a tubos eppendorf, 5 µL de Buffer de Carga 6X para DNA y 10 uL de cada muestra. También, se preparó el DNA Ladder, 1 µL de Buffer Tritrack Posteriormente, se cargaron las muestras y el Ladder en un gel de agarosa al 1.7% o 2%.

### **9.10- Electroforesis en gel de agarosa**

Después de la obtención de los productos en PCR, se realizó electroforesis en gel de agarosa (1.5%,1.7% o 2%) en una cámara de electroforesis con un voltaje de 200 Volts. Posteriormente, se procedió a visualizar los geles en un transiluminador



### **9.11.- Medición de intensidad por ImageJ**

Utilizando la aplicación de ImageJ, se empleó la herramienta de medición de píxeles para obtener una medida semi-cuantitativa de la intensidad de las bandas de RNA obtenidas en la evaluación de integridad.

## **10.- Resultados**

### **10.1.- Cultivo de fibroblastos en medio mesenquimal**

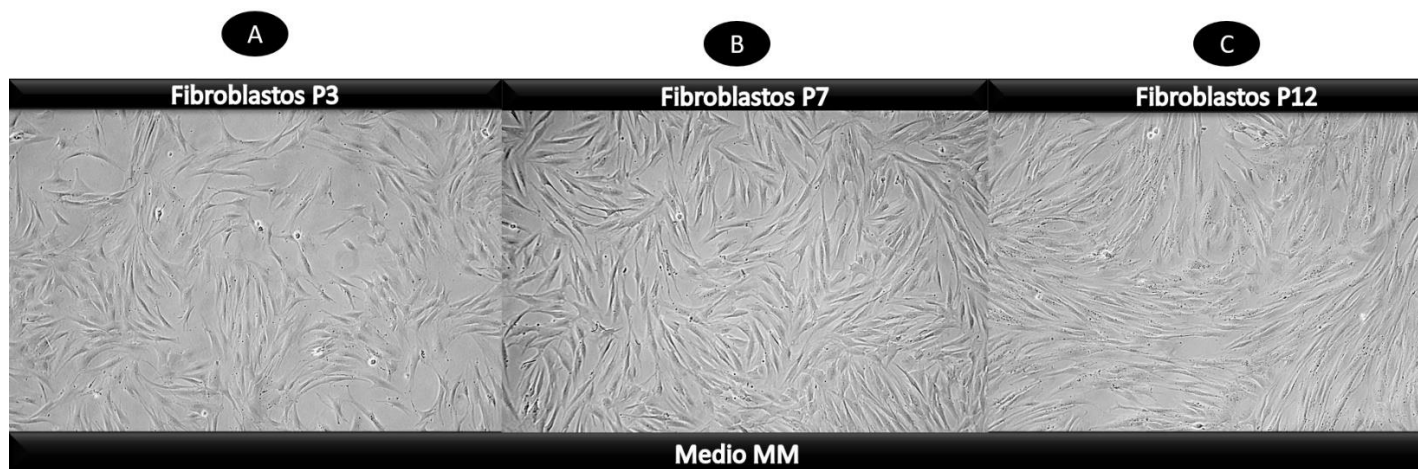
Con la finalidad de generar senescencia replicativa en la población celular de fibroblastos en condiciones adecuadas, se llevó a cabo la primera fase del experimento, que consistió en su propagación durante 17 pases realizando cada tercer día del cultivo un cambio de medio. Se llevó un registro fotográfico con microscopía de contraste. Se realizó un análisis de su comportamiento in vitro por medio de estos parámetros:

- rendimiento celular
- viabilidad
- divisiones celulares
- horas por división.

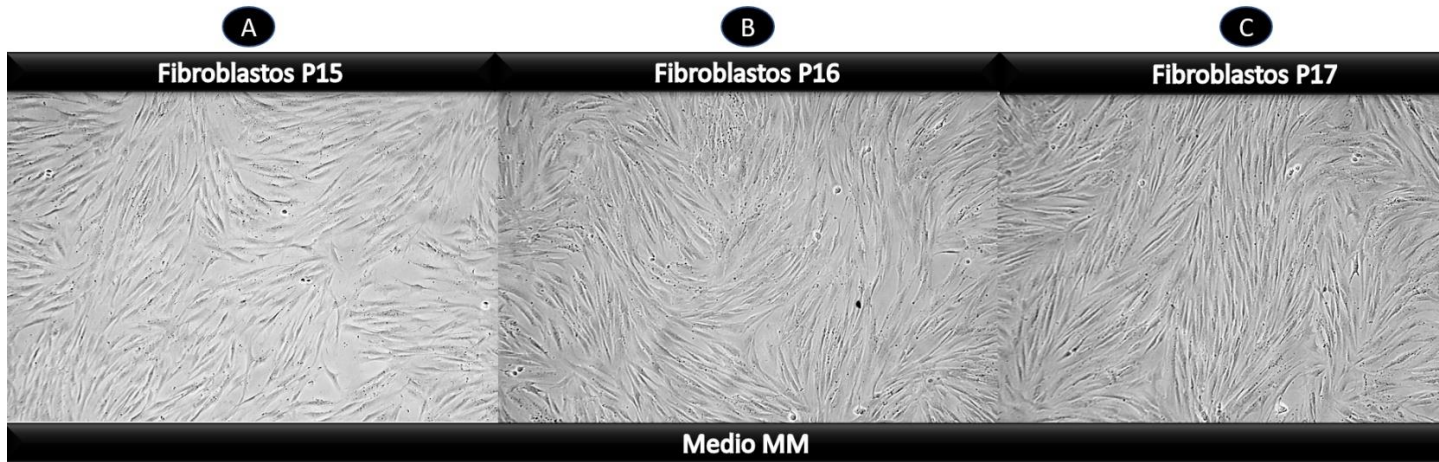
Cabe destacar que hubo variabilidad técnica durante los primeros pases del cultivo (pases del 3-9), estos datos son descritos en las gráficas de los parámetros analizados (Figuras 14-17)

## 10.2.- Cultivo de fibroblastos en medio MM y medio UDMM-EPI

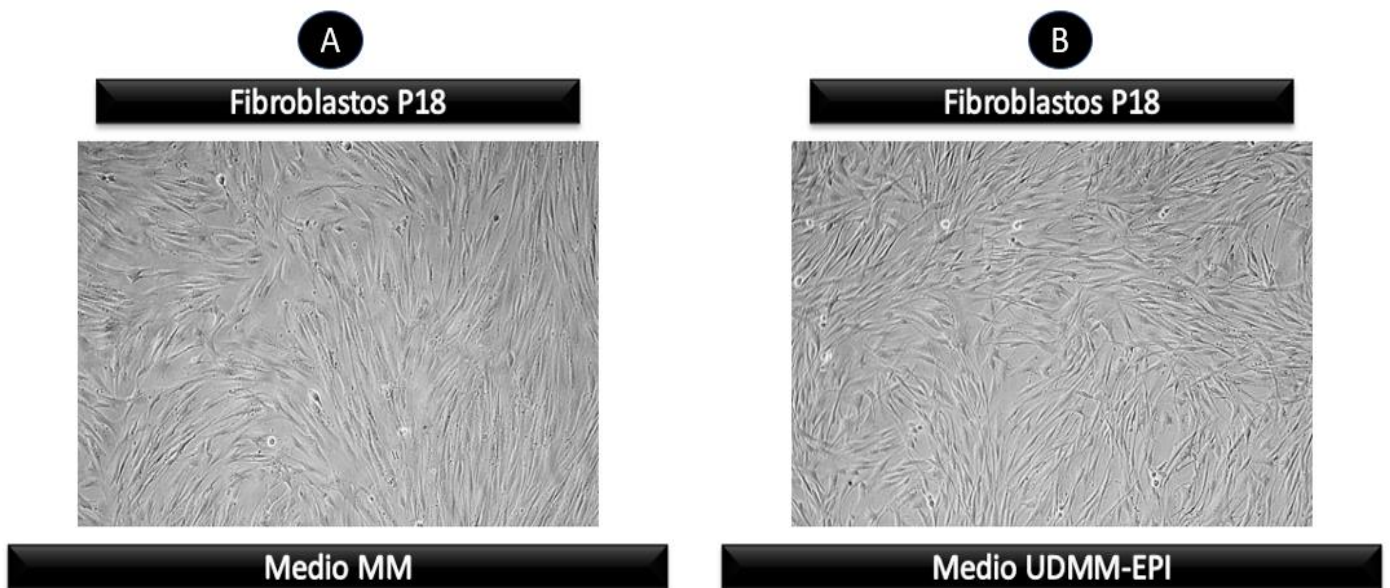
Para el pase 18 se inició con la segunda fase del experimento que consistió en sembrar en 3 cajas de cultivo de 10 cm 500,000 células con medio MM y otras 3 cajas de cultivo de 10 cm con la misma cantidad de células, pero con medio UDMM-EPI. Se observó que los fibroblastos sembrados con UDMM-EPI alcanzaron confluencia del 90% al tercer día, adicionalmente, efectuaron un cambio en su morfología (con centro más pequeño y prolongaciones más largas y delgadas). En cambio, los fibroblastos sembrados en medio MM alcanzaban confluencia del 90% a los 4 días (Fig. 12) y mantuvieron la morfología de los pases tempranos (Véase figuras 10 y 11).



**Figura 10. Conservación morfológica durante pases 3, 7 y 12.** Registro llevado a través de los pases 2, 7 y 12 con el medio mesenquimal donde se puede observar que se mantiene la morfología característica de los fibroblastos (fusiforme) y la confluencia se ve más homogénea llegando al pase 12. Fotografías tomadas con el objetivo 10X y se les agregó escala de grises y contraste en Photoshop. A) Fibroblastos del pase 3 con una confluencia del 64%. B) Fibroblastos del pase 7 con una confluencia del 90%. C) Fibroblastos del pase 12 con una confluencia del 83%.

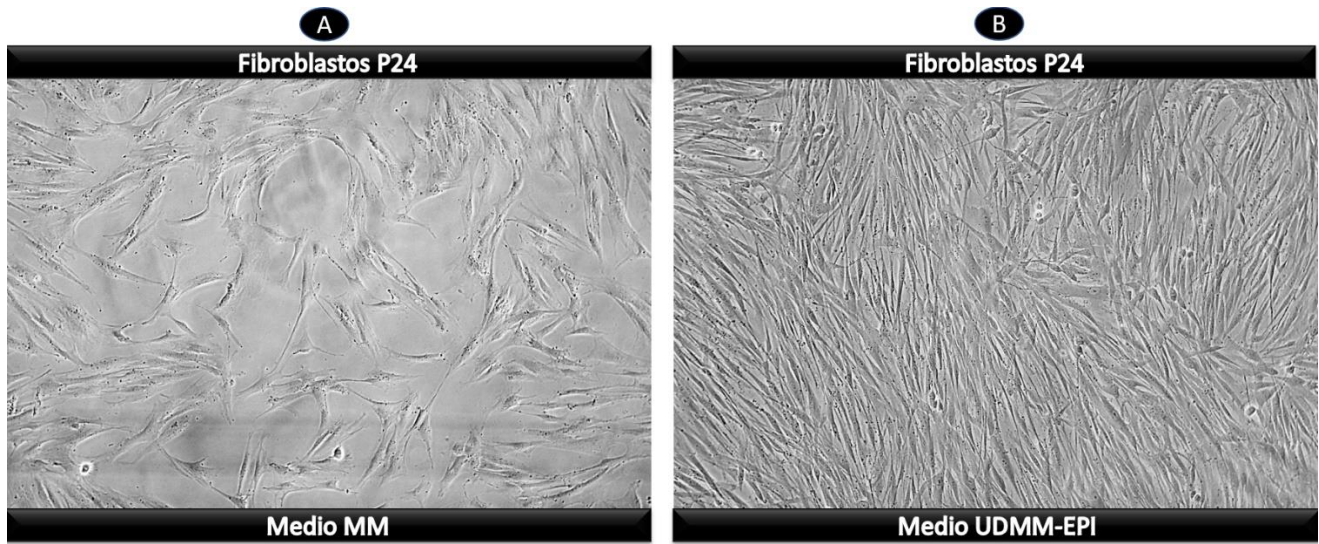


**Figura 11. Conservación morfológica durante los 3 últimos pases de la primera fase.** A) Confluencia al 4to día de cultivo para los fibroblastos de los pases 15 (64%) B) 16 (70%) C) y 17 (74%) en donde el pase 17 es el último de la primera fase del experimento. Se sigue manteniendo la morfología de los fibroblastos (fusiforme).



**Figura 12. Diferencia morfológica en fibroblastos cultivados con medio UDMM-EPI.** B) Primer pase de la comparación donde se observan diferencias morfológicas para los fibroblastos sembrados en medio UDMM-EPI. A) Mientras que los fibroblastos sembrados con medio MM mantienen su morfología.

Para el pase 24 es notable la diferencia de confluencia entre los fibroblastos con medio UDMM-EPI (100% a los 3 días) y los fibroblastos con medio MM (55% a los 4 días). Para la condición MM podemos observar muchos espacios en la caja de cultivo después de 4 días. En cambio, para la condición UDMM-EPI vemos una confluencia homogénea con la morfología alterada que se adquirió en el pase 18 (Figura 13).

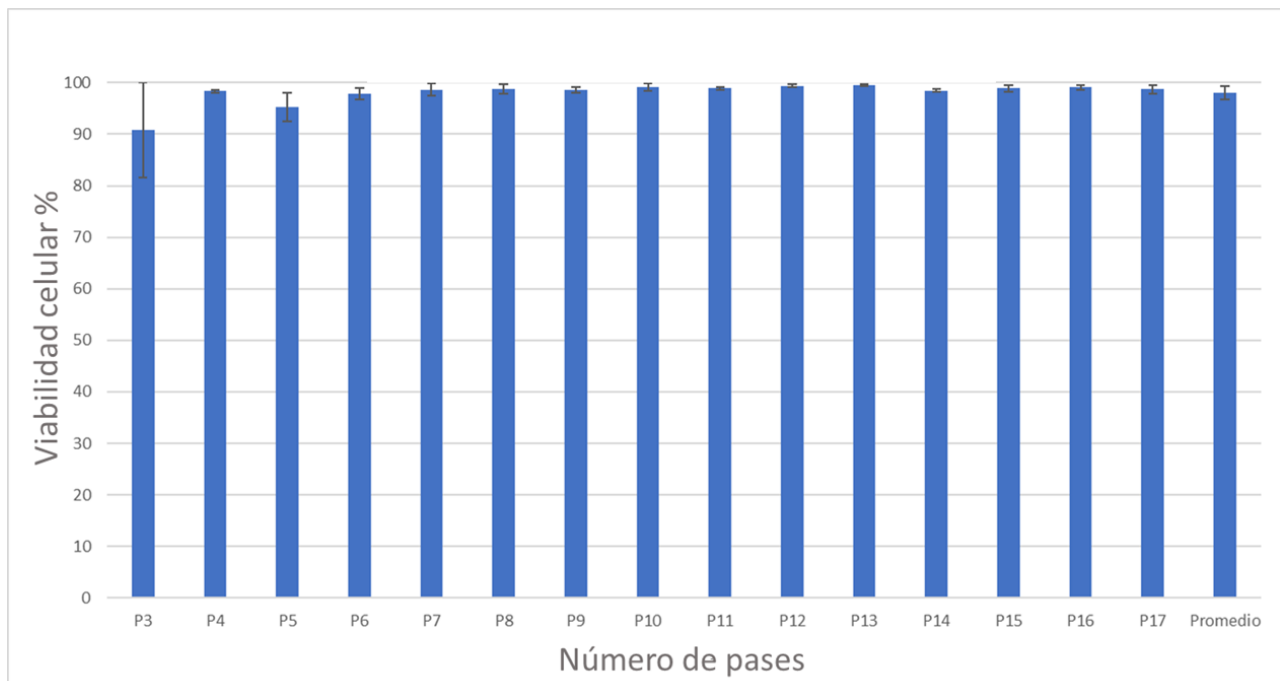


**Figura 13. Mayor confluencia en fibroblastos con medio UDMM-EPI.** B) En el pase 24 los fibroblastos sembrados con medio UDMM-EPI muestran una proliferación más rápida, llegando a confluencia (100%) al tercer día y conservan su morfología alterada. A) Los fibroblastos en medio MM muestran menos células después de 4 días (confluencia del 55%) y conservan su morfología típica (fusiforme).

### 10.3.- Viabilidad, rendimiento, número de divisiones celulares y horas por división

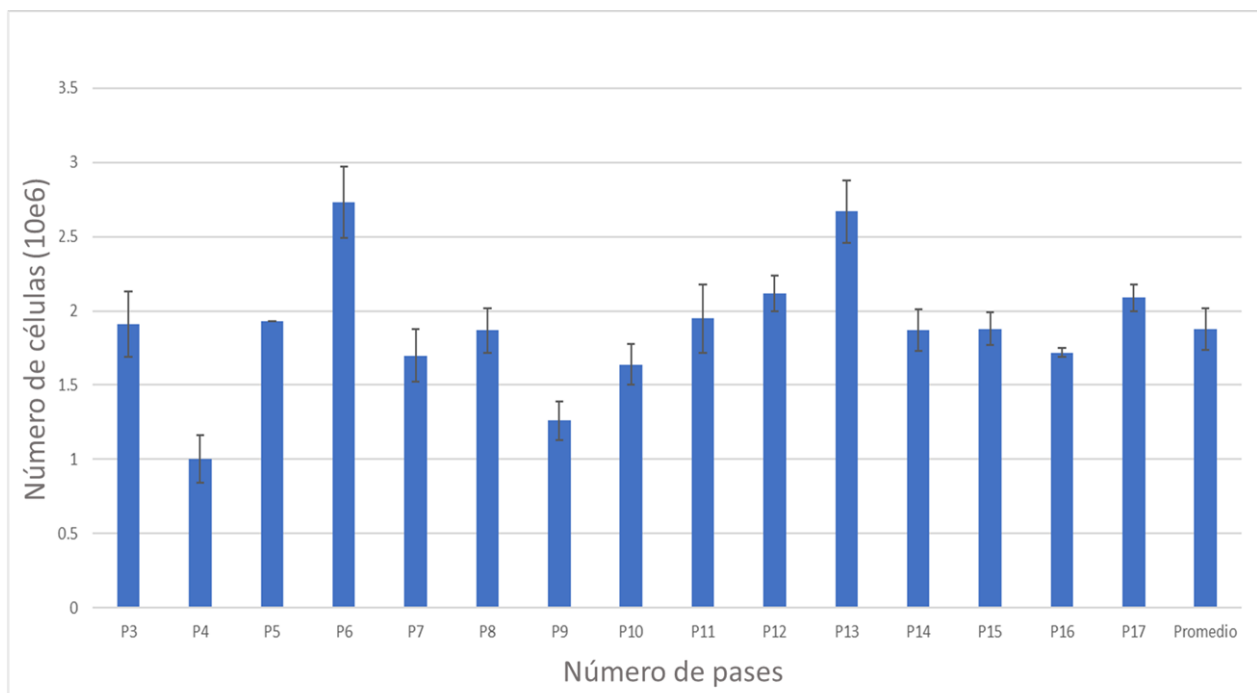
Para poder establecer una comparación de los parámetros antes mencionados (viabilidad, rendimiento celular, divisiones celulares y horas por división) entre ambos medios (Mesenquimal y Epidermal) se llevó a cabo un análisis cuantitativo por medio de los cálculos obtenidos a partir del conteo de células con la cámara Neubauer, y calculando la desviación estándar entre los triplicados para cada pase, con la fórmula (desviación estándar= (Raíz cuadrada (sumatoria (cada dato-promedio)<sup>2</sup>/N)).

Para verificar un manejo adecuado de los cultivos de fibroblastos durante los primeros 17 pases, se llevó a cabo un registro de la viabilidad de las células mediante una fórmula (células vivas totales/células muertas totales\*100) así, obteniendo un promedio de los triplicados de cada pase. En la primera fase del experimento se obtuvo un promedio de 98.03% de viabilidad celular a través de 17 pases de cultivo. (Figura 14).



**Figura 14. Viabilidad celular óptima utilizando el medio MM.** Gráfica de viabilidad para los primeros 17 pases. La desviación estándar promedio para estos cálculos fue de 1.32 demostrando, que nuestros datos están dispersos alrededor del promedio debido a variabilidad técnica, por lo tanto, no se puede llegar a una conclusión sobre viabilidad celular en esta fase del experimento. n=1 con triplicados técnicos. D. Estándar, DESVEST= Desviación Estándar.

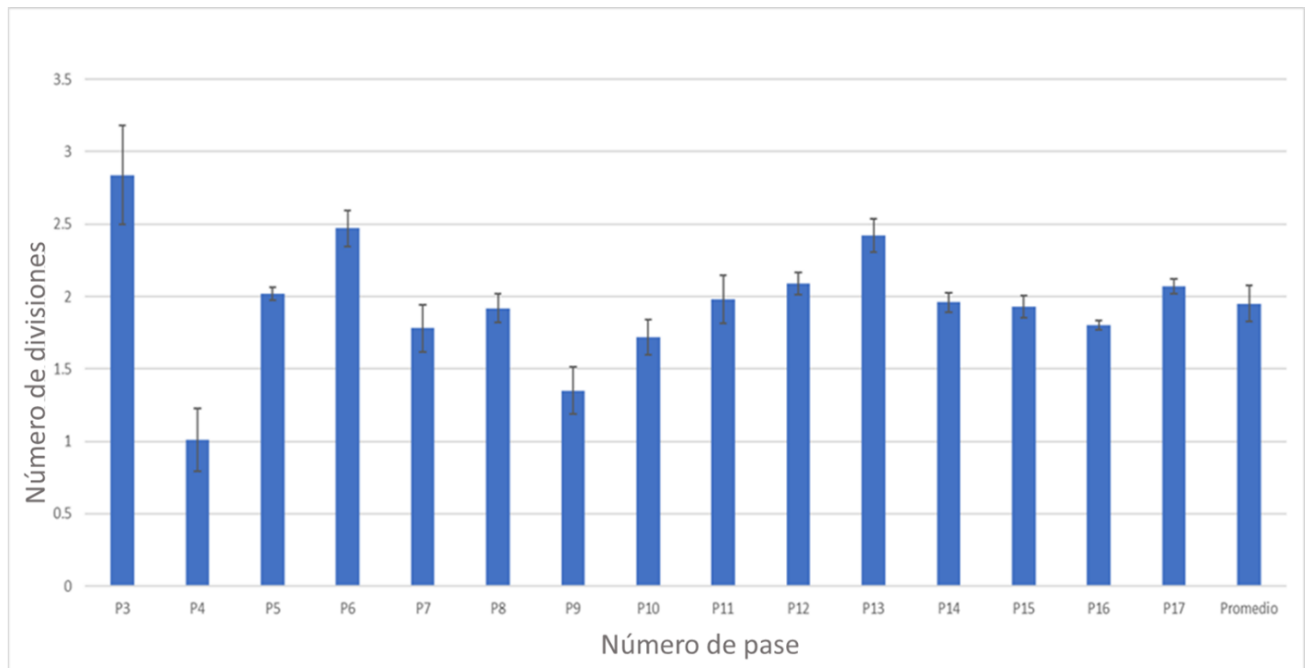
Con el fin de demostrar que los fibroblastos presentaron un patrón de crecimiento celular similar a lo largo de 17 pases, se llevó a cabo un registro del número de células vivas totales obtenidas. Esto con el fin de demostrar que no había reducción de crecimiento (posible senescencia). Para esto se utilizó una fórmula ( $\text{rendimiento} = \text{células vivas} * 20,000 * \text{Vol. de medio dividido entre } 5$ ). Obteniendo un promedio de  $1.88 \times 10^6$  células alrededor de 17 pases (Figura 15).



**Figura 15. Rendimiento celular de fibroblastos con medio MM.** Gráfica de rendimiento celular, con una desviación estándar de 0.14. El rendimiento promedio para los fibroblastos de la primera fase fue de 1.88 millones de células. n=1 con triplicados técnicos. D. Estándar= Desviación Estándar.

Para demostrar que los fibroblastos a través de 17 pases tuvieron un número de divisiones celulares homogéneo y que estos no se encontraban totalmente quiescentes (en latencia), se determinó el número de divisiones promedio para cada pase de cultivo. Esto se hizo mediante un cálculo ( $\text{Log}_2$

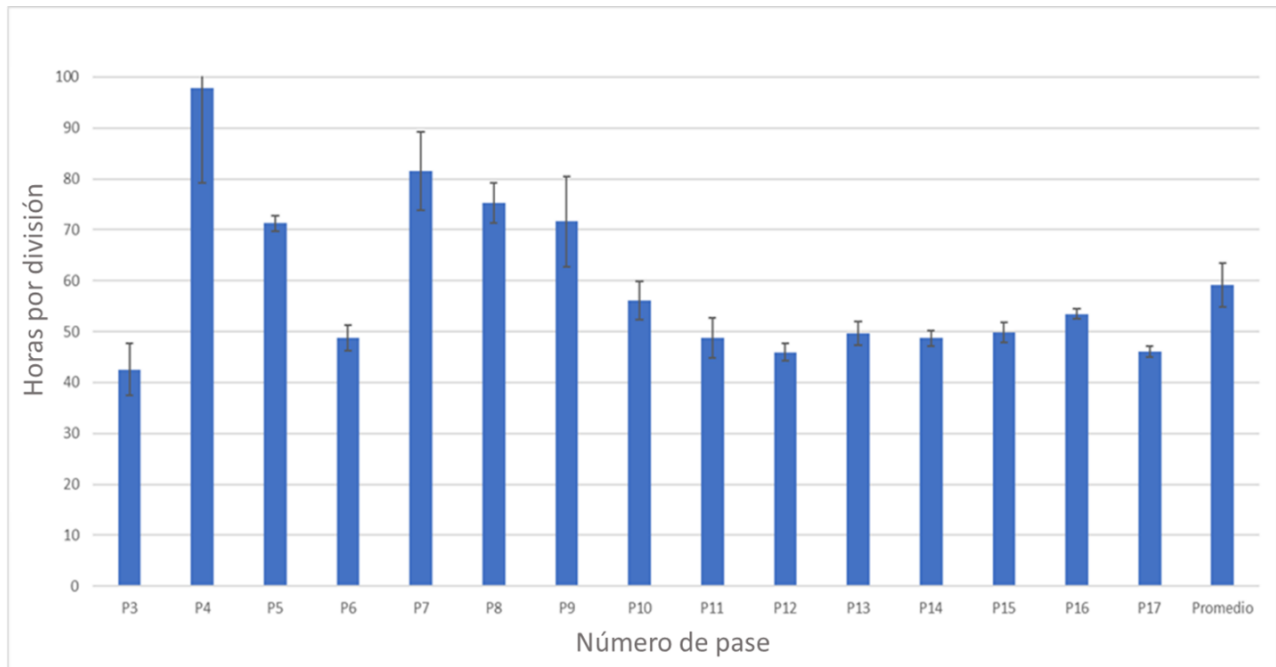
(Células totales/Células sembradas)). Obteniendo un promedio de 1.95 divisiones a través de 17 pases (Figura 16).



**Figura 16. Número de divisiones celulares de fibroblastos durante 17 pases con medio MM.** Gráfica del número de divisiones celulares con una desviación estándar de 0.12. El promedio de divisiones celulares para estos 17 pases fue de 1.95. n=1 con triplicados técnicos D. Estándar= Desviación estándar.

Para comparar con el promedio de horas por división celular (H/D) establecido por ATCC (~45h/d), se llevó a cabo un registro de las horas por división celular, es decir, en cuanto tiempo tardan las células de nuestro cultivo en dividirse. Esto se llevó a cabo mediante una fórmula (número de horas del cultivo/número de divisiones). Obteniendo un promedio de 59.15 horas por división celular. Representando un aumento del presentado por ATCC.



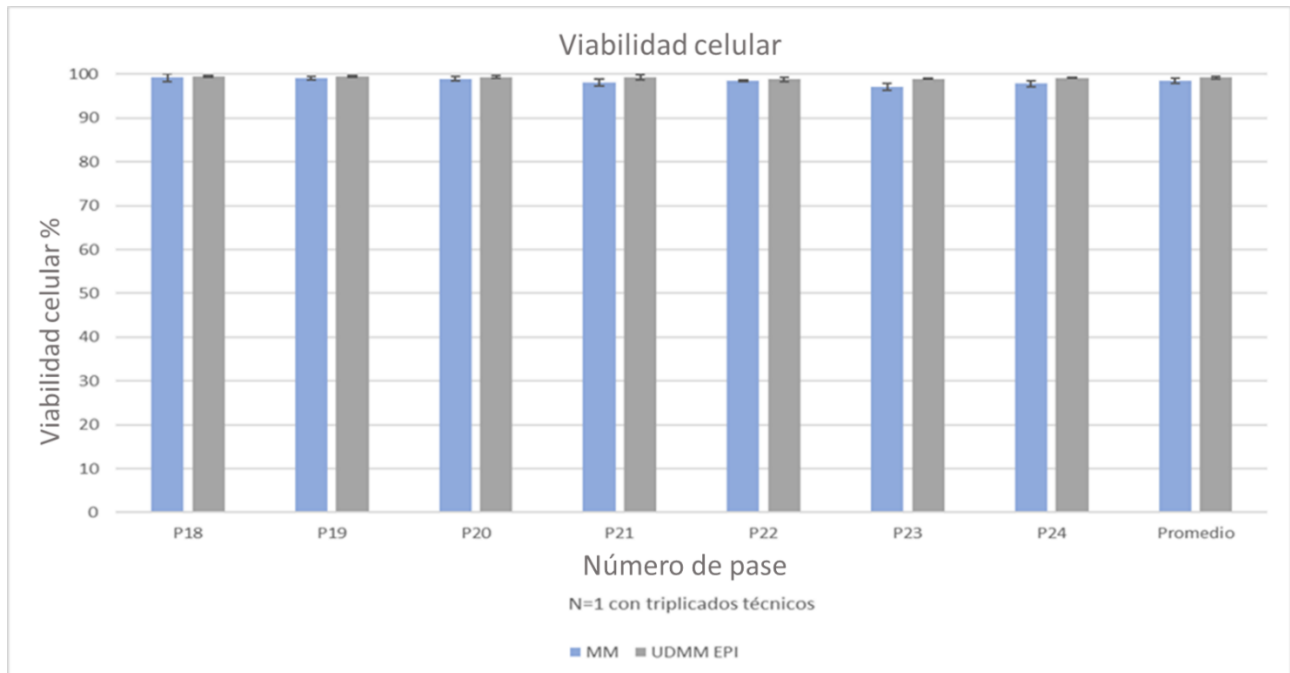


**Figura 17. horas por división de fibroblastos durante 17 pases con medio MM.** Gráfica de las horas por división celular donde la desviación estándar fue de 4.35, por lo que no podemos llegar a una conclusión con nuestros datos. n=1 con triplicados técnicos.

#### 10.4.- Cultivos con medio MM y medio UDMM-EPI en pases tardíos

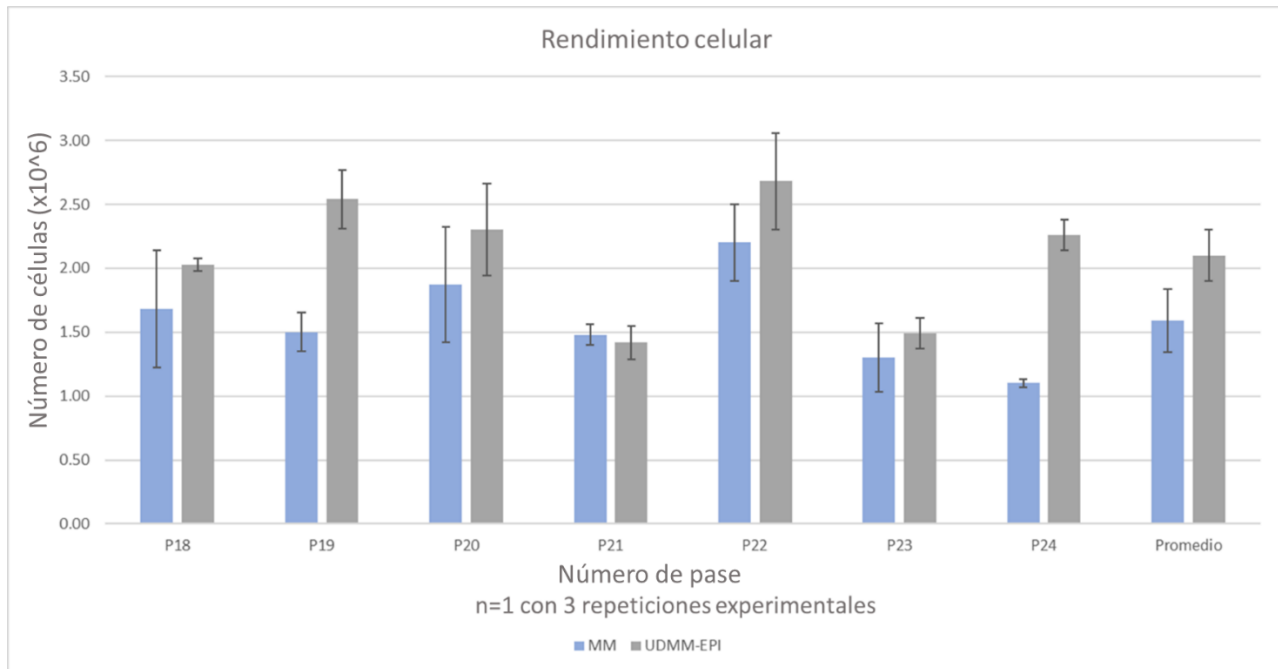
Para la segunda fase del experimento se analizaron los mismos parámetros, pero ahora en comparación con el medio UDMM-EPI en pases tardíos (~P18) para que las células estén prontas a senescencia (Mendiola-Sotelo, 2019; Mancini et al., 2012). Se analizó la viabilidad celular utilizando ambos medios (MM y UDMM-EPI) para ver cual presentaba una viabilidad más alta. El medio UDMM-EPI mantuvo una viabilidad mayor incluso en pases tardíos, de 99.21%. Mientras que el medio mesenquimal obtuvo un promedio de 98.43%. Se destaca entonces, un buen manejo de los cultivos celulares y empleo de reactivos para ambos medios.





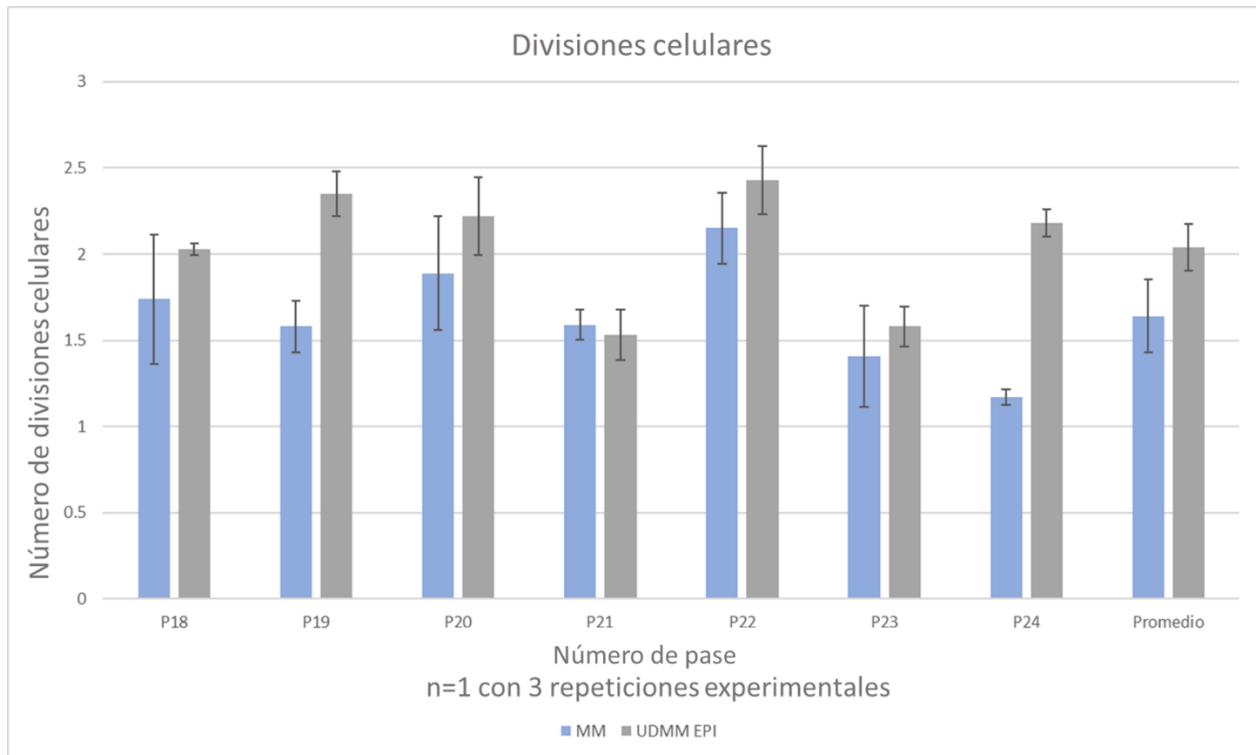
**Figura 18. Mayor viabilidad celular en fibroblastos con medio UDMM-EPI.** Gráfica de viabilidad para ambos medios, con una desviación estándar para el medio MM de 0.25 y para UDMM-EPI de 0.2. Indicando una viabilidad por encima del 90%, significando un buen manejo de los cultivos. El medio UDMM-EPI otorga una mayor viabilidad celular. n=1 con triplicados técnicos.

Para determinar cuál medio tenía un mayor rendimiento celular, se llevó a cabo un registro del rendimiento a través de los pases 18-24 de cultivo celular. En el análisis del rendimiento celular se obtuvo un promedio de 2.10 millones de células para el medio UDMM-EPI, mientras que, para el medio MM fue de 1.59 millones de células. Se observa un promedio de rendimiento celular más alto para las células en medio UDMM-EPI incluso en pases tardíos. Con medio UDMM-EPI se alcanza la confluencia a los 3 días y con MM a los 4 días. Se destaca la disminución del número celular para el medio UDMM-EPI en los pases 21 y 23 debido a que el subcultivo se llevó a cabo a las 64 h, sin embargo, se alcanzaron números similares a los obtenidos con medio MM en menos tiempo.



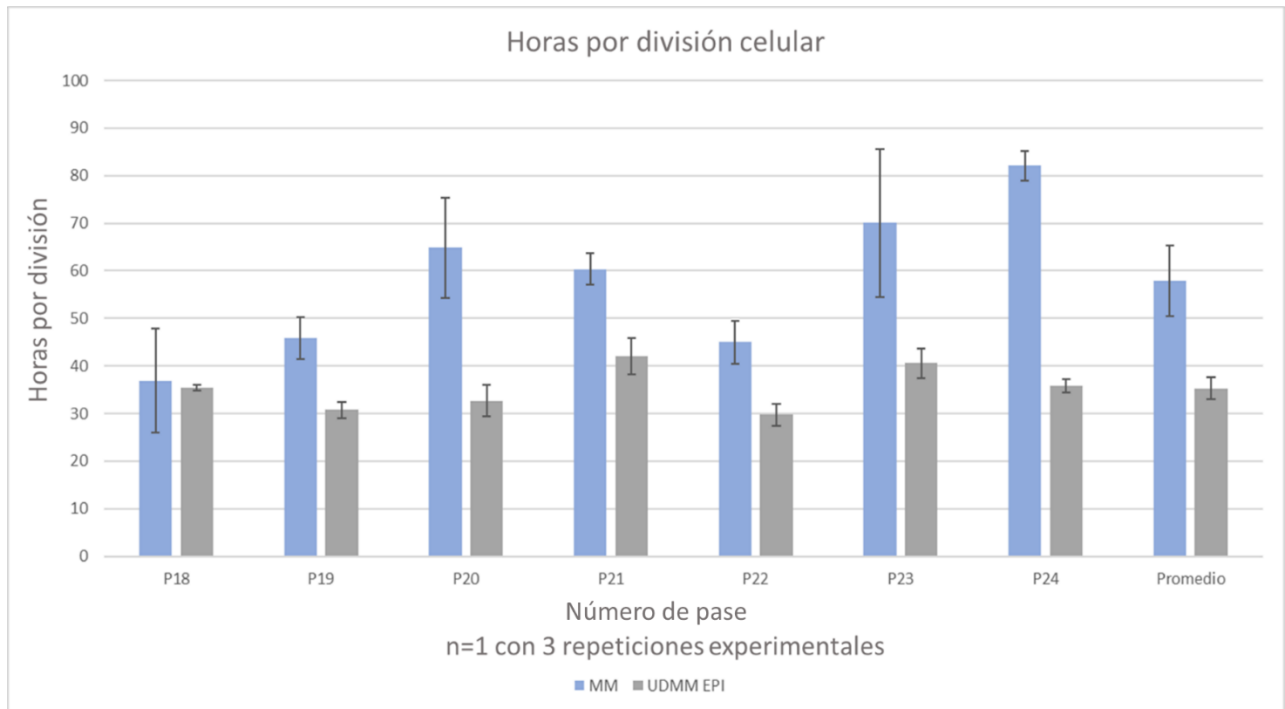
**Figura 19. Mayor rendimiento celular con medio UDMM-EPI.** gráfica de rendimiento celular para medio MM y UDMM-EPI, con una desviación estándar para el medio MM de 0.25 y para UDMM-EPI de 0.20. El medio UDMM-EPI entonces, otorga un rendimiento celular más alto en pases tardíos. n=1 con triplicados técnicos.

Con el fin de determinar qué medio promovía un mayor número de divisiones celulares, se llevó a cabo un registro de las divisiones promedio en los pases 18-24. En el número de divisiones celulares se obtuvo un promedio de 1.64 divisiones medio MM y de 2.04 divisiones con medio UDMM-EPI. Así, el medio epidermal tiene un aumento del 24% en comparación al medio mesenquimal.



**Figura 20. Mayor número de divisiones celulares con medio UDMM-EPI.** A) Promedios de divisiones celulares para los fibroblastos en medio MM y medio UDMM-EPI. B) Gráfica para el número de divisiones celulares entre el medio MM y medio UDMM-EPI, con una desviación estándar para el medio MM de 0.21 y para UDMM-EPI de 0.13. Los fibroblastos cultivados con medio UDMM-EPI tienen un mayor número de divisiones celulares. n=1 con triplicados técnicos.

Con el fin de determinar qué medio producía más divisiones celulares en menos tiempo, se llevó a cabo un registro de las horas por división celular. Se observó que, para el medio epidermal hubo una tendencia de reducción del 39.04% (35.27 h en promedio) en las horas por división celular. Posiblemente, el medio epidermal entonces, favorece un mayor número de divisiones en pases tardíos.



**Figura 21. Menor número de horas/división con medio UDMM-EPI.** A) promedios de horas por división para los fibroblastos en medio MM y medio UDMM-EPI. B) Gráfica de las horas por división con una desviación estándar para medio MM de 7.50 y para UDMM-EPI de 2.33. No podemos llegar a una conclusión de nuestros datos. n=1 con triplicados técnicos.

## 11.- Obtención de RNA y análisis de pureza

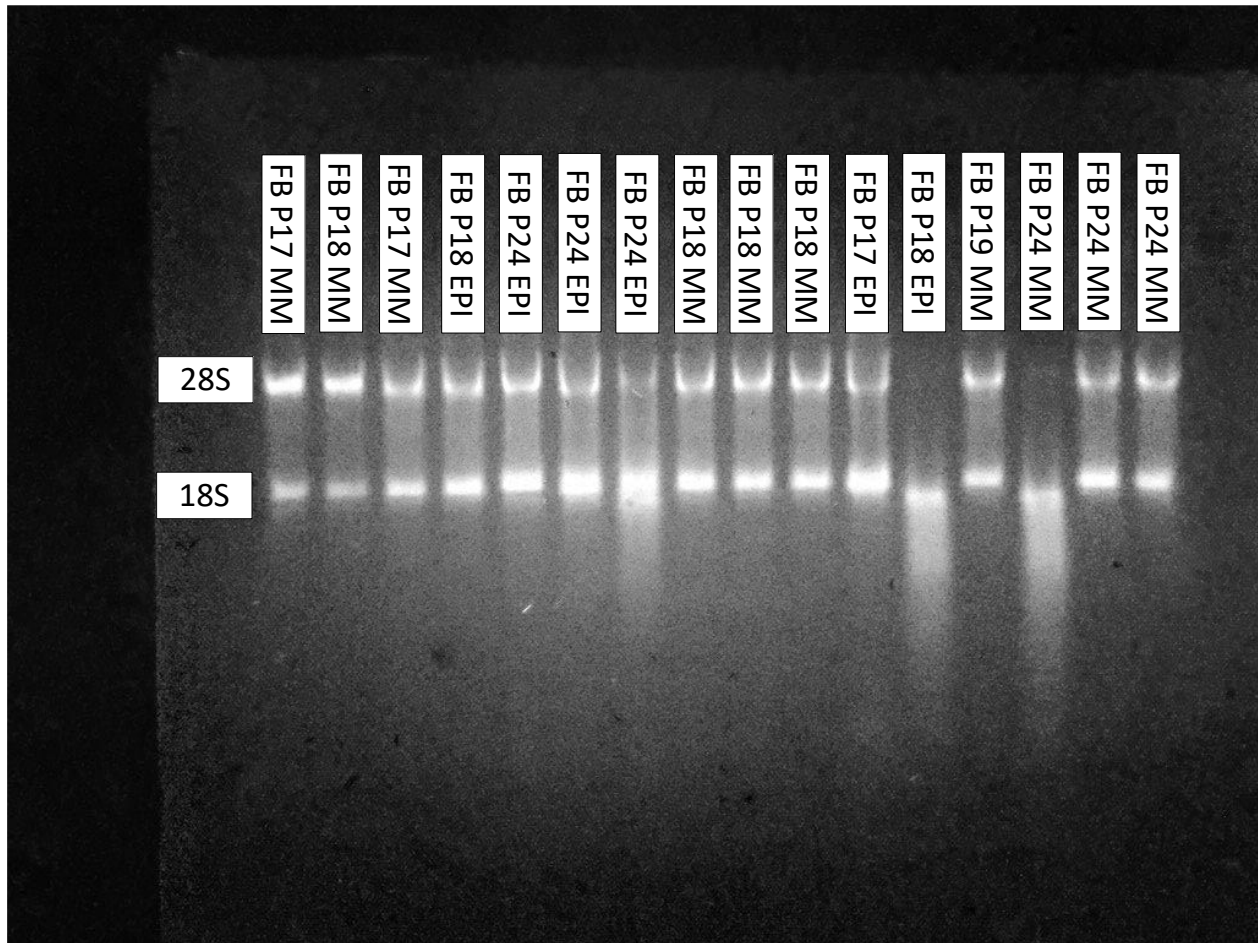
Se obtuvo RNA de 17 muestras pertenecientes a los pases 17, 18, 19 y 24 de fibroblastos cultivados con medio mesenquimal y medio epidermal, posteriormente, se obtuvieron sus lecturas de pureza y concentración en el Biodrop (Figura 22). La muestra 3 (P17  $6 \times 10^5$ ) fue descartada debido a que su concentración fue muy baja (4.67ng/uL) para proceder a la síntesis de cDNA con un volumen de 30  $\mu$ L Matlock, en 2015 describe que los niveles de pureza adecuados son de 2.0 para el rango de A280 y de A230 entre 2.0-2.2, sin embargo, Thermo Fisher en 2015 describe rangos aceptables para ambas lecturas de 1.8 a 2.1, por lo que, se decidió evaluar la integridad y contaminación de los RNA de las muestras por medio de un gel de agarosa al 1.5%.

Nombre	Concentración (ug/mL)	A260/A230	A260/A280	Volumen a tomar para 1ug
P17 MM	171.4	0.863	1.859	5.83 uL
P18 MM	356.2	1.612	1.793	2.81 uL
<b>P17 MM</b>	<b>4.673</b>	<b>0.661</b>	<b>1.521</b>	<b>214 uL</b>
P17 MM	168.2	1.925	1.734	5.95 uL
P18 EPI	275.1	1.738	1.738	3.64 uL
P24 EPI	710	2.015	1.87	1.41 uL
P24 EPI	867.4	1.422	1.935	1.15 uL
P24 EPI	710.9	1.376	1.921	1.41 uL
P18 MM	461.9	2.059	1.819	2.16 uL
P18 MM	400.6	1.884	1.836	2.5 uL
P18 MM	397.7	1.956	1.827	2.51 uL
P17 EPI	1916.5	2.015	1.882	0.52 uL
P18 EPI	765.5	2.146	1.88	1.31 uL
P19 MM	228.6	1.255	1.823	4.37 uL
P24 MM	759.5	2.076	1.886	1.32 uL
P24 MM	406.5	1.881	1.847	2.46 uL
P24 MM	275.4	1.921	1.791	3.63 uL

**Tabla 2.- Lecturas de espectrofotometría para evaluar la pureza de las 17 muestras de RNA obtenidas de distintos pases del cultivo de fibroblastos con medio mesenquimal (MM) y epidermal (EPI).** Para la evaluación de pureza, se puede observar que la mayoría de las muestras se encontraron en un rango de ~1.8 - ~2.1, con niveles de concentración aceptables para una reacción de síntesis de cDNA de 30uL.

## **12.- Evaluación de integridad del RNA de las muestras**

Con la metodología descrita (página 37) se realizó la evaluación de integridad del RNA. En donde se observaron dos bandas. La banda superior pertenece a la subunidad 28s y la inferior a la 18s de los RNA, donde 28s debe tener una relación 2:1 en intensidad respecto a 18s (Wieczorek, Delauriere y Schagat, s.f.). Para los resultados, se observó que, las muestras no contaban con dicha relación (Medido con ImageJ). Demostrando que, los RNA de las muestras se encontraban parcialmente íntegros (Figura 23).



**Figura 22. Integridad parcialmente óptima de las muestras de RNA.** Se realizó la evaluación de integridad de RNA de 16 muestras (pases 17-24 con medios MM y EPI). Se observa que la mayoría de las muestras se encuentran parcialmente íntegras al conservar sus dos bandas (representando las subunidades 28s, arriba y 18s, abajo) Los RNA del P18 EPI y P24 MM se encuentran degradados. Sin embargo, no se muestran otras bandas por encima o por debajo de las dos subunidades, lo que indica que las muestras no están contaminadas (Tirabassi, 2014).

<b>Muestra</b>	<b>28s</b>	<b>18s</b>
P17 MM	176.995	170.409
P18 MM	201.299	171.424
P17 MM	204.512	213.224
P18 EPI	201.787	237.726
P24 EPI	217.748	246.141
P24 EPI	192.772	241.428
P24 EPI	162.583	239.931
P18 MM	214.796	235.988
P18 MM	214.364	223.423
P18 MM	205.204	235.423
P17 EPI	181.676	226.617
P18 EPI	89.223	217.981
P19 MM	194.833	216.768
P24 MM	84.337	212.842
P24 MM	166.367	215.561
P24 MM	189.738	210.724

**Tabla 3.- Datos de intensidad entre subunidades 28s y 18s de los RNA de las muestras de los pases 17-24.** En ninguna de las muestras de RNA, se observa una relación 2:1 entre la subunidad 28s y 18s (Medido con ImageJ por medio del método descrito en la página 39, sección 7.7), nuestras muestras entonces se encuentran parcialmente íntegras y son útiles para la síntesis de cDNA.

Posterior a la evaluación de pureza e integridad de los RNA de las muestras, hubo un problema técnico presente en un ultra-congelador (Ultrafreezer So-Low, Serie: U85-18). Donde, normalmente, funciona a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Fabre, Colotte y Bonetta, en el 2014 reportan que dicha temperatura es en la que los RNA se conservan sin actividad de ribonucleasas y temperaturas mayores aumentan la reactividad del RNA. El ultracongelador se encontró funcionando a  $-13^{\circ}\text{C}$  a lo largo de un máximo de 10 horas por lo que se decidió evaluar de nuevo la pureza de las muestras.

### 13.- Segunda evaluación de pureza

Se realizaron las lecturas de las muestras de nuevo en el espectrofotómetro, y es notable que la pureza de las muestras se degradó casi al doble por encima y por debajo de los niveles adecuados. Sin embargo, siguieron conservando una concentración aceptable, pero el rango de absorbancia sufrió alteraciones, por lo que, se sospechó de posible contaminación, por lo cual se procedió a evaluar la integridad de nuevo (tabla 3).

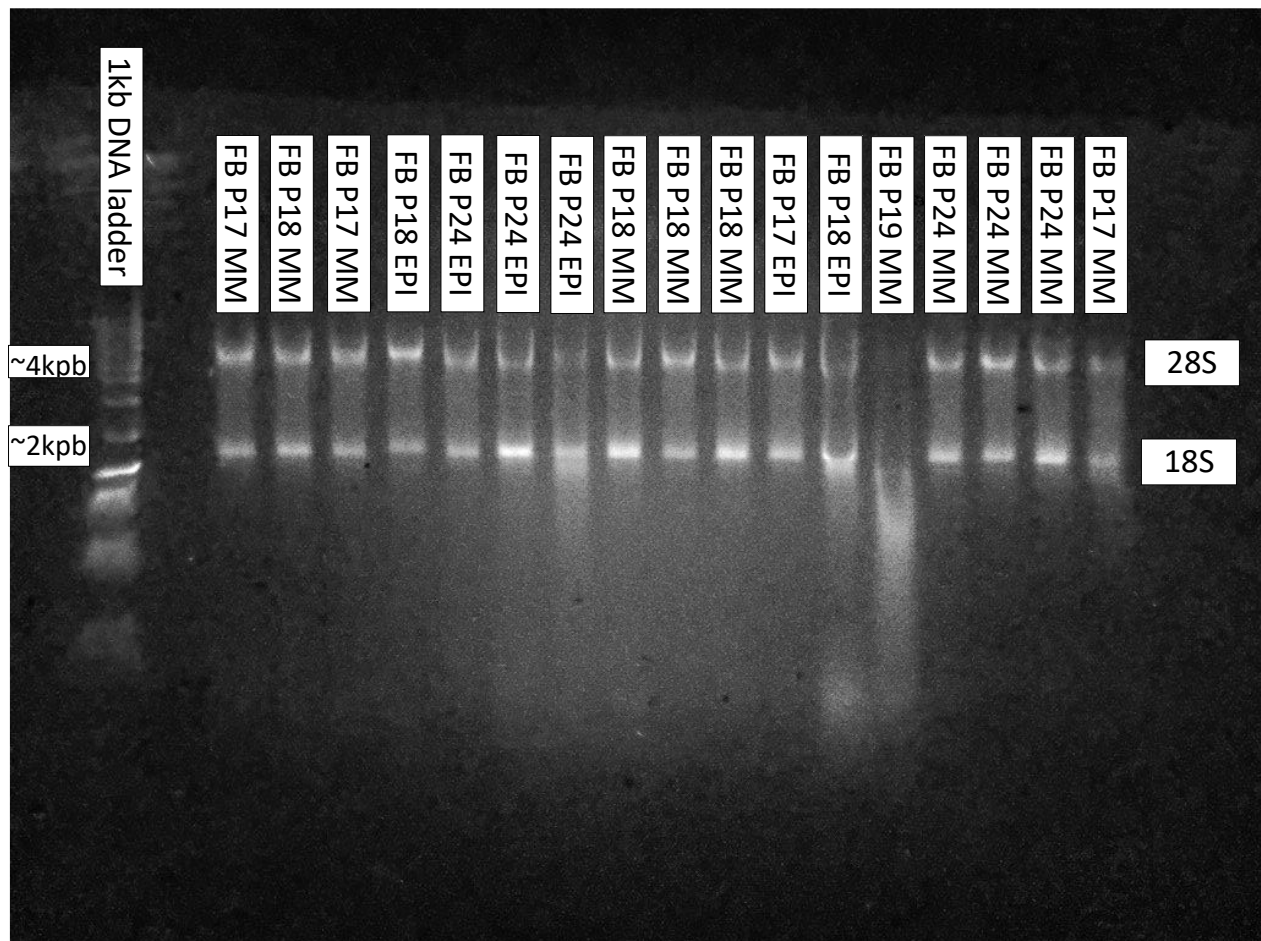
Nombre	Concentración (ug/mL)	A260/A230	A260/A280	Volumen a tomar para 1ug de RNA
P17 MM	252.8	0.938	4.451	3.96 uL
P18 MM	255.3	0.15	3.934	3.92 uL
<b>P17 MM</b>	<b>4.673</b>	<b>0.661</b>	<b>1.521</b>	<b>214 uL</b>
P17 MM	765.2	1.23	2.596	1.30 uL
P18 EPI	852.2	1.237	2.584	1.17 uL
P24 EPI	410.9	1.465	2.843	2.43 uL
P24 EPI	350.7	1.779	3.123	2.85 uL
P24 EPI	380.4	2.108	2.962	2.63 uL
P18 MM	1190.3	1.511	1.661	0.84 uL
P18 MM	789.1	2.398	2.54	1.27 uL
P18 MM	243.2	1.031	4.986	4.11 uL
P17 EPI	266.1	0.804	4.52	3.76 uL
P18 EPI	375.3	1.724	3.21	2.66 uL
P19 MM	192.1	6.643	3.803	5.20 uL
P24 MM	242.6	1.114	3.78	4.12 uL
P24 MM	265	1.293	3.476	3.77 uL
P24 MM	180.3	1.561	5.588	5.55 uL

**Tabla 4.- Posible contaminación en las muestras de RNA.** En la segunda evaluación de pureza de RNA, se obtuvieron valores muy por encima (5.588) y muy por debajo (0.938) de los valores aceptados para ambos rangos. Esto demostraba que nuestras muestras podían tener contaminación de alguna molécula que absorbe luz a los mismos rangos y, que, al mismo tiempo, podrían estar degradadas.

### 14.-Segunda evaluación de integridad

Para la segunda evaluación de integridad se observó una disminución de 39 pixeles en promedio en la intensidad de ambas bandas (medido con ImageJ por medio del método descrito en la página 39, sección 7.7) (Tabla 4), por lo que, se determinó que el problema técnico afectó de manera negativa a todas las muestras de RNA. Pero, las muestras seguían estando parcialmente íntegras y sin rastros de contaminación, por lo que se decidió usarlas para la síntesis de cDNA.





**Figura 23. Pérdida de integridad del RNA de las muestras.** Se observa que las muestras han perdido intensidad generalmente. Las muestras para P24 EPI y P18 EPI están parcialmente degradadas. La muestra P19 MM está degradada.

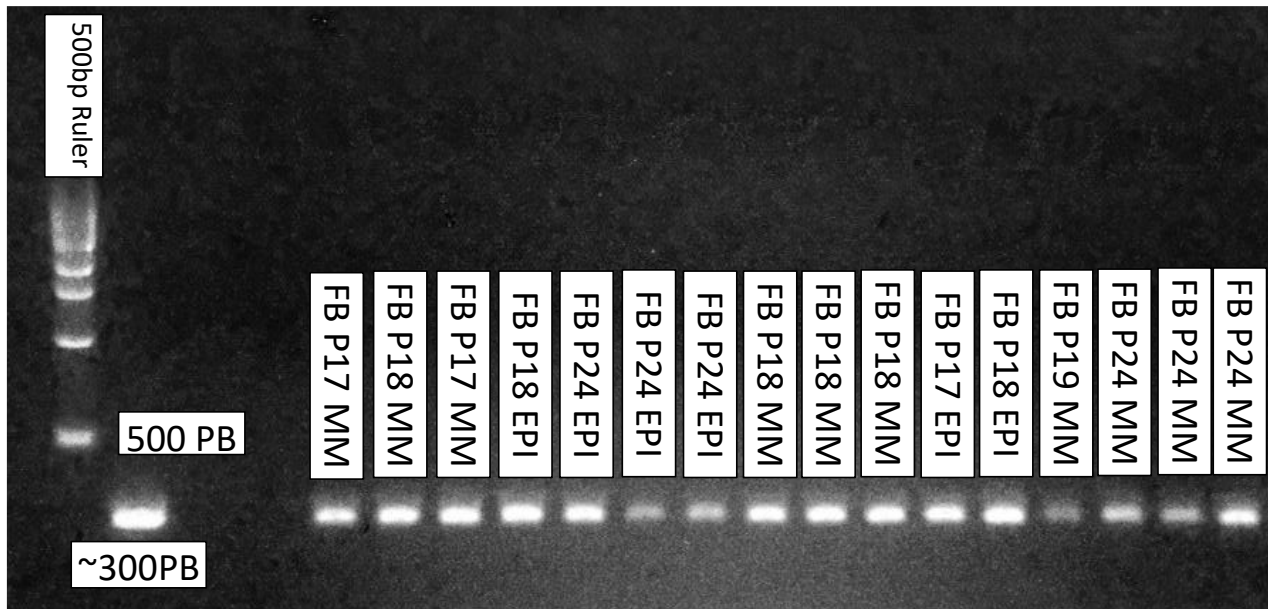
<b>Muestra</b>	<b>28s</b>	<b>18s</b>
P17 MM	138.969	136.756
P18 MM	131.462	163.857
P17 MM	134.862	136.722
P18 EPI	164.618	132.493
P24 EPI	141.095	159.949
P24 EPI	122.498	196.886
P24 EPI	110.597	178.986
P18 MM	149.67	211.186
P18 MM	160.479	156.292
P18 MM	139.173	185.712
P17 EPI	145.514	172.25
P18 EPI	111.787	191.472
P19 MM	68.974	104.173
P24 MM	132.037	164.502
P24 MM	150.088	169.237
P24 MM	122.314	157.606

**Tabla 5. Medición de intensidad entre las subunidades 28s y 18s para los pases 17-24.**

Después del problema técnico con el ultracongelador, se puede notar una considerable reducción en la intensidad entre ambas subunidades para todas las muestras (medido con ImageJ por medio del método descrito en la página 39, sección 7.7).

## **15.- Evaluación de los cDNA por medio de expresión de GAPDH**

Para comprobar que nuestros cDNA pudieran amplificar los genes de interés (OCT4 y SOX2), se llevó a cabo una prueba haciendo una PCR para amplificar un gen constitutivo: GAPDH. Para esto, se utilizó un programa previamente estandarizado en donde se utilizaron las siguientes temperaturas: 1 ciclo de 94°C durante 5 min. 40 ciclos con 3 temperaturas: 94°C por 30 s, 62°C durante 30 s y 72°C por 30s. Con un ciclo final de dos temperaturas: 72°C durante 10 min y 4°C por 5 min. Se observó amplificación de GAPDH para todas las muestras, por lo que, se procedió a hacer PCR con los genes de interés utilizando el cDNA de las muestras (Figura 25. Página 61).



**Figura 24. Expresión óptima de GAPDH e todas las muestras.**

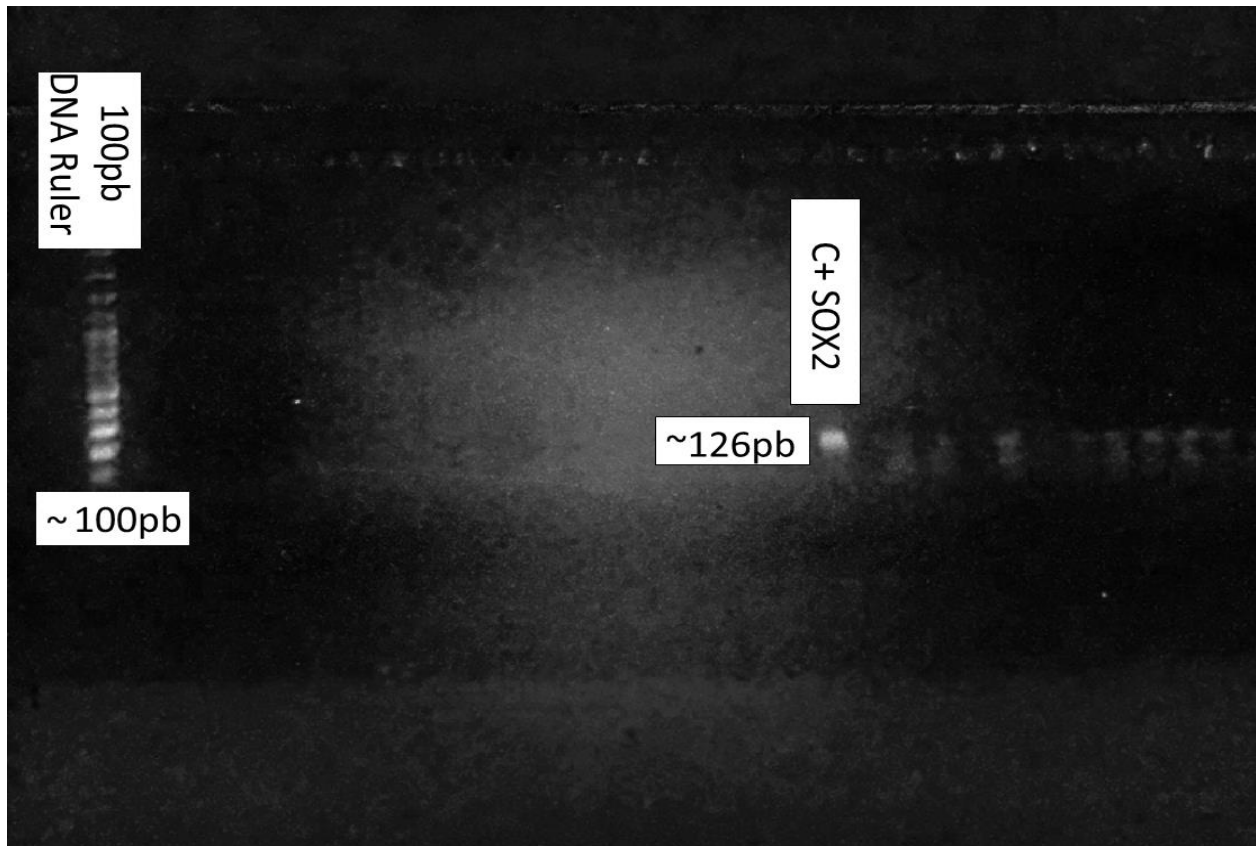
Se observa una expresión homogénea para GAPDH en todas las muestras utilizadas para la síntesis de cDNA. Indicando que las muestras son candidatas adecuadas para la síntesis de los genes de interés.

## 16.- Evaluación de los cDNA para SOX2 y OCT4

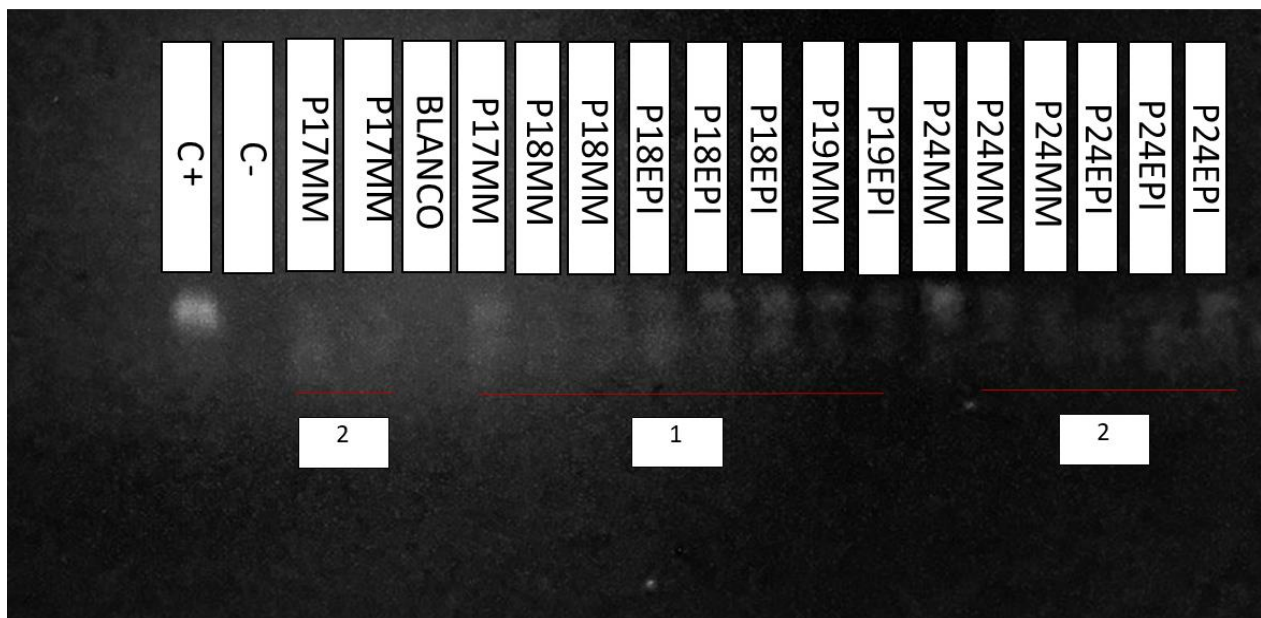
Para la evaluación de ambos genes de interés, se utilizaron oligonucleótidos previamente estandarizados en el laboratorio 11, perteneciente a la facultad de medicina de la UAEM. Está registrado que para SOX2 se vería un producto de 126 pb y para OCT4 uno de 100 pb.

### 16.1.-SOX2

Para evaluar SOX2, se utilizó un termociclador programado de la siguiente manera: 1 ciclo de una temperatura: 94°C por 30s, 40 ciclos de 3 temperaturas: 94°C por 30s, 60°C por 30 s y 72°C por 30 s. Finalmente, un ciclo de 2 temperaturas: 72°C durante 10 min y 4°C durante 5 min. Para la muestra se puede observar que solo hubo una amplificación para el Pase 24 con medio mesenquimal, mientras que en el resto de los pases se observan amplicones con menor peso molecular a nuestro control positivo. Este resultado puede deberse a que, en pases tardíos, el medio epidermal podría no tener efecto en las poblaciones de fibroblastos neonatos (Figuras 25 y 26).



**Figura 25.- Ubicación del marcador de peso molecular.** Se observa un despliegamiento incorrecto del marcador de peso molecular, el control positivo de SOX2 se ubica alrededor de 126 pb.



**Figura 26.- Evaluación de la expresión de SOX2 por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.7%SOX2** Se observó expresión para SOX2 solo en la muestra del P24 con medio mesenquimal. Para el resto de las muestras, se observaron dos resultados: 1) muestras con dos amplicones que no son consideradas válidas y 2) muestras con un solo amplicon pero por debajo del control positivo, por lo que, ninguna en ambos casos puede ser considerada como válida.

## **16.2.-OCT4**

Para OCT4 se utilizó un programa previamente estandarizado en el termociclador que consta de: 1 ciclo de 1 temperatura: 94°C por 30s, 40 ciclos de 3 temperaturas: 94°C por 30 s, 62°C por 30s y 72°C por 30s, finalmente un ciclo de dos temperaturas: 72°C por 10 min y otro de 4°C por 5 min. La amplificación de OCT4 no se mostró en ninguna de las muestras o en los controles positivos. Se hicieron varias pruebas en las que se cambiaron la concentración de los cDNA (haciendo una curva de 1.5 µL, 2.5 µL y 3.5 µL), y el porcentaje del gel de agarosa (de 2% a 2.5% y 1.7%). La dilución de los oligos para OCT4 se realizó de nuevo y se probaron distintas líneas como controles positivos que resultaron sin expresión. Posiblemente, la razón por la que no obtuvimos amplificación para OCT4 se haya debido a que los oligos no se habían diseñado correctamente (Figura 27).

## **17.-Discusión**

### **17.1.- Propagación de la línea celular de fibroblastos PCS-201-010.**

Para la propagación del cultivo de fibroblastos sembrados con medio mesenquimal, se observaron números similares a los obtenidos por Mendiola-Sotelo en 2019 para la parte de los pases tempranos. Normalmente, para la línea de fibroblastos neonatales PCS-201-010, se reporta senescencia alrededor del pase 16 de cultivo (Mancini et al., 2012). Hariton, Xue, Rabbani, Fowler y Thornalley en 2018, describen que los fibroblastos con poca concentración de glucosa en el medio de cultivo presentan un letargo en la expresión de procesos asociados a senescencia, esto, mediante la activación del factor nrf2 que es inducido por factores de estrés como ROS y que retrasa la senescencia replicativa de los fibroblastos in vitro por un máximo de 2 pases. Al haber algunos días en los que los subcultivos de fibroblastos no se hacían a las 96.00 horas, esto, posiblemente

provocaría una respuesta de letargo de senescencia, que se relacionaría con los datos obtenidos (Figuras 14-17).

La reducción de horas/división celular, el aumento en el número de divisiones celulares y el aumento del rendimiento celular en los fibroblastos cultivados con el medio epidermal podrían explicarse con lo publicado por Mendiola-Sotelo en 2021, donde ella demuestra que la ausencia de dos factores crecimiento [Factor de crecimiento epidermal (EGF) e Insulina] modulan los parámetros de rendimiento y división celular. Estas dos vías de señalización (insulina y EGF) están relacionadas con la modulación de crecimiento, proliferación y metabolismo celular (De Meyts, 2016). La vía de señalización de la insulina tiene 5 efectos principales: Promover el transporte de glucosa dentro de la célula, la síntesis de glucosa, la síntesis de proteínas, gluconeogénesis y la inducción del crecimiento y proliferación celular. Este último es causado por un grupo de efectores río abajo de la vía de señalización, los cuales son: AKT, ERK, Ras, mTOR, que son compartidos por la vía de señalización de EGF. Estos efectores tienen un blanco en común, inhibir al factor promotor de gluconeogénesis, FOXO1, el cual, en su forma no fosforilada inhibe la expresión de factores de crecimiento y proliferación celular, favoreciendo así, procesos metabólicos y actuando como un antagonista del ciclo celular. FOXO1 está relacionado con p21, uno de los factores que modulan la expresión de p53 (De Meyts, 2016). Sin embargo, al activarse la vía de señalización de la insulina y EGF, los factores mencionados anteriormente (ERK, AKT, Ras, mTOR) inducen la fosforilación de FOXO1, inhibiendo así su actividad. El proceso de fosforilación de FOXO1 estaría favoreciendo la división y crecimiento celular (De Meyts, 2016).

Esto concordaría con los resultados obtenidos por Mendiola-Sotelo en 2021. En donde al probar variaciones del medio epidermal, uno sin insulina y otro sin EGF, se observó una reducción en todos los parámetros evaluados (rendimiento celular, viabilidad, número de divisiones) y un aumento en las horas por división. Entonces, la ausencia de ambos factores (Insulina y EGF) en el medio epidermal evitaría la inhibición de FOXO1 culminando en el nulo efecto del medio epidermal. Sin embargo, el trabajo de Mendiola-Sotelo se centró específicamente en fibroblastos de pases tempranos, por lo cual, se sugiere que en pases tardíos el medio epidermal podría no tener efecto, ya que, al agregar un medio con mayor concentración de insulina, aumentaría la concentración intracelular de glucosa en los fibroblastos de pases tardíos, que podrían tener expresados factores de senescencia (p16, p53). Entonces, al estar activa la vía de señalización de insulina, los efectores principales (ERK, AKT, mTOR, Ras) inhibirán factores relacionados a la

inducción de senescencia (FOXO1, p21). Una alta concentración de insulina induce el transporte de glucosa extracelular hacia el interior de la célula. El aumento de la concentración de glucosa en la célula induce un proceso de glucólisis para eliminar el excedente de glucosa. Por lo tanto, el crecimiento celular se vería favorecido de una manera transitoria, siendo limitado por la inducción de glucólisis. Entonces, durante el proceso de la glucólisis, la vía de señalización de insulina estaría inhibida, volviendo así, a favorecer la expresión de factores senescentes por medio de la re-expresión de FOXO1, teniendo así un bucle de retroalimentación negativa en donde los efectos de crecimiento celular ocasionados por la insulina tendrían cada vez efectos menos evidentes en la población de fibroblastos.

### **17.2.- Marcadores de pluripotencia (SOX2 y OCT4).**

SOX2 es conocido como un factor promotor del desarrollo embrionario el cual, dirige principalmente la diferenciación células provenientes de la capa germinativa del ectodermo y se ha sugerido que también dirige procesos de diferenciación en células provenientes del mesodermo, entonces se podría sugerir que SOX2 se encuentra presente en células fibroblásticas multipotentes desde pases tempranos (Novak et al., 2020). Mendiola-Sotelo en 2019 observó que los fibroblastos durante los primeros pases mantenían una clara expresión de SOX2, dicha expresión se atenuaba después del pase 4. Interesantemente, utilizando el medio epidermal, se observó una ligera re-expresión de SOX2 en el pase 8. Los resultados obtenidos para SOX2 en el presente trabajo de investigación (Figura 25), podrían relacionarse con la existencia de poblaciones heterogéneas dentro de una misma muestra de fibroblastos (LeBleu y Neilson, 2020). Probablemente, este efecto podría verse aumentado, debido a que nuestra línea celular (PCS-201-01) es neonatal, es decir, con fibroblastos multipotentes que aún pueden diferenciarse a distintos tipos celulares. Además, podemos destacar que las poblaciones de fibroblastos adultos que pertenecen a un mismo tipo de tejido tienen distintas respuestas a los factores de estrés ambiental, por ejemplo, mientras unos miembros de la población de fibroblastos pueden seguir creciendo como respuesta a estrés, otros pueden entrar en un estado conocido como quiescencia (LeBleu y Neilson, 2020), que se podría definir como un estado de latencia. Así, mientras los fibroblastos quiescentes pueden resumir su crecimiento celular en pases tardíos, los fibroblastos que habían crecido sin un proceso de quiescencia podrían dirigirse hacia procesos senescentes o apoptóticos. Lo cual explicaría la alta expresión de un factor como SOX2 en un pase tardío cultivado con medio mesenquimal. Para OCT4, se ha reportado (Zeineddine et al., 2014) que este factor pierde expresión de manera

constante a partir de la formación de la masa celular interna, en donde solo readquiere expresión de manera transitoria para generar las células del hipoblasto, por lo que, es normal no ver su expresión en los pases tempranos de una línea celular multipotente. En el presente trabajo no observamos expresión de OCT4 en pases tardíos, ni bajo condiciones de cultivo con el medio epidermal, esto podría tener relación con las características de multipotencia de los fibroblastos, es decir, una posible explicación de la nula expresión de OCT4, podría deberse a que los fibroblastos de pases tempranos podrían haberse diferenciado en otros fenotipos celulares, mientras que en los pases tardíos nuestro medio de cultivo epidermal ya no tendría efecto, lo cual concuerda con las características multipotentes de nuestra línea celular.

## **18.-Conclusiones**

En la actualidad, el interés por desarrollar métodos de reprogramación celular que no involucren inserciones genéticas o sobre expresión de factores asociados a oncogénesis ha ganado mucha atención. Así mismo, los métodos más populares han sido los episomales, ya que, proveen una expresión transitoria de los factores reprogramadores teniendo mejores resultados que los métodos integrativos. Esto, para establecer estudios preclínicos y terapias celulares para enfermedades crónico-degenerativas, y, además, proveer mejores métodos de trasplantes de tejido que no involucren respuestas inmunes.

En el presente trabajo se evaluó el alcance de un posible método reprogramación, un medio epidermal con un cultivo de fibroblastos (ATCC PCS-201-010). En el que, para los primeros cultivos (pases tempranos) se observó un letargo del proceso de senescencia replicativa reportado para nuestra línea celular (alrededor del pase 16), evidenciando por el hecho de que nuestros fibroblastos en el pase 17 presentaban aún, un número de divisiones mayor al del pase 16. Para los fibroblastos cultivados con medio epidermal, se observó un aumento en el rendimiento celular, en el número de divisiones y una reducción en las horas que les tomaba a los fibroblastos dividirse, esto, en pases tardíos (P17-P24). Sin embargo, con los resultados obtenidos por medio de PCR, se puede concluir con que el medio epidermal no reprograma los fibroblastos de pases tardíos a un fenotipo pluripotencia, ya que, no se observó expresión de SOX2 para los cultivos de fibroblastos en medio epidermal y solo una leve re-expresión de este factor en fibroblastos del pase 24 cultivados con medio mesenquimal. Tampoco observamos expresión de OCT4 para ninguno de los cultivos de fibroblastos. Entonces, debe hacerse más investigación acerca de los efectores



principales del medio epidermal y analizar su función en fibroblastos de pases tardíos. Cabe destacar, que no se pudo cumplir con el objetivo de evaluar los marcadores de senescencia (p53 y p16).

## **19.-Perspectivas**

- Evaluar marcadores de:
  - fibroblastos (decorina) en pases tempranos y tardíos.
  - proliferación (ki67) en pases tempranos y tardíos.
  - senescencia (p53, p16 y SA- $\beta$ -galactosidasa).
  - pluripotencia (NANOG, Klf4, c-Myc y CD133).
  - distintos linajes celulares.
  - la vía de señalización de insulina (ERK, PI3K, Ras y mTOR, FOXO1, EGF) y de glucólisis (piruvato).
- Hacer una curva de estandarización para los oligonucleótidos de OCT4.
- Probar el efecto del medio epidermal durante más pases.
- Realizar xenotrasplantes.
- Evaluar los complejos proteicos de las mitocondrias mediante experimentos de western blot.

## 20.- Literatura citada

- Aird, K. M., & Zhang, R. (2013). Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). *Methods in Molecular Biology*, 965(4), 185–196. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_12)
- Applied Biological Materials Inc. (ABM) (02 de marzo del 2020). *Your Basic Guide to Cell Line Immortalization*. <https://info.abmgood.com/cell-immortalization>.
- Applied Biological Materials Inc. (ABM) (19 de junio del 2020). *A Guide to Lentivirus Production (Protocol, Tips, & More!)*. <https://info.abmgood.com/lentivirus-system-production-protocol>.
- Applied Biological Materials Inc. (ABM) (25 de noviembre del 2016). *The Lentivirus System-Introduction*. <https://info.abmgood.com/lentivirus-system-introduction>.
- Arteaga-Martínez, S. M., García-Peláez, M. I. (2013). Procesos Básicos del Desarrollo en Embriología Humana y Biología del Desarrollo (1era Ed. pp. 58-60). Editorial Panamericana.
- Babakhani, S., & Oloomi, M. (2018). Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 58(11), 905–917. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800204>
- Borghain, M. P., Haridhasapavalan, K. K., Dey, C., Adhikari, P., & Thummer, R. P. (2019). An Insight into DNA-free Reprogramming Approaches to Generate Integration-free Induced Pluripotent Stem Cells for Prospective Biomedical Applications. *Stem Cell Reviews and Reports*, 15(2), 286–313. <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9861-6>
- Briggs, R. & King, T. J. (1954). Transplantation of Living Nuclei of Late Gastrulae into Enucleated Eggs of *Rana pipiens*. *Development*, 2(1), 73–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.38.5.455>

- Brouwer, M., Zhou, H., & Nadif Kasri, N. (2016). Choices for Induction of Pluripotency: Recent Developments in Human Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming Strategies. *Stem Cell Reviews and Reports*, 12(1), 54–72. <https://doi.org/10.1007/s12015-015-9622-8>
- Calos, M. (2006). The  $\phi$  C31 Integrase System for Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, 6(6), 633–645. <https://doi.org/10.2174/156652306779010642>
- Campbell, K. H. S., McWhir, J., Ritchie, W. A., & Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. In *Nature* (Vol. 380, Issue 6569, pp. 64–66). <https://doi.org/10.1038/380064a0>
- Campo-Trapero, J., Cano-Sánchez, J., López-Durán, M., Palacios-Sánchez, B., Sánchez-Gutierrez, J. J., & Bascones-Martínez, A. (2008). Marcadores de senescencia celular en cáncer y precáncer oral. *Avances En Odontoestomatología*, 24(1), 69–80. <https://doi.org/10.4321/s0213-12852008000100007>
- Chalberg, T. W., Portlock, J. L., Olivares, E. C., Thyagarajan, B., Kirby, P. J., Hillman, R. T., Hoelters, J., & Calos, M. P. (2006). Integration specificity of phage  $\phi$ C31 integrase in the human genome. *Journal of Molecular Biology*, 357(1), 28–48. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.098>
- Chang, E. A., Jin, S. W., Nam, M. H., & Kim, S. D. (2019). Human induced pluripotent stem cells: Clinical significance and applications in neurologic diseases. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 62(5), 493–501. <https://doi.org/10.3340/jkns.2018.0222>
- Christophersen, N. S., & Helin, K. (2010). Epigenetic control of embryonic stem cell fate. *Journal of Experimental Medicine*, 207(11), 2287–2295. <https://doi.org/10.1084/jem.20101438>
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression 8(9), 99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>

- Daniel Novak, Laura Hüser, Jonathan J. Elton, Viktor Umansky, Peter Altevogt, Jochen Utikal, De Meyts P. The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. [Updated 2016 Apr 27]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK378978/>
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, 126(4), 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>
- Esquivel-Estudillo, J. (2017). Generación de Precursores Pancreáticos A Partir de Queratinocitos Humanos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos, México.
- Fabre, A. L., Colotte, M., Luis, A., Tuffet, S., & Bonnet, J. (2014). An efficient method for long-term room temperature storage of RNA. *European journal of human genetics: EJHG*, 22(3), 379–385. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.145>
- Guilak, F., Cohen, D. M., Estes, B. T., Gimble, J. M., Liedtke, W., & Chen, C. S. (2009). Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix. *Cell Stem Cell*, 5(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.06.016>
- Hariton, F., Xue, M., Rabbani, N., Fowler, M., & Thornalley, P. J. (2018). Sulforaphane Delays Fibroblast Senescence by Curbing Cellular Glucose Uptake, Increased Glycolysis, and Oxidative Damage. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 5642148. <https://doi.org/10.1155/2018/5642148>
- Junan Li,ming Jye Poi, and M.-D. T. (2011). The Regulatory Mechanisms of Tumor Supressor p16INK4 and Relevance to cancer. *Biochemistry*, 50(25), 5566–5582. <https://doi.org/10.1021/bi200642e>.

- Kaufman, M. H., & Evans, M. J. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(9), 154–156.
- Kesselring, L., Miskey, C., Zuliani, C., Querques, I., Kapitonov, V., Laukó, A., Fehér, A., Palazzo, A., Diem, T., Lustig, J., Sebe, A., Wang, Y., Dinnyés, A., Izsvák, Z., Barabas, O., & Ivics, Z. (2020). A single amino acid switch converts the Sleeping Beauty transposase into an efficient unidirectional excisionase with utility in stem cell reprogramming. *Nucleic Acids Research*, 48(1), 316–331. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1119>
- Krampera M, Franchini M, Pizzolo G, Aprili G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transfus.* 2007 Jul;5(3):120-9. doi: 10.2450/2007.0029-07.
- Kumar, D., Anand, T., Talluri, T. R., & Kues, W. A. (2020). Potential of transposon-mediated cellular reprogramming towards cell-based therapies. *World Journal of Stem Cells*, 12(7), 527–544. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i7.527>
- Lapasset, L., Milhavet, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Ät-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J. M., De Vos, J., Lehmann, S., & Lemaitre, J. M. (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes and Development*, 25(21), 2248–2253. <https://doi.org/10.1101/gad.173922.111>
- LeBleu, V. S., & Neilson, E. G. (2020). Origin and functional heterogeneity of fibroblasts. *The FASEB Journal*. doi:10.1096/fj.201903188r
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging cell*, 5(2), 187–195. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>

- Lujambio, A. (2016). To clear, or not to clear (senescent cells)? That is the question. *Inside the Cell*, 1(2), 87–95. <https://doi.org/10.1002/icl3.1046>
- Malik, N., & Rao, M. S. (2013). A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods in Molecular Biology*, 997(5), 23–33. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-348-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-348-0_3)
- Mancini, M., Saintigny, G., Mahé, C., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Melino, G., & Candi, E. (2012). MicroRNA-152 and -181a participate in human dermal fibroblasts senescence acting on cell adhesion and remodeling of the extra-cellular matrix. *Aging*, 4(11), 843–853. doi:10.18632/aging.100508
- Matlock, B. (2015) *Assessment of Nucleic Acid Purity*. Thermo Fisher Scientific. Willmington, MA, Estados Unidos.
- Meissner, A. (2010). Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nature Biotechnology*, 28(10), 1079–1088. <https://doi.org/10.1038/nbt.1684>
- Mendiola-Sotelo, S. T., (2019). *Inducción de la Desdiferenciación de Fibroblastos Humanos*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos, México.
- Mendiola-Sotelo, S. T., (2021) *Generación de pluripotencialidad en fibroblastos humanos, mediante el uso de un medio de propagación celular*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Mijit, M., Caracciolo, V., Melillo, A., Amicarelli, F., & Giordano, A. (2020). Role of p53 in the regulation of cellular senescence. *Biomolecules*, 10(3), 1–16. <https://doi.org/10.3390/biom10030420>
- Mondello, C., & Chiodi, I. (2013). Cellular immortalization and neoplastic transformation: Simultaneous, sequential or independent? Telomeres, telomerase or karyotypic variations? *Cell Cycle*, 12(11), 1804–1805. <https://doi.org/10.4161/cc.24940>

- Morita, S., Kojima, T., Kitamura, T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Therapy*, 7(12), 1063–1066. doi: 10.1038/sj.gt.3301206.
- Nagai, Y. (2013). *Sendai virus vector: Advantages and applications*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-54556-9>
- Nakanishi, M. & Makoto, O. (2012). Development of Sendai Virus Vectors and their Potential Applications in Gene Therapy and Regenerative Medicine. *Gene Ther.* 2012 Oct;12(5):410-6. doi: 10.2174/156652312802762518.
- Nishimura, K., Sano, M., Ohtaka, M., Furuta, B., Umemura, Y., Nakajima, Y., Ikehara, Y., Kobayashi, T., Segawa, H., Takayasu, S., Sato, H., Motomura, K., Uchida, E., Kanayasu-Toyoda, T., Asashima, M., Nakauchi, H., Yamaguchi, T., & Nakanishia, M. (2011). Development of defective and persistent Sendai virus vector: A unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4760–4771. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.183780>
- Ravikanth M, Soujanya P, Manjunath K, Saraswathi TR, Ramachandran CR. Heterogeneity of fibroblasts. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2011 May;15(2):247-50. doi: 10.4103/0973-029X.84516.
- Schlake, T., Thess, A., Fotin-Mleczek, M., & Kallen, K. J. (2012). Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biology*, 9(11), 1319–1330. <https://doi.org/10.4161/rna.22269>
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2005). Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*, 26(5), 867–874. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh296>
- Singh, V. K., Kalsan, M., Kumar, N., Saini, A., & Chandra, R. (2015). Induced pluripotent stem cells: Applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(FEB), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00002>

- Smith, L. R., Cho, S., & Discher, D. E. (2018). Stem cell differentiation is regulated by extracellular matrix mechanics. *Physiology*, 33(1), 16–25. <https://doi.org/10.1152/physiol.00026.2017>
- Sommer, C. A., Sommer, A. G., Longmire, T. A., Christodoulou, C., Thomas, D. D., Gostissa, M., Alt, F. W., Murphy, G. J., Kotton, D. N., & Mostoslavsky, G. (2010). Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells*, 28(1), 64–74. <https://doi.org/10.1002/stem.255>
- Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., & Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current Biology*, 11(19), 1553–1558. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00459-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00459-6)
- Tai, L., Teoh, H. K., & Cheong, S. K. (2018). Reprogramming human dermal fibroblast into induced pluripotent stem cells using non-integrative sendai virus for transduction. *Malaysian Journal of Pathology*, 40(3), 325–329. doi: 30580364.
- Takahashi, K. (2010). Direct reprogramming 101. *Development Growth and Differentiation*, 52(3), 319–333. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2010.01169.x>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Thermo Scientific (2015) Nanodrop spectrometers. T042 Technical Bulletin. Estados Unidos.



Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7. doi: 10.1126/science.282.5391.1145.

Tirabassi, R. (2014) How to quality control check your RNA samples. BiteSizeBio.

Wang, Y., Chen, S., Yan, Z., & Pei, M. (2019). A prospect of cell immortalization combined with matrix microenvironmental optimization strategy for tissue engineering and regeneration 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology. *Cell and Bioscience*, 9(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0264-9>

Warren, L., & Lin, C. (2019). mRNA-Based Genetic Reprogramming. *Molecular Therapy*, 27(4), 729–734. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.12.009>

Zeineddine, D., Hammoud, A. A., Mortada, M., & Boeuf, H. (2014). The Oct4/OCT4 protein: more than a magic stemness marker. *American journal of stem cells*, 3(2), 74–82. doi: 25232507.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD  
DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Licenciatura en Biología  
Programa Educativo de  
Calidad *Acreditado* por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Morelos a 07 de septiembre de 2023

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **C. LUIS CARLOS RÍOS TAPIA**, con el título del trabajo: **Reprogramación Celular en Fibroblastos Próximos a la Senescencia**.

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**A T E N T A M E N T E**  
*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: DRA. MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: BIOL. HUGO SUÁREZ CONTRERAS

\_\_\_\_\_

VOCAL: DR. JUAN JOSÉ ACEVEDO FERNÁNDEZ

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DRA. ANABEL ORTÍZ CALTEMPA

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DRA. MARÍA DEL CARMEN BELTRÁN NUÑEZ

\_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**ANABEL ORTIZ CALTEMPA | Fecha:2023-09-07 19:41:21 | Firmante**

gG2lBQzm5UANEWYoxzanoLQu25njWQ7hHWmyoAy3ukx3xbTOn1GOYeJbvGfyQ8Ait5WTiLeCwQJEUFRZ4wqIVOIZHM476K5GDd/GHEXSO+8Kdy6DHIEz4uYt4PsBSeW1N yVqk+TWJDWn6cluWg7BU+FkmALXeRdPFO0HwcmAeEMuRqoQEWnN5F7XNfBdPePFx4n75KDPKuqoFGWmDvELI1rXEZ6+WjJx02xY8fBbMGxiKmuVLTMI2BOyTXs8ggpVp NjJFS8lks/hvPyzKY231GPzitOmyIkOvfeOEvgKhrfgA+cEJdVLQPwC5c0z7wES7WHapze+ipu4A9e+ZlwA==

**JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2023-09-07 21:42:03 | Firmante**

QIDQnCay5mC3/caV2BBBeBT/Ww6vLWgZM/dEyliMYH6KNEfzDDr+D3xdYbHpBISLcshHeU/ALpoz32KTsmTCur7iePPK0G49Q08jeBX4q0wEQrrlepmcjYSB8Z7BL5o9QR7A1oY KIoRCxOfiNP6gtJOOETjqk/SxJpfM/3nB0s6FS++xTpS0EPzDvroqKGbJOLuZIT5bMqSeB7epuK0NrvhsbddegBID9XKujORTaScBgD87SjicoarETPEeca36NjK0tHTxx+LAI4NSuR65oufGAYTUFdl83FucUz1mwnkxquCp730zI7EUMStGdlkIQjo9uIlHw5mVxq+JqEa/UA==

**MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE | Fecha:2023-09-08 11:07:46 | Firmante**

MahfvGIL7Mrd5XDmy/JiLRqsbBpJDpryjRaA3WF0fsTVIVUeYe/CdBZS/Z9hKu9sHibW/la04efDKJ6AX2FAyb1X+YmlfO5vvDgGrIYwNUmWSYwSiOqsQJME02jS5XLa96X3B2gD uMlk7hMGGCZcprzTHTtRdKvukd7tPILj6nOTtwGU/hlB3OWuNuqxQel3Yxke8CAsZZ3kXWKOepi++7lJk0ZyQ6/esn5dsmk1uzOoElm3BQrgtqcQYmuAsq/2dDLBqu2kZy47TrkKkwIHRmhDK8/5+z456sUr90HA+AGfpXqn4qUsZ128VrO9GxymN/wGDpyp9kBJEKdarhtag==

**MA DEL CARMEN BELTRAN NUÑEZ | Fecha:2023-09-08 11:45:09 | Firmante**

LVq2fJ4efHAeEG3+BCuj6/GDA TbzBZOrc2HSgkHOG/dlfWwcO1HWQ9MiBTKzx/GTGEgaCIRPW0L98IZPLpRufzFZcDs1z6zc+RjV90sdyfMJKw4fZ9q71wHkoEFMat2rXOX5c MQnL0JMeXQdjUa/3n0l2wk1w5WfgleI+bH+yIRWF5QiBCNsh4awJLcJZygCsyF21nkjUwz5sarMimml3K6iGZp54Z6zaUPAZyRwckxSY+jx3QH38mjmfCkBy0rVXC1ZuRH0VSYwv 56C6W6oXdc4tjAFJoQcLHmAcrrHQQBpyyaDelTEP1dL5OKnCb8oCOgZaaMfbbXiQ4hbdXwA==

**HUGO SUAREZ CONTRERAS | Fecha:2023-09-08 16:28:33 | Firmante**

aAPbqshE1Zn6XRTOMhKrKSkEKmImiTxWeDOujfN57ZvtixsYHCWHp3ZPFmL0XtqKcNH6rV1PJGpCePWRg5L4ENKLyRiP58JZHfd8x169VNVYT28235RcN4K+1/HbTMjPFmg E/CoRDBwXbCojm5Mr2zUgEi0rW9zCCc47CjVTCs/jRBXOzEw1+jfGcJ7Za6fQr4lrA1CWxzWEnFYf8wrWL4nVqUhdgN7/EYMD0seyp1VkJVUcz65+1T+jNkuA9AyQ6InBn9n644 BAAhWM47G5K3x4SrJplHtAj+vkUT5NXOxKy5Ulwpk8v4w13Dm7omeIRvibMNQc4pD55/Ca6w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



hcQpi3luk

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Q0NvQit75YkN6Y9HudTaPf213wMiMMmsB>

