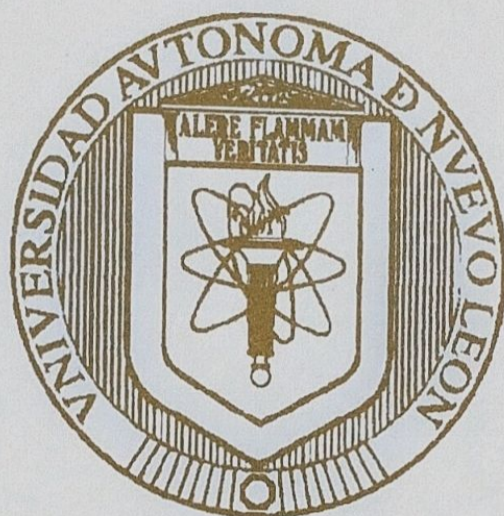


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA, PROTEOMA Y METABOLOMA
DEL EFECTO COMBINADO DE LA METFORMINA Y EL FENOTIPO
SECRETOR ASOCIADO A SENESCENCIA SOBRE CÉLULAS
TUMORALES**

Por

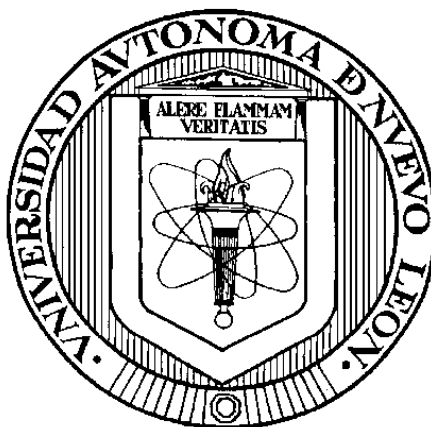
BRYAN ALEJANDRO ESPINOSA RODRÍGUEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS
Con Orientación en Farmacia**

Enero, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA, PROTEOMA Y METABOLOMA DEL
EFECTO COMBINADO DE LA METFORMINA Y EL FENOTIPO SECRETOR
ASOCIADO A SENESCENCIA SOBRE CÉLULAS TUMORALES

Por

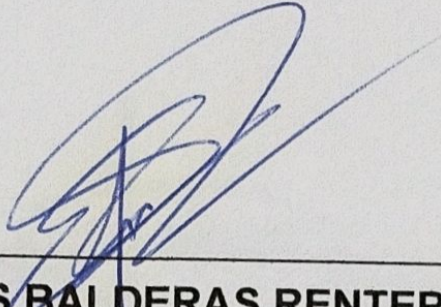
BRYAN ALEJANDRO ESPINOSA RODRÍGUEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia

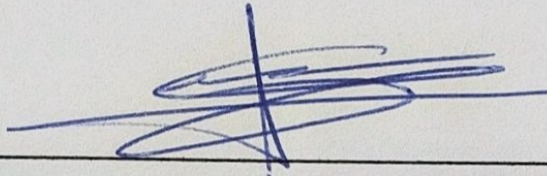
Enero, 2024

“ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA, PROTEOMA Y METABOLOMA DEL EFECTO COMBINADO DE LA METFORMINA Y EL FENOTIPO SECRETOR ASOCIADO A SENESCENCIA SOBRE CÉLULAS TUMORALES”

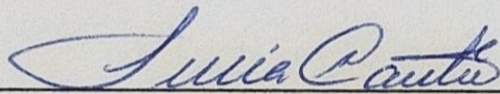
Aprobación de la Tesis:



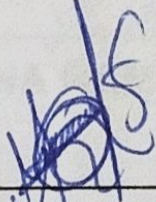
DR. ISAÍAS BALDERAS RENTERÍA
Presidente



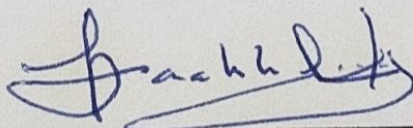
DR. EDER UBALDO ARREDONDO ESPINOZA
Secretario



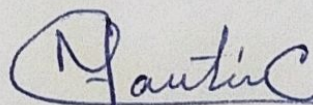
DRA. LUCÍA GUADALUPE CANTÚ CÁRDENAS
Vocal



DRA. MÓNICA AZUCENA RAMÍREZ CABRERA
Vocal



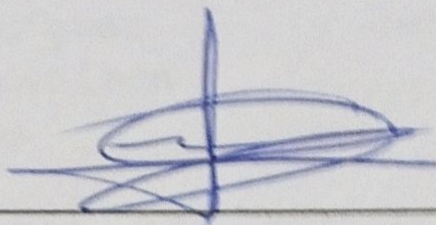
DRA. MARÍA DEL PILAR CARRANZA ROSALES
Vocal



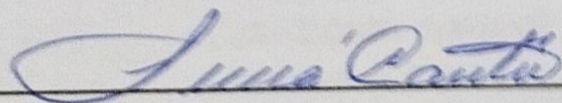
DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS
Sub-Directora de Posgrado

"ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA, PROTEOMA Y METABOLOMA DEL EFECTO COMBINADO DE LA METFORMINA Y EL FENOTIPO SECRETOR ASOCIADO A SENESCENCIA SOBRE CÉLULAS TUMORALES"

Comité Tutorial:



DR. EDER UBALDO ARREDONDO ESPINOZA



DRA. LUCÍA GUADALUPE CANTÚ CÁRDENAS



DRA. MÓNICA AZUCENA RAMÍREZ CABRERA

RESUMEN

Bryan Alejandro Espinosa Rodríguez
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Fecha de graduación: enero 2024

Título del estudio: “ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA, PROTEOMA, Y METABOLOMA DEL EFECTO COMBINADO DE LA METFORMINA Y EL FENOTIPO SECRETOR ASOCIADO A SENESCENCIA SOBRE CÉLULAS TUMORALES”.

Número de páginas: 218

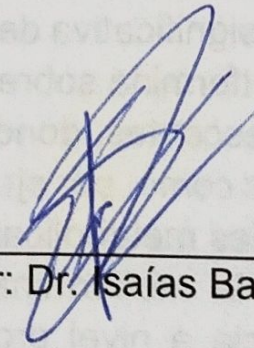
Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Farmacia.

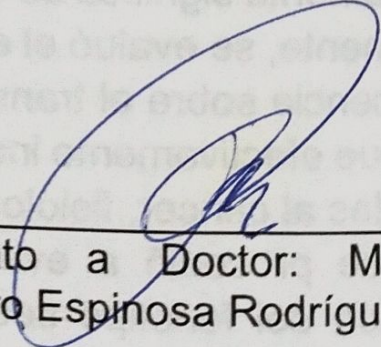
Área de estudio: Estudio de compuestos con actividad farmacológica y biotecnología farmacéutica.

Propósito y método de estudio: El objetivo principal del estudio fue evaluar los efectos biológicos de la metformina sobre las células senescentes y su fenotipo secretor asociado a senescencia. Para llevar a cabo dicha tarea, primero se generó un modelo de células senescentes empleando una línea celular de fibroblastos IMR90, el cual fue validado mediante técnicas celulares (actividad de la β -galactosidasa) y técnicas moleculares (PCR cuantitativa para marcadores de senescencia). Luego de esto se evaluó, de manera preliminar, el efecto de la metformina sobre los marcadores de senescencia, conduciendo a la disminución estadísticamente significativa de CDKN1A y la disminución no significativa de CDKN2A. Posteriormente, se evaluó el efecto del tratamiento con metformina sobre el modelo de senescencia sobre el transcriptoma de las células senescentes, donde se pudo apreciar que efectivamente indujo cambios en distintas vías como, por ejemplo, vías relacionadas al cáncer, fisiología del lisosoma y algunas vías metabólicas. Además de esto, se procedió a evaluar cual era el efecto de la metformina sobre la composición del fenotipo secretor asociado a senescencia a nivel proteómica y metabolómico. No obstante, la evaluación proteómica se llevó a cabo con dificultades técnicas, conduciendo a resultados no confiables. Por otro lado, la evaluación del metaboloma se llevó a cabo empleando la técnica de resonancia magnética nuclear de protón, conduciendo a la identificación y cuantificación de más de 40 metabolitos en las muestras evaluadas. Además, se llevó a cabo la evaluación

transcripcional de la fisiología de las células cancerígenas, MCF-7, luego de exponerse a los secretomas de los fibroblastos senescentes tratados o no con metformina. Y, por último, se llevó a cabo una propuesta del mecanismo de acción de la metformina sobre las células senescentes siguiendo una metodología computacional, y sustentando este mecanismo con los resultados experimentales de la transcriptómica y metabolómica.

Contribuciones y conclusiones: La principal contribución del proyecto es que se demostró que la metformina tiene efectos senomórficos sobre las células senescentes alterando su transcriptoma, y en consecuencia cambiando la composición de su fenotipo secretor asociado a senescencia. Todo esto a concentraciones (100 μ M) que se pueden llegar a alcanzar en plasma empleando dosis clínicas. Estos resultados son relevantes debido a que la evidencia reciente está asociando a la acumulación de células senescentes con la aparición y desarrollo de enfermedades crónicas. Por este motivo, la identificación de moléculas capaces de modular el comportamiento de esta población celular resulta relevante, puesto que representan una nueva alternativa a considerar en la prevención de estas enfermedades, así como en su tratamiento para evitar su progresión. Además, en el presente proyecto logramos demostrar que la modulación de las células senescentes con el tratamiento de metformina es capaz de alterar la composición de su fenotipo secretor asociado a senescencia de manera que, al suplementar a las células cancerígenas con este, se vieron disminuidas distintas vías asociadas a la malignidad como, por ejemplo, la evasión de la apoptosis, la proliferación incrementada, la angiogénesis, la invasión y metástasis. Esto podría sugerir que la administración de metformina, luego del tratamiento de quimioterapia en los pacientes oncológicos podría llegar a disminuir el relapso y el fallo del tratamiento, que, en parte, se debe a la aparición de células senescentes inducidas por terapia.


Asesor: Dr. Isaías Balderas Rentería


Candidato a Doctor: M.C. Bryan Alejandro Espinosa Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Como todos los grandes proyectos, hay muchas personas que han contribuido enormemente a este. Se que me será imposible enlistarlos aquí a todos y expresarles mi más sincero agradecimiento en tan solo una cuartilla. Por tal motivo, les ofrezco una disculpa adelantada.

Quisiera comenzar agradeciendo a mi asesor, el Dr. Isaías Balderas Rentería, el mejor asesor que pude tener en estos 5 años de maestría y doctorado. Muchas gracias por siempre creer en mí, en mis ideas, y apoyarme incondicionalmente, aun cuando muchas veces le di razones para no hacerlo, al no comunicar mis ideas o mis planes de la manera correcta. Sin embargo, espero que mi alta estima por usted siempre haya sido clara.

Quiero continuar agradeciendo a mis amigos que me acompañaron este doctorado, y que hicieron que todo este tiempo fuera un poco menos estresante, haciendo las cosas más interesantes o divertidas. Por nombrar a algunos, puedo mencionar al M.C. José Luis González Llerena, a la M.C. Aissa Michelle Nieto Moreno, al M.C. Diego Jaramillo Rubio, a la Q.F.B Daniela Treviño Almaguer, y al Q.F.B. Carlos Alejandro Jiménez Torres.

Hay otras personas que merecen ser mencionadas por sus grandes aportaciones a este proyecto, principalmente, porque hicieron que este fuera posible a través de apoyo en infraestructura, o tal vez resolviéndome dudas acerca de cómo ejecutar ciertas técnicas, entre otras cosas. Aquí quisiera mencionar a la Dra. María del Pilar Carranza Rosales y a la M.C. María Guadalupe Santiago Mauricio, quienes siempre me apoyaron y estuvieron al pendiente de la mejora de mis experimentos; y al M.C. Javier Hernández quien me apoyó siempre respondiendo mis dudas acerca de las técnicas moleculares. Además, quisiera agregar a los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas, la Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera, y el Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza, quienes siempre contribuyeron a la mejora de este proyecto con sus atinados comentarios, preguntas y recomendaciones.

Por último, quisiera agradecer a mi familia, es decir, a mis padres, a mi hermano, a mis suegros, mi cuñado, a mi linda esposa y a mi bella hija. Ustedes siempre me apoyaron, me soportaron, alegraron mi día, y constantemente le recuerdan a este científico inexperto, que no todo es ciencia, que también hay tiempo y espacio para disfrutar y convivir, y los amo por todo eso.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
RESUMEN.....	i
AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDO	iv
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	xii
NOMENCLATURA	xv
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Ciclo celular	1
1.1.1 Ciclinas dependientes de cinasas	4
1.1.2 Eventos relevantes del ciclo celular	5
1.1.3 Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas	7
1.1.4 Otras proteínas relevantes del ciclo celular	9
1.2 Salida del ciclo celular: diferenciación terminal y quiescencia	11
1.2.1 Diferenciación terminal.....	12
1.2.2 Quiescencia	13
1.3 Senescencia.....	13
1.3.1 Cambios celulares y moleculares durante la senescencia.....	18
1.3.2 Relevancia del estudio de la senescencia.....	20
1.3.3 Relación de la senescencia con el cáncer	22
1.4 Fenotipo secretor asociado a senescencia.....	26
1.4.1 Composición del secretoma.....	28
1.4.2 SASP y Cáncer	30

1.5	Agentes senolíticos y senomórficos	31
1.6	Metformina	32
1.6.1	Metformina y sus efectos sobre células cancerígenas	36
1.7	Ciencias ómicas	38
1.7.1	Transcriptómica	38
1.7.2	Proteómica	40
1.7.3	Metabolómica	42
<hr/>		
	CAPÍTULO 2	44
	ANTECEDENTES	44
2.1	Estudios ómicos de la senescencia	44
2.2	Metformina y su papel en la senescencia	48
<hr/>		
	CAPÍTULO 3	50
	JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	50
3.1	Justificación	50
3.2	Hipótesis	51
3.3	Objetivos	52
3.3.1	Objetivo general	52
3.3.2	Objetivos específicos	52
<hr/>		
	CAPÍTULO 4	54
	MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	54
4.1	Materiales	54
4.2	Reactivos	56
4.3	Equipos	58
4.4	Metodología experimental	60
4.4.1	Inducir senescencia celular en una línea celular de fibroblastos	60
4.4.2	Validar el modelo de senescencia celular en una línea celular de fibroblastos mediante técnicas celulares	64

4.4.3 Validar el modelo de senescencia celular en una línea celular de fibroblastos mediante técnicas moleculares.....	67
4.4.4. Evaluar el efecto de la metformina sobre los marcadores de senescencia en una línea celular de fibroblastos	72
4.4.5 Recolectar los medios condicionados de senescencia de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina	74
4.4.6 Realizar el análisis transcriptómico de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina	77
4.4.7 Realizar el análisis proteómico de los secretomas provenientes de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina	79
4.4.8 Realizar el análisis metabolómico de los secretomas provenientes de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina	80
4.4.9 Realizar el análisis transcriptómico de células MCF-7 expuestas a los secretomas provenientes de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina.....	83
4.4.10 Realizar un modelo computacional del posible mecanismo de acción de la metformina.....	85
4.5 Manejo y disposición de residuos	89

CAPÍTULO 5.....	91
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
5.1 Inducir senescencia celular en una línea celular de fibroblastos	91
5.2 Validar el modelo de senescencia celular en una línea celular de fibroblastos mediante técnicas celulares.....	93
5.3 Validar el modelo de senescencia celular en una línea celular de fibroblastos mediante técnicas moleculares.....	98
5.4 Evaluar el efecto de la metformina sobre los marcadores de senescencia en una línea celular de fibroblastos.....	109
5.5 Recolectar los medios condicionados de senescencia de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina	112
5.6 Realizar el análisis transcriptómico de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina.....	114
5.7 Realizar el análisis proteómico de los secretomas provenientes de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina	128
5.8 Realizar el análisis metabolómico de los secretomas provenientes de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina	134

5.9 Realizar el análisis transcriptómico de células MCF-7 expuestas a los secretomas provenientes de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina.....	145
5.10 Realizar un modelo computacional del posible mecanismo de acción de la metformina.....	156

CAPÍTULO 6.....	186
CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y REFERENCIAS.....	186
6.1 Conclusiones.....	186
6.2 Perspectivas	188
6.3 Referencias	190

LISTA DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

- Figura 1.** Representación del ciclo celular. Las fases del ciclo celular que conducen a la proliferación se encuentran ilustradas con flechas en distintos tonos de color verde. La fase G0 o quiescencia se ilustra con color rojo. 3
- Figura 2.** Regulación de las diferentes fases del ciclo celular por parte de las CDKs. 5
- Figura 3.** Regulación de los inhibidores de ciclinas dependientes de cinasas ... 8
-

MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

- Figura 4.** Fundamento químico del ensayo de la β -galactosidasa. 65
- Figura 5.** Diseño general del experimento planteado para la evaluación del efecto de la metformina (100 μ M) sobre los marcadores moleculares de senescencia en el modelo de senescencia de IMR90 inducido por MMC. 73
- Figura 6.** Diseño general del experimento planteado para la recolección de los diferentes medios condicionados a partir de los cultivos de fibroblastos IMR90 CT o SN, tratados o no con metformina. 75
- Figura 7.** Filtración y almacenamiento de los diferentes medios condicionados recolectados de los fibroblastos CT o SN, tratados o no con metformina..... 77
- Figura 8.** Diseño de experimentos del estudio del transcriptoma de los fibroblastos senescentes tratados o no con metformina. 78
- Figura 9.** Diseño de experimentos del estudio del transcriptoma de las células MCF-7 expuestas a los diferentes medios condicionados recolectados de los fibroblastos senescentes, tratados o no con metformina. 84
-

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 10. Ensayo de actividad de la β -galactosidasa de los fibroblastos no expuestos (CT) y expuestos a MMC (SN) empleando cultivos con una densidad de 50,000 células. Las imágenes se obtuvieron empleando el objetivo 10X.	92
Figura 11. Porcentajes de senescencia del ensayo de actividad de la β -galactosidasa de los fibroblastos no expuestos (CT) y expuestos a MMC (SN) por diferentes tiempos y empleando cultivos con una densidad de 50,000 células. 95	
Figura 12. Microscopía óptica de fibroblastos IMR90 control y senescentes inducidas por exposición a MMC durante 144 horas e incubación post-MMC de 48 horas. Las imágenes se obtuvieron con el objetivo de 20X.	96
Figura 13. Análisis electroforético de las muestras de ARN total extraídas de los fibroblastos CT (Carril 1) y SN (Carril 2) expuestos a MMC por 144 h y sometidos a 48 h de incubación post-MMC	99
Figura 14. Curva de fusión de la amplificación de los oligonucleótidos empleados para la cuantificación de la expresión relativa de <i>CDKN1A</i>	100
Figura 15. Curva de fusión de la amplificación de los oligonucleótidos empleados para la cuantificación de la expresión relativa de <i>CDKN2A</i>	101
Figura 16. Curva de fusión de la amplificación de los oligonucleótidos empleados para la cuantificación de la expresión relativa de <i>IL6</i>	102
Figura 17. Expresión relativa de los marcadores de senescencia de los fibroblastos no expuestos (CT) y expuestos a MMC (SN) por 144 h y 48 h de incubación post-MMC.	103
Figura 18. Expresión relativa de los marcadores de senescencia de los fibroblastos no expuestos (CT) y expuestos a MMC (SN) por 144 h y 72 h de incubación post-MMC.	105
Figura 19. Expresión relativa de los marcadores de senescencia de los fibroblastos senescentes inducidos por exposición a MMC (SN) por 144 h y variando el tiempo de incubación post-MMC en 48 o 72 h.	107
Figura 20. Comparación de la expresión relativa del gen <i>CDKN1A</i> de los fibroblastos no senescentes (CT), los fibroblastos senescentes (SN) y los fibroblastos SN tratados con metformina durante la incubación post-MMC (SN+MET).	110
Figura 21. Comparación de la expresión relativa del gen <i>CDKN2A</i> de los fibroblastos senescentes (SN) y los fibroblastos SN tratados con metformina durante la incubación post-MMC (SN+MET).	110
Figura 22. Apariencia física de los medios condicionados fraccionados en sus fracciones de proteoma y metaboloma luego del proceso de liofilización.	114
Figura 23. Electroforesis en gel (agarosa al 1%) de los ARNs totales extraídos de células IMR90 senescentes y senescentes tratadas con metformina	116

Figura 24. Electroforesis en gel (agarosa al 1%) de los ARNs totales extraídos de células IMR90 senescentes y senescentes tratadas con metformina luego de la digestión con DNasa I.	117
Figura 25. Chips de microarreglos de ADN de la expresión de los fibroblastos SN vs SN+MET.	118
Figura 26. Vías afectadas por la regulación a la baja en la expresión génica de fibroblastos senescentes tratados con metformina en comparación con fibroblastos senescentes no tratados.	119
Figura 27. Vías afectadas por la regulación al alza en la expresión génica de fibroblastos senescentes tratados con metformina en comparación con fibroblastos senescentes no tratados.	120
Figura 28. Gel de electroforesis de los proteomas derivados de los medios condicionados obtenidos de fibroblastos IMR90 senescentes o no, tratados o no con metformina.	129
Figura 29. Agrupamiento de las muestras de los diferentes metabolomas de fibroblastos CT, SN y SN+MET, mediante el método de K-means para la formación de 3 conjuntos.	136
Figura 30. Dendrograma del agrupamiento jerárquico de las muestras de los diferentes metabolomas de los fibroblastos CT, SN y SN+MET.	137
Figura 31. Análisis estadístico (ANOVA) de la concentración de D-glucosa presente en los metabolomas de los fibroblastos CT, SN y SN+MET	140
Figura 32. Análisis estadístico (ANOVA) de la concentración de ácido L-láctico presente en los metabolomas de los fibroblastos CT, SN y SN+MET	141
Figura 33. Resultados del análisis de sobrerrepresentación que muestra las vías metabólicas enriquecidas con base en los metabolitos diferencialmente alterados entre los metabolomas de los fibroblastos SN y SN+MET.	143
Figura 34. Gel de electroforesis (agarosa al 1%) de los ARNs totales extraídos de células MCF-7 tratadas con los secretomas recolectados de células senescentes tratadas o no con metformina	146
Figura 35. Gel de electroforesis (agarosa al 1%) de los ARNs totales extraídos de células MCF-7 tratadas con los secretomas recolectados de células senescentes tratadas o no con metformina, luego de la digestión con DNasa I.	147
Figura 36. Chips de microarreglos de ADN de la expresión de las células MCF-7 tratadas con los secretomas de fibroblastos SN vs SN+MET.	148
Figura 37. Vías afectadas por la regulación a la baja en la expresión génica de las células MCF-7 tratadas con los secretomas de fibroblastos senescentes o fibroblastos senescentes tratados con metformina.	149

Figura 38. Vías afectadas por la regulación al alza en la expresión génica de las células MCF-7 tratadas con los secretomas de fibroblastos senescentes o fibroblastos senescentes tratados con metformina.	150
Figura 39. Biplot del análisis de componentes principales de las propiedades fisicoquímicas predichas de los metabolitos candidatos no ionizados.	164
.....	165
Figura 40. Biplot del análisis de componentes principales de las propiedades fisicoquímicas predichas de los metabolitos candidatos ionizados.	165
Figura 41. Dendrograma de los agrupamientos jerárquicos de los metabolitos candidatos no ionizados con base en los resultados de la predicción de propiedades fisicoquímicas.	167
Figura 42. Dendrograma de los agrupamientos jerárquicos de los metabolitos candidatos ionizados (pH 7.4) con base en los resultados de la predicción de propiedades fisicoquímicas.	169
Figura 43. Dendrograma de los agrupamientos jerárquicos de los metabolitos candidatos y metformina con base en los resultados de la predicción de propiedades fisicoquímicas en modalidad no ionizada.	171
Figura 44. Dendrograma de los agrupamientos jerárquicos de los metabolitos candidatos y buformina con base en los resultados de la predicción de propiedades fisicoquímicas en modalidad no ionizada.	172
Figura 45. Dendrograma de los agrupamientos jerárquicos de los metabolitos candidatos y fenformina con base en los resultados de la predicción de propiedades fisicoquímicas en modalidad no ionizada.	173
Figura 46. Dendrograma de los agrupamientos jerárquicos de la metformina y los metabolitos candidatos con base en los resultados de la predicción de propiedades fisicoquímicas en modalidad ionizada (pH 7.4).	175
Figura 47. Dendrograma de los agrupamientos jerárquicos de la buformina y los metabolitos candidatos con base en los resultados de la predicción de propiedades fisicoquímicas en modalidad ionizada (pH 7.4).	176
Figura 48. Dendrograma de los agrupamientos jerárquicos de la fenformina y los metabolitos candidatos con base en los resultados de la predicción de propiedades fisicoquímicas en modalidad ionizada (pH 7.4).	177
Figura 49. Energías de afinidad (kcal/mol) de los acoplamientos moleculares entre las biguanidas y las dianas biológicas seleccionadas.	182
Figura 50. Modos de unión de los acoplamientos moleculares entre las biguanidas y los metabolitos candidatos en ARG1, CASTOR1 y CKB.	184

LISTA DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Composición general del secretoma de las células senescentes	29
---	----

MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Tabla 2. Materiales para la inducción y validación de la senescencia celular...	54
Tabla 3. Materiales para el establecimiento del modelo computacional de un posible mecanismo de acción de la metformina.	55
Tabla 4. Materiales para la implementación de las técnicas ómicas en la caracterización de la senescencia y su fenotipo secretor asociado a senescencia.	55
Tabla 5. Materiales para evaluación de los efectos del fenotipo secretor asociado a senescencia sobre células cancerígenas	56
Tabla 6. Reactivos para la inducción y validación de la senescencia celular. ..	56
Tabla 7. Reactivos para la implementación de las técnicas ómicas en la caracterización de la senescencia y su fenotipo secretor asociado a senescencia.	57
Tabla 8. Reactivos para evaluación de los efectos del fenotipo secretor asociado a senescencia sobre células cancerígenas.	57
Tabla 9. Equipos para la inducción y validación de la senescencia celular.	58
Tabla 10. Equipos para la implementación de las técnicas ómicas en la caracterización de la senescencia y su fenotipo secretor asociado a senescencia.	59
Tabla 11. Equipos para evaluación de los efectos del fenotipo secretor asociado a senescencia sobre células cancerígenas.	59
Tabla 12. Secuencias de oligonucleótidos empleados en la cuantificación de la expresión relativa de marcadores de senescencia.	71

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 13. Genes regulados a la baja en las células IMR90 senescentes por el tratamiento con metformina, desglosados por proceso biológico según KEGG.	121
Tabla 14. Genes regulados al alza en las células IMR90 senescentes por el tratamiento con metformina, desglosados por proceso biológico según KEGG.	122
Tabla 15. Top 20 procesos biológicos regulados a la baja en las células IMR90 senescentes por el tratamiento con metformina según Gene Ontology.....	127
Tabla 16. Top 20 procesos biológicos regulados al alza en las células IMR90 senescentes por el tratamiento con metformina según Gene Ontology.....	127
Tabla 17. Proteínas identificadas mediante la técnica de huella peptídica en el secretoma de fibroblastos CT.	130
Tabla 18. Proteínas identificadas mediante la técnica de huella peptídica en el secretoma de fibroblastos SN.	130
Tabla 19. Proteínas identificadas mediante la técnica de huella peptídica en el secretoma de fibroblastos SN+MET.	131
Tabla 20. Proteínas identificadas mediante la técnica de huella peptídica en una banda derivada del gel de electroforesis del secretoma de fibroblastos CT. ...	132
Tabla 21. Metabolitos diferencialmente alterados y estadísticamente significativos ($p < 0.05$ y $FDR < 0.05$) de los metabolomas de fibroblastos CT, SN o SN+MET de acuerdo con el ANOVA de un factor y el consecuente análisis post-hoc mediante prueba de Tukey.....	138
Tabla 22. Resultados del análisis de sobrerrepresentación que muestra las vías metabólicas enriquecidas con base en los metabolitos diferencialmente alterados entre los metabolomas de los fibroblastos SN y SN+MET, y sus parámetros estadísticos.....	142
Tabla 23. Resultados del análisis de sobrerrepresentación que muestra las vías metabólicas enriquecidas con base en los metabolitos diferencialmente alterados entre los metabolomas de los fibroblastos SN y SN+MET, y sus parámetros estadísticos.....	144
Tabla 24. Genes regulados a la baja en las células MCF-7 tratadas con los secretomas de fibroblastos senescentes o fibroblastos senescentes tratados con metformina, desglosados por proceso biológico según KEGG.	150
Tabla 25. Genes regulados al alza en las células MCF-7 tratadas con los secretomas de fibroblastos senescentes o fibroblastos senescentes tratados con metformina, desglosados por proceso biológico según KEGG.	151

Tabla 26. Procesos biológicos regulados a la baja en las células MCF-7 tratadas con los secretomas de fibroblastos senescentes o fibroblastos senescentes tratados con metformina según Gene Ontology.....	154
Tabla 27. Top 20 procesos biológicos regulados al alza en las células MCF-7 tratadas con los secretomas de fibroblastos senescentes o fibroblastos senescentes tratados con metformina según Gene Ontology.....	154
Tabla 28. Base de datos de las moléculas candidatas incluidas en el análisis computacional.....	156
Tabla 29. Comparación estructural (2D y 3D) entre las biguanidas y los metabolitos candidatos.	158
Tabla 30. Predicción de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas candidatas empleando la herramienta SwissADME en modalidad no ionizada.	161
Tabla 31. Predicción de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas candidatas empleando la herramienta SwissADME en modalidad ionizada (pH 7.4).....	162
Tabla 32. Dianas biológicas predichas para las biguanidas empleando la herramienta SwissTargetPrediction.	178
Tabla 33. Dianas biológicas seleccionadas para el acoplamiento molecular..	179
Tabla 34. Parámetros de la grid box empleados en el acoplamiento molecular entre las biguanidas y las dianas seleccionadas.	180

NOMENCLATURA

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de variancia
ARN	Ácido ribonucleico
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CDKi	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina
CT	Color Tanimoto
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMEM	Medio esencial mínimo de Eagle
FC	Fold change
FDR	Tasa de descubrimiento falso (False Discovery Rate)
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
MMC	Mitomicina C
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
PBS	Buffer de fosfatos salino
PDL	Nivel de duplicación de poblaciones
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Rb	Retinoblastoma
RMN	Resonancia magnética nuclear
SASP	Fenotipo secretor asociado a senescencia
SFB	Suero fetal bovino
ST	Shape Tanimoto

TC Coeficiente de Tanimoto
UNAM Universidad Nacional Autónoma de Nuevo León

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Ciclo celular

Nuestros tejidos y órganos están en constante cambio. A través de los procesos de división y muerte celular, el organismo mantiene la generación de nuevas células que contribuyan a preservar la homeostasis, al mismo tiempo que elimina células disfuncionales.

La generación de nuevas células a través de la división celular es un proceso complejo. En biología, la división se suele describir en torno a 5 fases del denominado, ciclo celular, que es una serie de fases que atraviesa una célula progenitora para generar dos nuevas células hijas¹. Todas las células se encuentran en alguna de estas. A continuación, se describen las distintas fases del ciclo celular de manera general (Figura 1):

- **Fase S:** es el intervalo de tiempo en el que la célula inicia y termina el proceso de duplicación del ADN a través de la síntesis semiconservativa del conjunto entero de 46 cromosomas. La letra S hace alusión a la Síntesis del ADN. El resultado final de la fase S es la duplicación del material genético en el núcleo de la célula. Durante la fase S, la célula muestra una baja expresión génica y síntesis de proteínas, con excepción

de los genes que codifican a histonas, cuya expresión es máxima en la fase S ya que sus correspondientes productos génicos contribuirán al condensado del material genético recién sintetizado².

- **Fase M:** es el intervalo de tiempo en el que la célula inicia y termina el proceso de mitosis. La letra M hace alusión a la Mitosis. El resultado final de la fase M es la generación de dos células hijas idénticas. A su vez, la mitosis puede subdividirse en 6 subfases: profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis¹.
- **Fases G₁ y G₂:** las fases G₁ y G₂ son los intervalos de tiempo en los que la célula se prepara, a nivel celular y molecular, para entrar en las fases S y M, respectivamente. La letra G proviene del término en inglés Gap. Durante la fase G₁, la célula sintetiza muchas proteínas necesarias para la generación de nuevos organelos, nuevos bloques de construcción como, por ejemplo, nucleótidos, así como crecer en tamaño. De hecho, se ha descrito que la fase G₁ podría ocupar alrededor del 50% del tiempo necesario para completar todo el ciclo celular. De manera similar, en la fase G₂ la célula continúa el proceso de crecimiento al incrementar la biosíntesis de proteínas y de ácidos grasos, estos últimos permitiendo la formación de fosfolípidos para la creación de nuevas membranas¹. Además, durante la fase G₂ se llevan a cabo procesos de reparación de ADN en caso de que presenten roturas de doble hebra inducidas por algún estímulo lesivo o procesos intrínsecos inadecuados³.

- **Fase G₀**: es el intervalo de tiempo en el que la célula realiza sus funciones características. En este estado, también denominado quiescencia, la célula arresta su ciclo celular para dejar de proliferar temporalmente. No obstante, la célula puede volver a proliferar si se le otorgan las señales necesarias como, por ejemplo, hormonas, factores de crecimiento, estímulos mecánicos, etc. Cabe mencionar que la célula puede mantenerse en la fase G₀ por horas, días, meses o incluso años, todo dependerá del fenotipo celular y el microambiente que la rodea⁴.

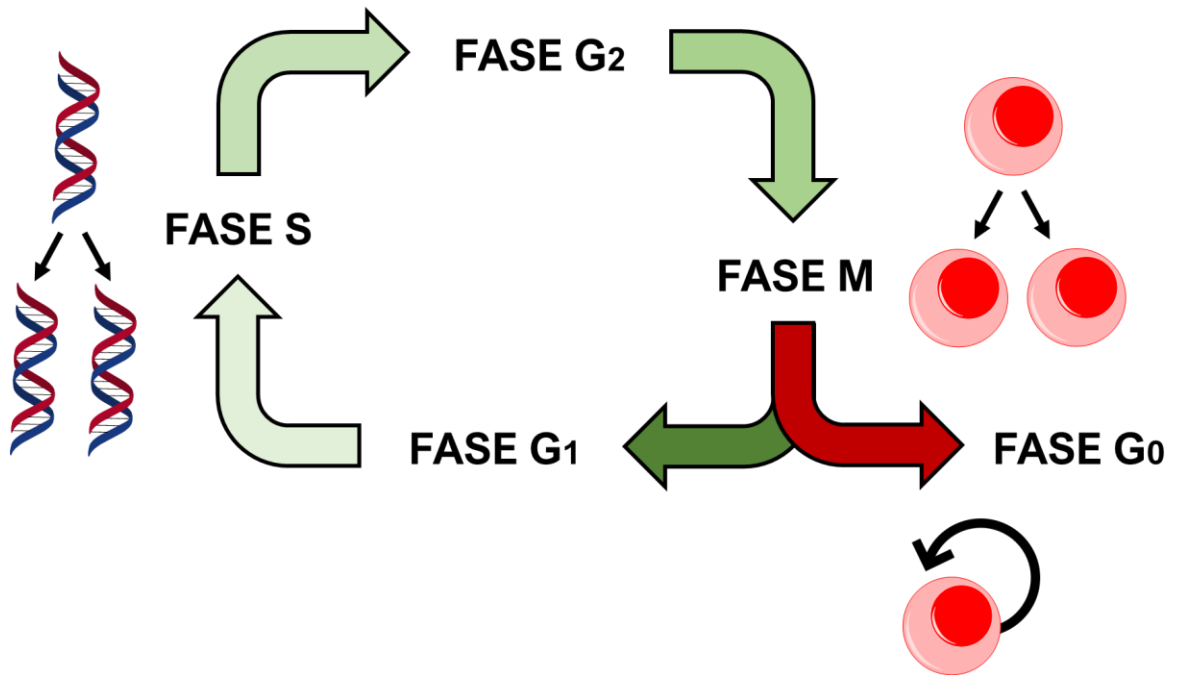


Figura 1. Representación del ciclo celular. Las fases del ciclo celular que conducen a la proliferación se encuentran ilustradas con flechas en distintos tonos de color verde. La fase G₀ o quiescencia se ilustra con color rojo.

1.1.1 Ciclinas dependientes de cinasas

En la célula, todas estas fases se regulan a través de diversas proteínas que sirven como interruptores para permitir, detener o arrestar el ciclo celular. Uno de los reguladores de progresión del ciclo celular es la familia de las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs, por sus siglas en inglés). Las CDKs son serina-treonina cinasas encargadas de fosforilar numerosos reguladores positivos y negativos, con el objetivo de permitir el avance del ciclo celular a través de sus diferentes fases¹.

Para poder funcionar adecuadamente, las CDKs deben heterodimerizarse con un grupo de proteínas denominadas ciclinas. Existen diferentes tipos de ciclinas, por ejemplo, ciclinas tipo D, ciclinas tipo A, ciclinas tipo E, entre otras. Cada complejo ciclina-CDK suele tener una especificidad única por sus diferentes sustratos, aunque algunos pueden solaparse. En ausencia de sus respectivas ciclinas, las CDKs tienen poca o nula actividad catalítica. La reacción de fosforilación catalizada por los complejos ciclina-CDK depende del trifosfato de adenosina (ATP). La fosforilación de la serina o la treonina en la proteína sustrato conduce a su activación o inactivación¹.

Se han llegado a identificar complejos ciclina-CDK reguladores específicos de una determinada fase del ciclo celular. En la figura 2 se muestran algunos ejemplos de estos complejos y las fases que regulan. Hay que notar que una

misma CDK puede regular distintas fases a través de la generación de heterodímeros con diferentes ciclinas.

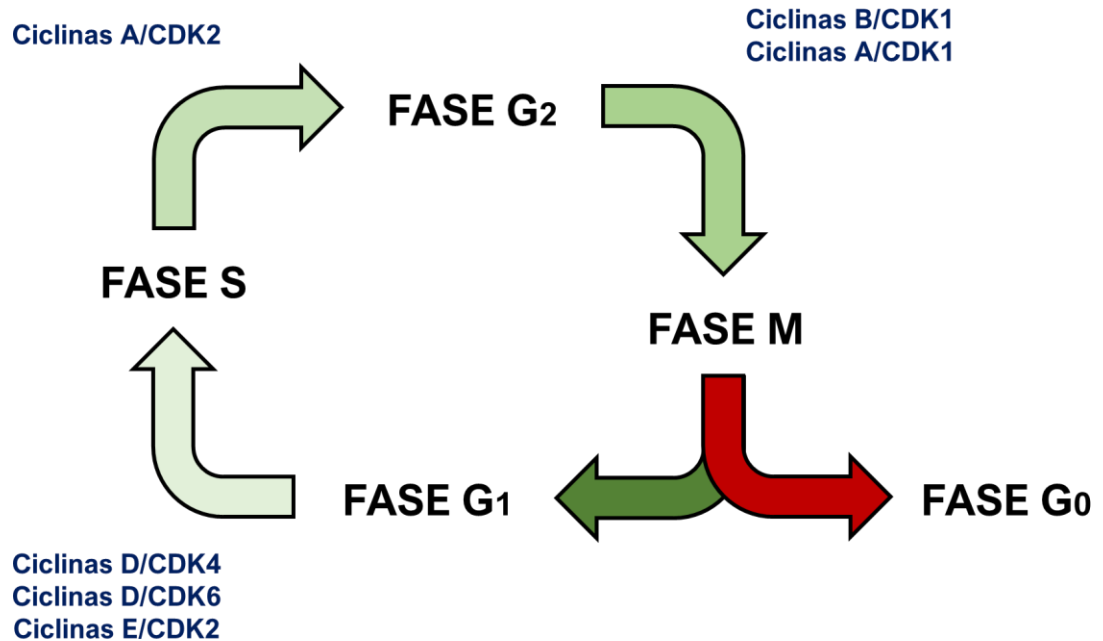


Figura 2. Regulación de las diferentes fases del ciclo celular por parte de las CDKs.

1.1.2 Eventos relevantes del ciclo celular

Cuando las células arrestadas en la fase G₀ se exponen a factores de crecimiento, se inician distintas vías de señalización que culminan en el ingreso de la célula a la fase G₁. Por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés) se une a su receptor EGFR, provocando su dimerización y la activación de su actividad tirosín cinasa. Luego de esto, se lleva a cabo una autofosforilación entre las subunidades del receptor, conduciendo a la aparición de fosfotirosinas en los dominios citoplásmicos del receptor. Esto conduce al

reclutamiento de proteínas que contengan los dominios o proteínas de reconocimiento de fosfotirosinas hacia el receptor como, por ejemplo, la proteína adaptadora homóloga de colágeno y homóloga de Src (SHC). Dos proteínas importantes que son reclutadas y, posteriormente, fosforiladas por el EGFR activado son: SHC/Grb2, que conducirá a la activación de la vía de señalización Ras/Erk, y PI3K, que conducirá a la activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR. Como parte de la vía de señalización Ras/Erk, se da la activación dependiente de fosforilación de la proteína cinasa S6 ribosómica (RSK), llevando a su translocación hacia el núcleo donde puede promover la actividad de los factores de transcripción c-Fos y el factor de respuesta al suero (SRF). De manera similar, la proteína Erk también puede translocarse al núcleo y promover expresión de c-Fos y c-Jun. Por otro lado, la vía PI3K/Akt/mTOR culmina con el cambio de metabolismo de la célula desde el catabolismo hacia el anabolismo, favoreciendo la biosíntesis de nucleótidos, de ácidos grasos, y el aumento en la traducción⁵.

A grandes rasgos, la activación del receptor EGFR promueve un aumento en la expresión de ciclinas tipo D dependiente del complejo AP-1, compuesto por c-Fos y c-Jun, y por parte de c-Myc (activado por fosforilación directa de Erk), conduciendo a la formación de los complejos CDK4-ciclina D y CDK6-ciclina D. Estos complejos CDK4/6-ciclina D comienzan la fosforilación de retinoblastoma (Rb), una proteína que regula negativamente al factor de transcripción E2F. La versión fosforilada de Rb se disocia de E2F, liberándolo y comenzando la transcripción de distintos genes relacionados a la terminación de la fase G₁ y la

transición G₁/S, incluyendo las ciclinas tipo E y tipo A, en ese orden. Las ciclinas tipo E se asocian con la CDK2, formando el complejo CDK2-ciclina E, y fosforilando aún más Rb. La forma hiperfosforilada de Rb conduce a una mayor disociación de E2F, y conduciendo a un mayor aumento en la transcripción de genes de proliferación. Todos estos eventos de transcripción se ven acompañados de una incrementada traducción dependiente de mTORC1. Durante la fase S, se forman los complejos CDK2-ciclina A que inician la fosforilación de la maquinaria de replicación del ADN y su consecuente activación. Asimismo, este complejo regula la transición hacia la fase G₂. Por otro lado, la formación de los complejos CDK1-ciclina A marcan la entrada de la célula hacia los primeros eventos (profase) de la fase M. Por último, la formación de los complejos CDK1-ciclina B dirigen el proceso mitótico hasta su culminación. Como se puede evidenciar en este párrafo, la fase del ciclo celular más estudiada hasta el momento es la fase G₁, lo que contrasta con la poca información que se tiene sobre las demás fases en cuestiones moleculares¹.

1.1.3 Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas

Los inhibidores de CDK (CDKi, por sus siglas en inglés) son proteínas reguladoras que, luego de interactuar con sus CDK diana, las conducen a su inhibición. Dentro de este grupo, los miembros más estudiados son los pertenecientes a las familias INK4 y CIP/KIP (Figura 3).

La familia INK4 se compone de cuatro miembros: p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, y p19^{INK4d}. El locus de donde se transcribe la proteína p16, tiene la capacidad de generar un transcrito distinto, a través del proceso de corte y empalme alternativo, y codificar la proteína p14^{ARF}, otro inhibidor de CDKs no perteneciente a la familia INK4. Las proteínas INK4 actúan como inhibidores de las CDK4 y CDK6 en la fase G₁ previniendo la formación de los complejos activos. Por otro lado, la proteína p14 promueve la activación de p53 a través del bloqueo de la función de MDM2⁶. En el caso de la familia CIP/KIP, entre sus miembros destacados se encuentran: p21^{CIP1/WAF1/Sdi1}, p27^{KIP1}, y p57^{KIP2}. A diferencia de la familia INK4, los miembros de la familia CIP/KIP tienen una menor especificidad de sustrato ya que previenen la formación de los complejos ciclina con CDK4, CDK6 y CDK2⁶.

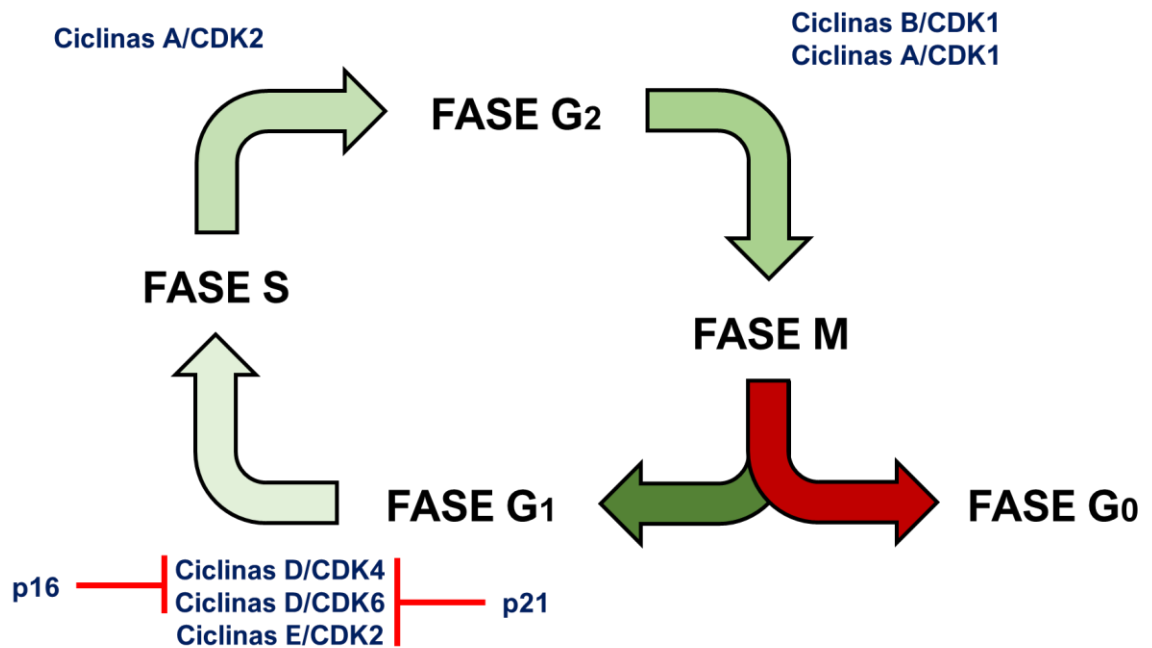


Figura 3. Regulación de los inhibidores de ciclinas dependientes de quinasas

Los CDKi suelen expresarse durante episodios de estrés celular, especialmente, cuando se presenta daño al ADN. En términos prácticos, los CDKi arrestan el ciclo celular para permitir que la célula movilice los procesos de reparación y pueda continuar con su división⁶.

1.1.4 Otras proteínas relevantes del ciclo celular

Además de las proteínas que actúan como inductores de cada fase del ciclo celular (CDK), y sus respectivos inhibidores (CDKi), existe un gran número de proteínas que contribuyen con otras funciones. Dentro de estas, podemos destacar al grupo de las punto de control cinasas, Chk1 y Chk2; los detectores de daño al ADN, ATM y ATR; y a las proteínas supresoras de tumor, Rb y p53. A continuación, se describen de forma breve sus funciones:

- Detectores de daño al ADN:** los transcritos traducidos del gen ataxia telangiectasia mutado y el gen ataxia telangiectasia y rad3 relacionados codifican a las serina-treonina cinasas ATM y ATR, respectivamente. Estas proteínas están implicadas en el reconocimiento de roturas del ADN y la consecuente movilización de proteínas implicadas en el arresto temporal del ciclo celular. La interacción de ambas proteínas con la maquinaria de reparación del ADN también es un estímulo de su activación⁷.

•**Punto de control cinasas:** las punto de control cinasas (o Chk, por sus siglas en inglés) son serina-treonina cinasas que regulan la progresión del ciclo celular en eventos de estrés celular, especialmente, durante el daño al ADN. Actualmente, las cinasas Chk1 y Chk2 son las más estudiadas. Cuando ATR y ATM detectan roturas en el ADN, se activan y fosforilan a Chk1 y Chk2, respectivamente, activándose en el proceso. Una vez activadas, las punto de control cinasas pueden regular diferentes sustratos claves en la progresión del ciclo celular, con el objetivo de evitar la inestabilidad genómica. Por ejemplo, se ha observado que la Chk1 fosforila a la familia de fosfatasas Cdc25 cuya función es la de mantener en funcionamiento a las CDK1 y CDK2, y promover la entrada de la célula a las fases S y M. De esta manera, la Chk1 previene la progresión de la célula a las fases de mayor susceptibilidad al daño genómico. Asimismo, la Chk1 es capaz de retardar la fase S, promoviendo mayor estabilidad en las horquillas de replicación. Por último, se ha observado que la Chk1 es capaz de regular la segregación de los cromosomas al fosforilar a la aurora cinasa⁸.

•**Supresores de tumor:** son proteínas cuya ausencia, debido a deleciones o alteraciones que conducen a poca o nula actividad, se ha relacionado con el desarrollo de ciertos tipos de neoplasias. A los genes que codifican estas proteínas se les conoce como genes supresores de tumor. En general, los genes que se han identificado como supresores de tumor presentan uno o más de las siguientes características: 1) inhiben vías de

señalización mitogénicas, 2) inhiben la progresión del ciclo celular, 3) bloquean el metabolismo anabólico, 4) bloquean la angiogénesis, 5) promueven la comunicación célula-célula, y 6) evitan la inestabilidad genómica. Por ejemplo, los genes RB y TP53 codifican las proteínas Rb y p53. Como se mencionó previamente, Rb es un regulador negativo del factor de transcripción E2F. Por lo tanto, su ausencia en la célula o disminución de su actividad podría conducir a una mayor proliferación⁹. Por otro lado, p53 es una proteína que, al ser activada, puede controlar distintos procesos celulares incluyendo la reparación del ADN, la apoptosis, y el metabolismo¹⁰.

1.2 Salida del ciclo celular: diferenciación terminal y quiescencia

Una vez finalizada la fase M, el ciclo celular se ha completado. A partir de este punto, la célula puede entrar de nuevo en la fase G₁ si recibe las señales mitogénicas y los nutrientes adecuados, o arrestar su ciclo celular, abandonando la posibilidad de dividirse. De acuerdo con la literatura, existen tres estados a los que la célula puede acceder y que se caracterizan por el arresto del ciclo celular: 1) la diferenciación terminal, 2) la quiescencia, y 3) la senescencia. Cada uno de estos arrestos es diferente con respecto a los demás, mostrando diferencias en el estímulo que induce el arresto, y la reversibilidad de este, principalmente.

1.2.1 Diferenciación terminal

Conforme los progenitores de un tejido dan origen a células más especializadas en el proceso de diferenciación, las células terminalmente diferenciadas abandonan el ciclo celular y quedan arrestadas en la fase G₁. Este arresto del ciclo celular ligado a la diferenciación es estable, debido a que las células se vuelven resistentes a la proliferación aún en presencia de factores de crecimiento. Se ha demostrado que las señales de diferenciación conducen a la expresión de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas de la familia CIP/KIP, incluyendo a p21, p27 y p57. En efecto, algunos factores de transcripción de tipo hélice-asa-hélice básica (bHLH, por sus siglas en inglés) que están implicados en la diferenciación hacia células musculares o durante la embriogénesis (de *Drosophila melanogaster*), como MyoD o Hes1, respectivamente, se han asociado con la transcripción de los genes de la familia CIP/KIP. Al inhibir a las cinasas dependientes de ciclinas, la proteína Rb se mantiene en un estado hipofosforilado que mantiene inactivo al factor de transcripción E2F, limitando la expresión de ciclinas y otros genes de proliferación¹¹. No obstante, a pesar de ser un estado estable, es posible la reversión del arresto del ciclo celular. Esto resulta evidente en modelos de regeneración de tejidos.

1.2.2 Quiescencia

De manera similar a la diferenciación terminal, la quiescencia es un estado en el que la célula arresta su ciclo celular por períodos de tiempo variables (cortos o largos), aunque tiene la capacidad de reingresar a este luego de la exposición a los estímulos adecuados. Se puede decir que la quiescencia es el arresto menos estable del ciclo celular, comparado con la senescencia y la diferenciación terminal, pues a diferencia de los otros, la exposición a señales mitogénicas u otro tipo de señales tienden a estimular la división celular rápidamente. Es común asociar a la quiescencia con las células madre, por ejemplo, las células madre hematopoyéticas, las células madre musculares entre otras. Sin embargo, existen fenotipos carentes de multipotencia que pueden desarrollar quiescencia, incluyendo a los hepatocitos, fibroblastos, linfocitos, entre otros. De manera similar a la diferenciación terminal, la célula se mantiene en el estado de quiescencia debido a incrementos en la expresión de CKI, como p21, p27 y p57¹².

1.3 Senescencia

La senescencia celular se puede describir de distintas maneras. Algunos autores la han descrito simplemente como un arresto estable del ciclo celular y que, desde un punto de vista evolutivo, se puede considerar una barrera natural al desarrollo de tumores, pues se suele desarrollar luego de un estímulo lesivo,

especialmente, sobre el ADN¹³. La senescencia es un estado más complejo de lo que se creía en un inicio, pues más que considerarse como un mecanismo de supresión tumoral, algunos autores la han descrito en torno a cambios metabólicos, epigenéticos, e incluso con fines teleológicos como un estado celular relevante en los procesos de reparación tisular^{13,14}.

Hay que evitar confundir a la senescencia celular con envejecimiento. Desde un punto de vista fisiológico, el envejecimiento es el decline cronológico en la función orgánica de un organismo. Aunque la senescencia se ha asociado con el proceso de envejecimiento, no es exclusiva de este. De hecho, se han identificado células senescentes en embriones en desarrollo. Por lo tanto, podríamos ver a la senescencia como un estado celular, independiente de la edad del organismo, pero que tiende a estar más presente a mayores edades cronológicas debido al contexto celular intrínseco del envejecimiento.

La senescencia se describió por primera vez en 1961, cuando Hayflick reportó que los cultivos de fibroblastos que manipulaba mostraron una capacidad proliferativa limitada luego de un número de subcultivos en concreto. A este hecho se le conoció como el límite de Hayflick. Sin embargo, se desconocía la razón detrás de este fenómeno. No fue hasta que se descubrió más acerca de la biología de los telómeros cuando se entendió realmente lo que ocasionaba el límite de Hayflick¹³.

Los telómeros son estructuras complejas situadas en los extremos de los cromosomas. En general, los telómeros se componen de cientos de secuencias repetitivas 5'-TTAGGG-3' presentes en los distintos cromosomas. Estas

secuencias, denominadas en conjunto como ADN telomérico se encuentran formando un complejo con un grupo de proteínas conocidas como proteínas de unión a telómeros. Algunos de los miembros incluyen a la proteína de protección de telómeros (POT1), al factor de unión a repeticiones teloméricas 1 (TERF1), TERF2, el producto génico del factor nuclear que interactúa con TERF1 (TINF2), al producto génico del gen homólogo de la displasia adrenocortical (TPP1), y la proteína represora/activadora 1 (RAP1). En conjunto, estas seis proteínas actúan como subunidades de un complejo proteico denominado shelterina, complejo protector, o telosoma. Luego de su interacción con el ADN telomérico, la shelterina promueve la formación de un bucle en el extremo del cromosoma, al promover la extrusión de una región del ADN repetitivo y la complementariedad de la región final del ADN en su lugar. A través de la formación de estos bucles, se evita el reconocimiento erróneo de los telómeros por las proteínas ATM/ATR, capaces de inducir la respuesta al daño del ADN en la célula¹⁵.

Conforme una célula prolifera, la extensión de sus cromosomas se ve reducida debido a la incapacidad de replicar el ADN telomérico. Una vez alcanzada una determinada reducción de telómeros, la célula arresta su ciclo celular y entra en senescencia. Se sospecha que al reducir sus telómeros lo suficiente, las shelterinas no pueden establecerse adecuadamente, conduciendo a una desprotección de estos y disparándose la respuesta de daño al ADN, conduciendo a la expresión de CDKi¹⁵.

La senescencia inducida por la proliferación de células también se conoce como senescencia replicativa y, durante mucho tiempo, fue el tipo de senescencia más

estudiado. Actualmente, la senescencia se puede llegar a inducir por al menos otros tres métodos. Se ha reportado la inducción de senescencia por la sobreexpresión de oncogenes, siendo el más común el gen *RAS*. Los modelos de senescencia inducidos de esta manera se han denominado comúnmente como senescencia inducida por oncogén (OIS, por sus siglas en inglés). De manera similar, se ha reportado que el tratamiento de células con dosis elevadas de radiación ionizante o UV por períodos breves de tiempo o con dosis bajas, pero por períodos largos puede promover senescencia. Además, el tratamiento con agentes quimioterapéuticos de la terapia antineoplásica (por ejemplo, doxorubicina, etopósido o mitomicina C) o antirretroviral (por ejemplo, abacavir o nevirapina) también han sido capaces de inducir senescencia¹⁶.

Aunque pudieran no ser las únicas explicaciones, todos los tratamientos que inducen senescencia comparten algo en común, todos inducen daño al ADN de manera directa o indirecta. La radiación ionizante o ultravioleta puede promover la alteración de bases nitrogenadas al generar radicales hidroxilo *in situ*, o dímeros de timina, respectivamente^{17,18}. El tratamiento con agentes antineoplásicos va por el mismo camino, dependiendo de su mecanismo de acción, estos pueden dañar al ADN directamente, como la mitomicina C que genera enlaces cruzados, o indirectamente como el etopósido que inhibe a la ADN topoisomerasa II, llevando a la formación de roturas en el ADN^{19,20}. Se ha reportado que los agentes antirretrovirales pueden llegar a inhibir no solo a la transcriptasa reversa del VIH, sino a la telomerasa humana que posee actividad

de transcriptasa reversa, y juega un papel clave en el mantenimiento de los telómeros²¹.

En la última década se identificó que, para que se establezca la senescencia, se necesitan dos componentes: 1) un estímulo estresor que genere daño en la célula (especialmente, al ADN) y 2) la activación de la proteína mTOR. La proteína mTOR forma parte de dos complejos proteicos encargados de coordinar el anabolismo (mTORC1) con la división celular (mTORC2), aunque en secciones posteriores hablaremos de mTOR y sus complejos más detalladamente. Se ha observado que, luego de la exposición a un agente lesivo, el arresto del ciclo celular que este induce puede ser reversible (quiescencia) siempre y cuando mTOR se encuentre inhibido. De hecho, se ha demostrado que p53, un inductor de senescencia bien establecido puede inducir senescencia o quiescencia en una determinada línea celular, dependiendo de si mTOR es inhibido o no²². Cabe mencionar que p53 es un activador del complejo proteína cinasa activada por AMP (AMPK, por sus siglas en inglés). Cuando AMPK es activado, y a través de su actividad cinasa, es capaz de fosforilar al complejo TSC2, un inhibidor de la proteína Rheb, clave en la activación del complejo mTORC1²³. De esta manera, si la activación de p53 inhibe adecuadamente al complejo mTORC1, el arresto del ciclo celular se vuelve temporal y se dice que la célula entra en quiescencia, de lo contrario, entrará en senescencia.

Ahora que hemos incluido a mTOR en la escena podemos discutir acerca de los estudios de longevidad en diferentes modelos biológicos. Como se mencionó previamente, la senescencia es un estado celular altamente presente durante el

envejecimiento. Durante este último, en el organismo se da una incrementada acumulación de células senescentes en diferentes órganos debido a la incapacidad del sistema inmune para removerlas²⁴. Desde hace décadas, se ha observado que alteraciones o deleciones en ciertos genes pueden provocar una extensión de la longevidad de ciertos organismos, traduciéndose en un envejecimiento más lento²⁵. Alteraciones en el gen TOR y sus homólogos, presentes en organismos eucariotas, han llevado a extensión de la longevidad en *Saccharomyces cerevisiae*²⁶, *Caenorhabditis elegans*²⁷, *Drosophila melanogaster*²⁸, y el *Homo sapiens*²⁹. Además del gen TOR, alteraciones del gen que codifica al factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1, por sus siglas en inglés), el gen de la insulina, y los genes que codifican a sus respectivos receptores han mostrado efectos similares³⁰. De esta manera, podemos destacar la relevancia que cobra el metabolismo en el proceso de senescencia, y a una escala mayor en el proceso de envejecimiento.

1.3.1 Cambios celulares y moleculares durante la senescencia

Los cambios que se dan en las células senescentes se pueden analizar desde dos perspectivas, la celular y la molecular. A continuación, describiremos ambas.

Los cambios celulares son los más fáciles de discernir en una célula senescente, pues su morfología se altera rápidamente. Las células no senescentes normalmente tienen características morfológicas propias de la línea celular de donde provienen, pero una célula senescente muestra una morfología irregular,

plana y, en general, suele tener un mayor tamaño que la célula original³¹. Se ha reportado que las células senescentes suelen tener una elevada tasa metabólica y actividad lisosómica, posiblemente debido a la activación de mTORC1^{32,33}. Es importante destacar que las células senescentes son completamente viables, aun cuando no puedan proliferar, se pueden llegar a mantener en cultivo por meses³⁴. Además, se ha observado que esta actividad metabólica incrementada está en concordancia con una elevada secreción de sustancias, hecho que se ha llegado a denominar fenotipo secretor asociado a senescencia (o SASP, por sus siglas en inglés). El SASP es tan importante en el estudio de la senescencia que hablaremos de él más adelante. Otros autores han reportado que las células senescentes han demostrado ser capaces de fagocitar células y digerirlas³⁵.

Con respecto a los cambios moleculares, se ha reportado una hipometilación global del genoma y la hipermetilación de regiones promotoras en genes específicos. Además, se ha observado una disminución en el número de histonas, la pérdida de marcas represoras, así como la disminución en el número de la proteína de heterocromatina 1 (HP1). En general, estas observaciones sugieren una mayor accesibilidad de la maquinaria de transcripción al genoma de las células senescentes, debido a una menor condensación de la cromatina, exceptuando las regiones hipermetiladas³⁶. Como se mencionó previamente, la actividad de mTOR en las células senescentes está incrementada, conduciendo a una mayor capacidad de síntesis de proteínas dependiente de S6K, un sustrato activado por mTOR. Además, se ha reportado una actividad incrementada del factor de transcripción NF- κ B, conduciendo a una mayor expresión de citocinas

proinflamatorias³⁷. A nivel de organelos, se ha reportado una mayor actividad lisosómica y una incrementada expresión de β -galactosidasa³². Además, un estudio metabólico sugiere que los fibroblastos senescentes prefieren el metabolismo glucolítico sobre la fosforilación oxidativa. Esta observación parece paradójica, pues es común que células en quiescencia opten por la fosforilación oxidativa, y aquellas en proliferación, por el metabolismo glucolítico³⁸.

1.3.2 Relevancia del estudio de la senescencia

A parte de que las primeras ideas de la senescencia surgieron en los años 60's con las observaciones de Hayflick, su estudio no cobró gran relevancia. Hoy en día, el estudio de la senescencia se ha identificado como un componente clave para entender el desarrollo y progresión de las enfermedades crónicas. Esta relación no es de sorprender, pues uno de los factores de riesgo que todas tienen en común es la edad o el envejecimiento. Debido a que la senescencia está relacionada con el envejecimiento, esta debería tener una relación lógica con las enfermedades crónicas³⁹.

Un posible argumento en contra de esta declaración es que las enfermedades crónicas cada vez se hacen presentes a edades más tempranas. Sin embargo, esta observación no se contrapone a la declaración previa. Es importante distinguir entre envejecimiento cronológico y envejecimiento biológico. El primero se refiere a la edad de una persona en años, mientras que el segundo se refiere al estado funcional de los sistemas orgánicos del individuo. Por ejemplo, una

persona puede ser joven cronológicamente, pero tener la fisiología de un anciano en ciertos órganos. Esto se debe a que el envejecimiento biológico se puede acelerar por nuestro estilo de vida⁴⁰.

Cuando un órgano experimenta una demanda funcional, suele tener respuestas bien caracterizadas para adaptarse a estos cambios. En tejidos postmitóticos, como los músculos, la adaptación ocurre a través de la hipertrofia. En aquellos tejidos con capacidad de proliferar, como las glándulas, la adaptación se da a través de la hiperplasia e hipertrofia. La hiperplasia se define como el aumento en el número de células en un tejido, es decir, las células ya existentes con una alta demanda funcional y sus precursores deben proliferar para generar más células que toleren el aumento en la función. La proliferación implica acortamiento de telómeros, y eventualmente, este lleva a la senescencia.

Un ejemplo de esto se da durante el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2. Las células beta necesitan secretar cantidades mayores de insulina para poder sobrepasar la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos, esto se traduce en un aumento en la función. Para poder secretar más insulina y adaptarse a la nueva situación fisiológica, las células deben proliferar y al proliferar acortarán sus telómeros. Luego de un largo tiempo bajo esta situación, se alcanza la falla de células beta, donde el páncreas produce poca o nula insulina a causa del desarrollo de senescencia y apoptosis. Este proceso se puede dar a edades tempranas o tardías, todo depende de nuestro estilo de vida. Un estilo de vida perjudicial promoverá resistencia a la insulina, acelerando el proceso⁴¹.

El envejecimiento también se ha asociado con el desarrollo de inflamación crónica, y esta última se ha asociado con el desarrollo de las enfermedades crónicas. Se sospecha que las células senescentes son las responsables de la inflamación crónica asociada al envejecimiento, a través de la secreción de citocinas proinflamatorias⁴².

En los últimos años, las enfermedades crónicas han dominado casi todos los primeros puestos de incidencia y mortalidad a nivel nacional y mundial. Hoy en día, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer en sus distintos tipos suelen ser las primeras causas de muerte en el mundo. Por estos motivos, entender el desarrollo y progresión de las enfermedades crónicas cobra una gran relevancia, y el estudio de la senescencia podría revelarnos nuevas estrategias preventivas y terapéuticas⁴³.

1.3.3 Relación de la senescencia con el cáncer

El cáncer se puede describir como un grupo de enfermedades relacionadas por un conjunto de diez características, los denominados Hallmarks of Cancer descritos por Hanahan y Weinberg en el 2000 y, posteriormente, en el 2011. Estas características incluyen 1) una señalización proliferativa sostenida, 2) resistencia a la muerte celular, 3) evasión de los supresores del crecimiento, 4) inmortalidad replicativa, 5) inestabilidad genómica, 6) alteración de la bioenergética, 7) evasión de la destrucción por el sistema inmune, 8) inflamación

promotora de tumores, 9) inducción de la angiogénesis, y 10) la capacidad de invadir y hacer metástasis⁴⁴.

Hoy en día el cáncer se posiciona como una de las enfermedades con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial, convirtiéndolo en un problema de salud pública global. De acuerdo con la GLOBOCAN, tan solo en 2020 se reportaron 19.2 millones de casos nuevos y casi 10 millones de defunciones a nivel mundial. Además, se espera que estas cifras aumenten en un 27% y un 30%, respectivamente, para el año 2030⁴⁵. A pesar de las descripciones celulares y moleculares que se han desarrollado en torno al cáncer, su etiología exacta no se ha elucidado, y se considera una enfermedad multifactorial dependiente de componentes genéticos y su interacción con distintos factores ambientales incluyendo la dieta, sedentarismo, tabaquismo, alcoholismo, obesidad, entre otros.

Los nuevos descubrimientos de la biología del cáncer han permitido identificar numerosos hallazgos que, en el futuro, podrían permitir el desarrollo de terapias más adecuadas y menos tóxicas que las actuales. Aquí solo se destacarán tres de estos hallazgos: 1) la complejidad del microambiente tumoral, 2) la identificación de las células madre cancerosas, y 3) la identificación de la senescencia en el desarrollo del cáncer.

Anteriormente, se pensaba que los tumores eran simples masas de células idénticas. Sin embargo, pronto se descubriría la enorme complejidad detrás del microambiente tumoral. Lo primero que hay que destacar es que incluso si nos centráramos solo en las células cancerígenas, su estudio sería complejo. La

razón de esto es que, en el tumor, existen múltiples poblaciones de células cancerígenas. Se ha demostrado que difieren en metabolismo, mientras unas optan por el metabolismo glucolítico (aquellas más internas en el tumor), otras prefieren el metabolismo oxidativo (aquellas de la periferia donde los niveles de O₂ son adecuados). Además, existe heterogeneidad a nivel genético, pues pueden existir distintas poblaciones que difieren en alteraciones génicas o cromosómicas. En los últimos años, se ha identificado un tipo de célula cancerígena que comparte algunas características únicas de las células madre, esta población se ha denominado células madre cancerosas (CMC), pero ya hablaremos de esta más adelante⁴⁶.

Continuando con el análisis del microambiente tumoral, tenemos que agregar que, además de las células cancerígenas, se ha reportado la presencia de células de sostén o estromales, que participan activamente en muchos procesos asociados al cáncer. Algunas de estas células incluyen fibroblastos, macrófagos, linfocitos T, células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés), células senescentes, y células no cancerígenas del tejido original. Por ejemplo, los macrófagos están implicados en la secreción de citocinas proinflamatorias que promueven los procesos de invasión y metástasis. Además, los macrófagos y fibroblastos pueden secretar enzimas proteolíticas de la familia de las metaloproteinasas de matriz, capaces de degradar la matriz extracelular, una característica importante en la invasión. Por otro lado, se ha observado la presencia de linfocitos T reguladores en los tumores, suprimiendo la inmunidad celular contra las células cancerígenas a través de los sistemas PD-1/PD-L1 y la

secreción de citocinas inmunosupresoras como TGF- β e IL-10. Estas acciones contribuyen al proceso de inmunoección, evadiendo de esta manera la destrucción por el sistema inmune⁴⁷.

Ahora continuemos describiendo el microambiente tumoral, centrándonos en las CMC. Las CMC son células cancerígenas que han adquirido propiedades de células madre, es decir, la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse a ciertos linajes celulares. Hoy en día esta descripción general es la más adecuada para esta población de células pues caracterizarlas es complicado debido a que presenten heterogeneidad. Los primeros marcadores que se utilizaron para caracterizarlas por citometría de flujo fueron CD24 y CD44. No obstante, una CMC puede ser muy diferente de otra, pueden expresar marcadores de superficie distintos, tener un comportamiento mitótico distinto, entre otras cosas. De hecho, esta heterogeneidad ha demostrado ser crucial en la resistencia de los tumores a la quimioterapia. Por ejemplo, se han reportado poblaciones de CMC con elevada proliferación, mientras otras se mantienen en quiescencia. Cuando se utiliza un agente antineoplásico que, normalmente, daña aquellas células en proliferación, puede inducir la apoptosis de las CMC en proliferación, pero el resto sobrevive. Luego de retirar la quimioterapia, las CMC en quiescencia entran en proliferación para regenerar los daños inducidos por la quimioterapia en el tumor. Resulta interesante que la pluripotencia de estas células es altamente dinámica, y pareciera ser una propiedad emergente a la población completa. Por ejemplo, cuando un grupo de CMC mueren, otras adquieren la pluripotencia y toman su

lugar. Al igual que cualquier otra célula madre, las CMC suelen optar por el metabolismo glucolítico^{48,49}.

Por último, hay que mencionar que se sospecha que las CMC son las células originadoras de tumores, pues durante ensayos *in vivo*, son las únicas capaces de generar tumores con buena eficacia, a diferencia de las células cancerígenas carentes de pluripotencia⁴⁹.

1.4 Fenotipo secretor asociado a senescencia

Como se mencionó previamente, las células senescentes adquieren una gran capacidad secretora, hecho que se ha denominado fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, por sus siglas en inglés). Al conjunto de componentes secretados por el SASP se les denomina secretoma. Podemos considerar al secretoma como el corazón de la senescencia, pues muchos de los efectos que hemos discutido anteriormente se deben, en parte, al secretoma del SASP⁵⁰.

Para poder mantener esta capacidad secretora tan elevada, se necesita de una elevada capacidad biosintética en paralelo, y la activación de mTOR en las células senescentes lo hace posible. mTOR es una serina-treonina cinasa que forma parte de dos complejos proteicos importantes en el control del anabolismo. El complejo mTORC1 está compuesto por mTOR, Raptor, y mLST8, y normalmente se encarga de controlar el anabolismo. Por otro lado, el complejo mTORC2 se compone de mTOR, Rictor y mLST8, y normalmente se encarga de controlar la proliferación. Aunque ambos complejos son relevantes para el

funcionamiento de una célula normal, para las células senescentes mTORC1 es más destacable. La vía de activación de mTORC1 es compleja y normalmente depende de dos componentes principales: factores de crecimiento y nutrientes⁵¹.

Por ejemplo, cuando la insulina o el IGF-1 están presentes, estos se unen a su respectivo receptor de tirosín cinasas, conduciendo a la activación enzimática del receptor, autofosforilándose en residuos de tirosina específicos y reclutando nuevos sustratos al receptor que reconocen las fosfotirosinas. Estos sustratos son las proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS, por sus siglas en inglés). Al ser fosforiladas, las IRS reclutan a la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K, por sus siglas en inglés) a la cara interna de la membrana plasmática. Una vez ahí, la PI3K fosforila al fosfatidil inositol bifosfato (PIP2), convirtiéndolo en el fosfatidil inositol trifosfato (PIP3). El PIP3 entonces recluta a la cinasa dependiente de fosfoinositol-1 (PDK1, por sus siglas en inglés) que fosforila a la proteína Akt. A su vez, Akt fosforila al complejo TSC, un regulador negativo de la GTPasa Rheb, actuando como una proteína activadora de GTPasa, de esta manera, Rheb se mantiene activado al preservar su unión a GTP. La proteína Rheb se localiza en la membrana lisosomal, y cuando está unida al GTP, esta activa al complejo mTORC1. Este es el papel que juegan los factores de crecimiento como la insulina y el IGF-1, estos promueven la activación de mTORC1 de manera dependiente de Rheb^{33,52}.

Los nutrientes que activan a mTORC1 son aminoácidos, especialmente los de cadena ramificada y la L-arginina. Cuando estos están presentes en altas concentraciones (período posprandial), se unen a reguladores negativos en la

activación de mTORC1. Por ejemplo, la L-arginina se une e inhibe a la CASTOR1, pero activa a Ragulator, mientras que la leucina se une y bloquea a la sestrina 2. Estas interacciones llevan, como resultado final, a la activación del complejo RagA/RagC. Este complejo se une a la Ragulator (presente en el lisosoma) y a la proteína Raptor del complejo mTORC1, reclutándolo hacia el lisosoma. De esta manera, solo cuando se combinan los dos factores, mTORC1 puede ser reclutado al lisosoma y Rheb puede activar a mTORC1³³.

Una vez activado, el complejo mTORC1 fosforila diferentes sustratos clave en la regulación positiva del anabolismo, entre estos: S6K y 4EBP que promueven la síntesis de proteínas; ATF4 que promueve la síntesis de nucleótidos; SREBP que promueve la síntesis de lípidos; y HIF1 α que promueve el metabolismo glucolítico. De esta manera, la activación de mTORC1 en las células senescentes puede conducir a un incremento en su capacidad biosintética³³.

1.4.1 Composición del secretoma

El secretoma de las células senescentes se ha estudiado por un largo tiempo, llegándose a identificar componentes característicos presentes en casi todos los estudios. En general, en el secretoma del SASP podemos encontrar oligonucleótidos, proteínas y metabolitos de bajo peso molecular. En la tabla 1 se muestran algunos de los componentes presentes en el secretoma del SASP organizados por clases y subclases.

Tabla 1. Composición general del secretoma de las células senescentes

Clase	Subclase
Oligonucleótidos	microARNs
	ARNs no codificantes largos
Proteínas	Citocinas proinflamatorias
	Quimiocinas
	Enzimas proteolíticas
	Factores de crecimiento
Metabolitos	Cofactores
	Nutrientes

Algunas citocinas o quimiocinas del secretoma del SASP, como IL-6 e IL-8, respectivamente, se han asociado a los efectos proinflamatorios de la senescencia. En efecto, al cuantificarse, se ha demostrado que son dos proteínas secretadas en altas concentraciones. Probablemente, la secreción de este tipo de hormonas está asociada con el reclutamiento de leucocitos para su eliminación, aunque otras teorías sugieren que el sistema inmune es reclutado para llevar a cabo la reparación del tejido en el que se encuentran las células senescentes⁵³.

Otro tipo de proteínas y los microARNs se suelen secretar en forma de exosomas que, al fusionarse con las células blanco, liberan su contenido dentro de estas. Los microARNs pueden llegar a modular la expresión génica al controlar la inactivación y/o degradación de los transcritos de ARN a los que muestren complementariedad. Si su complementariedad es baja, estos solo se inactivan. Por otro lado, una complementariedad alta, conducirá a su degradación. Para que los microARNs puedan cumplir su papel como moduladores de la expresión

génica estos deben asociarse con el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés)⁵⁴.

1.4.2 SASP y Cáncer

Como se mencionó en la sección 1.3.3, el cáncer se ha descrito en torno a diez características que delinear su comportamiento celular y molecular, los sellos del cáncer (o Hallmarks of Cancer, como se conocen en inglés). Además, se mencionó la presencia de las células senescentes en el microambiente tumoral⁵⁵.

Diversos estudios han puesto de manifiesto, incrementos en las capacidades tumorales y la aceleración de los procesos de invasión y metástasis debido a la presencia de células senescentes en el microambiente tumoral. Parece ser que esta potenciación de las capacidades tumorales se debe, en parte, al secretoma del SASP⁵⁵.

Las citocinas proinflamatorias, tanto interleucinas como quimiocinas, del secretoma se han asociado con la adquisición de un fenotipo invasivo en líneas celulares de cáncer, posiblemente al promover la transición epitelial-mesenquimal en las células cancerígenas. Además, es posible que las células senescentes contribuyan a moldear el microambiente tumoral al reclutar distintos tipos de células, siendo el sistema inmune, un componente esencial. A través del reclutamiento del sistema inmune, así como a través de algunos componentes del secretoma como las MMP, las células senescentes podrían llegar a promover

la degradación de la matriz extracelular de los tejidos circundantes al tumor. De esta manera, se promovería la angiogénesis, la invasión y la metástasis⁵⁶.

Por otro lado, es posible que el secretoma del SASP contribuya a la alteración del metabolismo de las células cancerígenas a través de la entrega de microARNs y la secreción de metabolitos, como han sugerido algunos autores, aunque hablaremos de esta reprogramación más adelante⁵⁷.

1.5 Agentes senolíticos y senomórficos

Debido al interés que ha despertado el estudio de la senescencia por su relación con distintas enfermedades, los científicos se han dado a la tarea de diseñar o identificar sustancias capaces de afectar a las células senescentes. Se han establecido dos tipos de agentes que difieren en sus efectos sobre las células senescentes: 1) agentes senolíticos, capaces de inducir la apoptosis en las células senescentes; y 2) agentes senomórficos, capaces de modular algunos de sus procesos, pero no inducir su muerte⁵⁸.

Con el uso de agentes senolíticos se ha demostrado la reversión parcial de algunas enfermedades crónicas, como la diabetes mellitus, demostrando el papel vital que juegan las células senescentes sobre su desarrollo y progresión⁵⁹. No obstante, inducir la muerte de células senescentes puede ser contraproducente, pues su papel en la regeneración y mantenimiento de tejidos es un hecho.

Bajo esta perspectiva, los agentes senomórficos resultan más atractivos, pues podrían llevar a controlar algunas de las características negativas de la senescencia al mismo tiempo que mantienen sus efectos positivos sobre la regeneración. Algunos agentes senomórficos que se han identificado incluyen al resveratrol, flavonoides, rapamicina, entre otros. Resulta interesante destacar que los mecanismos por los que estos agentes actúan no son exclusivos de una sola diana ni presentan afinidades extremadamente bajas (nM), sino que actúan en múltiples dianas con afinidades moderadas, es decir, presentan promiscuidad molecular. Dentro de sus mecanismos de acción se ha observado el control del metabolismo, la inducción de modificaciones epigenéticas, el bloqueo de vías de señalización, etc⁵⁹⁻⁶¹.

1.6 Metformina

La metformina es un fármaco antidiabético perteneciente a la familia de las biguanidas, junto con buformina y fenformina. Actualmente, la metformina es la única biguanida utilizada en la práctica clínica como tratamiento de primera línea en la diabetes mellitus tipo 2. Debido a su elevado potencial de inducir acidosis láctica, la buformina y fenformina fueron retiradas del mercado⁶².

Su uso en la diabetes mellitus tipo 2 se debe a su efecto supresor en la producción de glucosa hepática (gluconeogénesis), conduciendo a la disminución de la glucemia. Además, se ha observado la disminución de peso en algunos pacientes con sobrepesos u obesidad. Por último, se ha visto una disminución de

la resistencia a la insulina a nivel periférico (por ejemplo, el tejido adiposo o el músculo esquelético) luego del tratamiento con metformina. Estos efectos se han explicado a través de diversos mecanismos de acción, sin embargo, aquí solo se describirán los dos mejor sustentados con evidencia⁶³.

El primer mecanismo descrito (y también el más antiguo) se da a través de la inhibición del complejo I mitocondrial (NADH deshidrogenasa) por la metformina. Esto lleva a dos consecuencias en la célula: 1) una disminución en la síntesis del ATP (\downarrow [ATP] y \uparrow [AMP]) debido al bloqueo del complejo I y su incapacidad para contribuir al transporte de electrones; y 2) un aumento en la relación NADH/NAD⁺ debido a la incapacidad de oxidar el NADH. Estas circunstancias llevan a la célula a una crisis energética, forzándola a suprimir los programas anabólicos y promover los catabólicos⁶⁴.

Uno de los programas catabólicos más importantes es el de la proteína activada por AMP (AMPK, por sus siglas en inglés), un complejo heterotrimérico con actividad de serina-treonina cinasa que regula diversas vías catabólicas al alta, al mismo tiempo que suprime vías anabólicas a través de la fosforilación de sustratos específicos. La activación del complejo AMPK depende de dos tipos de regulación, el primero de estos se da por modificaciones postraduccionales y consiste en la presencia de un grupo fosfato en la treonina 172 añadido por proteínas cinasas o retirado por proteínas fosfatasas, y el segundo es de tipo alostérico dependiente de las concentraciones de ATP, ADP y AMP. Los dos tipos de regulación están relacionados entre sí, pues se ha observado que el aumento en la concentración de ATP promueve la actividad de las fosfatasas sobre el

AMPK, conduciendo a su inactivación. Por otro lado, el aumento en las concentraciones de ADP y AMP promueven la actividad de las cinasas sobre el AMPK, conduciendo a su activación. Hasta el momento, se han identificado tres cinasas capaces de fosforilar al complejo AMPK y activarlo, estas incluyen a la cinasa de hígado B1 (LKB1, por sus siglas en inglés), la proteína cinasa 2 dependiente de calcio/calmodulina (CaMKK2, por sus siglas en inglés) y la cinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante β (TAK1, por sus siglas en inglés). Se ha identificado que estas cinasas activan al complejo AMPK en circunstancias de crisis energética como el ayuno, durante el ejercicio, y la resolución de la inflamación. Con respecto a las fosfatasa, se han identificado a las proteínas PP2A y PP2C y, usualmente, estas se activan en condiciones de exceso de nutrientes o energía, como justo después de ingerir alimentos. De esta manera, al inhibir al complejo I, y promover un aumento en la concentración de AMP (y una disminución de la concentración de ATP), la metformina conducirá a la activación de AMPK⁶⁴.

Una vez activado el complejo AMPK, este se encarga de fosforilar diversos sustratos, incluyendo: la glucógeno sintasa conduciendo a un bloqueo en la síntesis de glucógeno; la acetil-CoA carboxilasa conduciendo a la supresión en la síntesis de ácidos grasos y una mayor oxidación de los mismos; al complejo TSC conduciendo a la inhibición del complejo mTORC1; la CRTC2 conduciendo al bloqueo de la gluconeogénesis; la fosfofructocinasa 2 conduciendo a un aumento en la glucólisis; la cinasa similar a Unc51 (ULK, por sus siglas en inglés) conduciendo a un aumento en la autofagia; y la glucógeno fosforilasa

conduciendo a la degradación del glucógeno. De esta manera, la activación de AMPK dependiente de metformina conduce a una menor producción de glucosa hepática. Lamentablemente, la inhibición de AMPK inducida por metformina solo se ha llegado a observar a concentraciones relativamente altas en la escala de milimolar. Sin embargo, las concentraciones de metformina en sangre que se alcanzan con dosis terapéuticas se encuentran en la escala de micromolar⁶⁴.

El segundo mecanismo que se ha reportado más recientemente es la inhibición de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2 (GPD2) dependiente de metformina. De manera similar que con AMPK, la inhibición de GPD2 conduce a una crisis energética en la célula. La GPD2 es una enzima anclada a la membrana mitocondrial interna que participa en el transporte de los electrones del NADH del citoplasma a la cadena transportadora de electrones. A través de la reducción de la catálisis de glicerol-3-fosfato (G3P) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP), la GPD2 promueve la oxidación del NADH a NAD⁺. Los electrones de la coenzima se transfieren al FAD⁺ presente en la GPD2, generando FADH₂ que, posteriormente, se oxidará de vuelta a FAD⁺ al transferir los electrones a la ubiquinona. De esta manera, al bloquear la enzima GPD2, la metformina puede inducir un incremento en la relación NADH/NAD⁺, afectando aquellas enzimas sensibles al estado redox como, por ejemplo, la lactato deshidrogenasa. Además, la inhibición de GPD2 también conduce a una acumulación de G3P, evitando su conversión a DHAP y su posterior inserción en la gluconeogénesis. Se ha reportado que la inhibición de GPD2 por la metformina puede ocurrir aun a concentraciones alcanzables con dosis terapéuticas⁶⁴.

El órgano más afectado por el mecanismo de la metformina es el hígado, pues en los hepatocitos se encuentra una gran concentración de los transportadores de metformina, los transportadores de cationes orgánicos (OCT) 1 y 3. A pH fisiológico, la metformina se encuentra cargada de manera positiva por la presencia del grupo funcional guanidinio, haciendo posible su transporte por estas proteínas. No obstante, se han identificado otros órganos que expresan los transportadores OCT incluyendo el riñón, algunas células del sistema inmune, el intestino delgado, entre otros. Así mismo se han identificado otros transportadores diferentes de los OCT, entre estos se encuentran: OCTN1, PMAT, THTR-2, SERT y MATE1⁶⁵.

1.6.1 Metformina y sus efectos sobre células cancerígenas

La metformina se ha establecido como el tratamiento por excelencia contra la diabetes mellitus tipo 2. Sin embargo, diversos estudios epidemiológicos han destacado los efectos protectores de la metformina en distintos padecimientos, uno de estos siendo el cáncer^{66,67}.

Hoy en día se conocen distintos efectos de la metformina contra múltiples sellos del cáncer. El más obvio de todos, sin lugar a duda, es su efecto sobre el metabolismo de las células cancerígenas. Para poder cumplir con una elevada proliferación, las células cancerígenas encienden programas anabólicos que permitan la generación de macromoléculas y que sustenten la división celular. Los complejos mTORC1 y mTORC2 se encargan de dirigir el crecimiento y la

proliferación, respectivamente. De esta manera, la metformina es capaz de frenar estos programas a través de la inhibición de mTORC1 dependiente de AMPK⁶⁸.

Con respecto a otros sellos del cáncer, se ha reportado la regulación negativa del sistema PD-1/PD-L1 que suele inactivar la inmunidad celular en el cáncer⁶⁹. La disminución en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad se ha considerado uno de los mecanismos de evasión de la destrucción por el sistema inmune. Se ha reportado el rescate de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad en las células tumorales, permitiendo ser identificadas por el sistema inmune⁷⁰. Debido que el factor de transcripción NF- κ B ha mostrado ser regulado negativamente por el complejo AMPK, la metformina es capaz de inducir un efecto antiinflamatorio. Esto concuerda con artículos en donde se reporta la disminución de marcadores proinflamatorios luego de la exposición a metformina⁷¹.

Otros efectos observados de la metformina continúan justificando su potencial aplicación como agente anticancerígeno. Por ejemplo, se ha reportado una mayor estabilidad en el daño a los telómeros luego de la exposición a metformina⁷²; la metformina ha llegado a disminuir las concentraciones de diferentes sustancias proangiogénicas, como VEGF, a través de la supresión del factor inducible de hipoxia 1 α ^{72,73}; el proceso de EMT se ha llegado a bloquear por la metformina que conduce a un rescate de la expresión de E-cadherina^{74,75}; y en algunos casos se ha reportado la alteración de vías de señalización proliferativas y la inducción de apoptosis en algunos modelos *in vitro*⁷⁶⁻⁷⁸.

1.7 Ciencias ómicas

Con el surgimiento de la genómica, el análisis de otros componentes de la célula más allá de la información genética no se hizo esperar. Con los avances en el proceso de hibridación de ácido nucleicos, la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida y la espectroscopia de fluorescencia se hizo posible el desarrollo de los microarreglos de ADN para estudiar el perfil transcripcional de la célula, o de manera más simple, su transcriptoma. Además, con los últimos avances en las técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas (MS) se ha hecho posible estudiar el conjunto completo de proteínas (proteoma) y metabolitos (metaboloma) de la célula. Estos avances nos permiten ser capaces de explorar los procesos de regulación transcripcionales, las cantidades relativas o absolutas de las proteínas, así como sus modificaciones postraduccionales asociadas, y las cantidades relativas o absolutas de metabolitos, generando una imagen casi completa del funcionamiento molecular de la célula. A continuación, describiremos brevemente los conceptos y aplicaciones de la transcriptómica, proteómica y metabolómica.

1.7.1 Transcriptómica

El transcriptoma es el conjunto de transcritos de ARN (codificantes y no codificantes) en la célula bajo una serie de circunstancias dadas. Todas aquellas

técnicas y métodos dirigidos hacia el estudio del transcriptoma se denominan en conjunto transcriptómica.

La transcriptómica se ha utilizado para el estudio de la regulación de la expresión génica en un sistema biológico bajo ciertas circunstancias o luego de la exposición a una perturbación. Para su estudio, la transcriptómica se vale de dos técnicas ampliamente utilizadas en la actualidad, los microarreglos de ADN y la secuenciación ARN (o RNAseq).

En los microarreglos de ADN se hace interaccionar una biblioteca de ADN complementario (ADNc) con un chip de vidrio recubierto en su superficie con secuencias de oligonucleótidos de hebra sencilla características de distintos genes. Cada grupo de secuencias idénticas correspondientes a un gen se encuentran en un pocillo presente en una zona del chip determinada. Si existiera complementariedad, los ADNc generarían duplex con las secuencias del chip, esta etapa se conoce como la hibridación. Para poder cuantificar la unión de los ADNc al chip de ADN, estos se marcan con fluoróforos previo a la hibridación. De esta manera, la emisión de fluorescencia en un pocillo determinado se traduce en la presencia de transcritos para ese gen. Dependiendo de la cantidad de genes presentes en el chip, la transcriptómica puede ser más o menos extensa. Una limitante de los microarreglos es que solo permiten detectar la presencia de transcritos conocidos. Además, su sensibilidad es inferior a los métodos de secuenciación⁷⁹.

La secuenciación de ARN hace uso de la tecnología de secuenciación de nueva generación desarrollada inicialmente para el estudio del ADN. Este tipo de

tecnología se caracteriza por miniaturizar el proceso de secuenciación en microplacas, y empleando la PCR en una de dos variedades, PCR en emulsión o PCR en puente, utilizando primers y nucleótidos trifosfatados que emiten una señal medible luego de incorporarse a la hebra en crecimiento. Por ejemplo, en la pirosecuenciación se emite luz, la secuenciación ilumina se emite fluorescencia, en la secuenciación ion torrent se miden cambios en el pH, etc. La secuenciación de ARN se caracteriza por tener una gran sensibilidad y la capacidad de identificar transcritos no conocidos⁸⁰.

1.7.2 Proteómica

El proteoma es el conjunto de proteínas nativas o modificadas postraduccionalmente en la célula, organelos o secreciones celulares bajo una serie de circunstancias dadas. Todas aquellas técnicas y métodos dirigidos hacia el estudio del proteoma se denominan en conjunto proteómica.

La proteómica se ha utilizado para estudiar el componente funcional de la célula, es decir, las proteínas. Al conocer las alteraciones en la presencia o concentración absoluta o relativa de diferentes proteínas luego de una perturbación a un sistema biológico es posible entender los mecanismos que operan detrás de esta o la manera en la que el sistema responde. El nivel de detalle al que se puede aspirar con la proteómica es muy elevado, pudiendo ser capaces de identificar cambios de conformaciones o modificaciones postraduccionales en las proteínas, generando un mayor entendimiento de la

regulación a nivel proteico. Además, en los últimos años la proteómica se ha utilizado para generar firmas proteicas con potencial de ser usadas como biomarcadores para el diagnóstico o prognosis de enfermedades.

El auge de la proteómica se dio a partir de los años 80 con el desarrollo de la ionización por electrospray (ESI) y la ionización por desorción laser asistida por matriz (MALDI) donde surgió la capacidad de ionizar proteínas y poder ser analizadas por espectrometría de masas⁸¹. La espectrometría de masas es una técnica analítica muy sensible que se fundamenta en la generación de iones, su posterior separación basada en su radio masa/carga (m/z), y su detección. Un espectrómetro de masas está compuesto por cuatro componentes básicos: 1) un sistema de inyección, 2) una fuente de ionización, 3) un analizador de masas y 4) un detector. El analizador de masas se encarga de la separación de los iones basada en su m/z , siendo esta la etapa clave para asegurar una buena resolución en la técnica⁸².

El éxito de la espectrometría de masas como técnica analítica se dio con el acoplamiento de la cromatografía de gases y de líquidos como técnicas de separación previas al análisis por espectrometría de masas. No obstante, debido a su baja volatilidad, las proteínas no son candidatas para someter a cromatografía de gases, y el terreno de la proteómica está dominado por la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). Durante la técnica de HPLC se hace pasar la muestra por una columna que contiene partículas pequeñas de diferentes materiales, polares o no polares, que en conjunto se denominan fase estacionaria. Para promover el avance de la

muestra por la columna se utiliza una mezcla de solventes que se denominará fase móvil. La separación en la cromatografía de líquidos se da por la competencia de interacciones de los analitos de la muestra con las partículas de la fase estacionaria o las moléculas de la fase móvil. Por ejemplo, un analito que interactúe más fuertemente con la fase móvil que la fase estacionaria se retendrá por poco tiempo en la columna y eluirá rápidamente. Por otro lado, un analito que interactúe más fuertemente con la fase estacionaria que la fase móvil se retendrá más tiempo en la columna y eluirá lentamente. El tamaño de partícula tan pequeño de las columnas permite una mayor área superficial para interactuar con los analitos. No obstante, el flujo disminuye y la cromatografía tomaría largos períodos de tiempo. Por este motivo, en el HPLC se utilizan presiones altas para promover un flujo alto y disminuir los tiempos de la técnica. Cuando se acoplan la HPLC y la espectrometría de masas (HPLC-MS), esta última técnica funge como su detector⁸³.

1.7.3 Metabolómica

El metaboloma es el conjunto de metabolitos de bajo peso molecular presente en la célula, organelos o secreciones celulares bajo una serie de circunstancias dadas. Todas aquellas técnicas y métodos dirigidos hacia el estudio del proteoma se denominan en conjunto metabolómica.

La metabolómica se ha utilizado para estudiar el metabolismo de la célula, ya no a nivel de maquinaria como en la proteómica, sino en su nivel más básico,

analizando la presencia y concentración de metabolitos, siendo estos los bloques de construcción, fuentes de energía y mensajeros de la célula. Al igual que con la proteómica, con la metabolómica se han llegado a generar firmas metabólicas que pudieran ser útiles en el diagnóstico y prognosis de enfermedades.

Las técnicas híbridas dominan el campo de la metabolómica, manteniendo constante la espectrometría de masas como técnica de detección y cuantificación, pero variando entre electroforesis capilar (CE-MS), cromatografía de gases (GC-MS) o cromatografía de líquidos (HPLC-MS) como posibles técnicas de separación. Cada técnica híbrida tiene sus ventajas y desventajas y, en general, lo ideal es hacer uso de todas para obtener la imagen completa del metaboloma, aunque esto no siempre es posible. Por ejemplo, la CE-MS solo puede llegar a manejar moléculas polares cargadas, tanto positivamente como negativamente, debido al fundamento de la electroforesis. Por otro lado, la GC-MS está limitada al análisis de compuestos pequeños volátiles, mientras que la HPLC-MS puede llegar a analizar moléculas polares o no polares, volátiles o no volátiles debido a su capacidad de utilizar columnas polares y fases móviles no polares (fase normal) o columnas no polares y fases móviles polares (fase reversa). A pesar de su mayor espectro de análisis, la HPLC-MS tiene ciertas desventajas con respecto a la GC-MS, y es que esta última presenta mejores eficiencias de separación debido al empleo de columnas largas (aproximadamente 8 – 10 metros)⁸³.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Estudios ómicos de la senescencia

La senescencia se ha venido estudiando a lo largo del tiempo en los distintos niveles ómicos. No obstante, los primeros estudios se dieron en el campo de la transcriptómica pues las técnicas de microarreglos y secuenciación lo permitieron. No fue hasta que la tecnología de cromatografía y espectrometría de masas aumento significativamente como para analizar biomoléculas que la senescencia comenzó a estudiarse más exhaustivamente a nivel proteómico y metabolómico.

A nivel transcriptómico, se ha evaluado la expresión diferencial de células senescentes de distintas líneas celulares y/o inducidas por diferentes estímulos, incluyendo el acortamiento de telómeros durante la senescencia replicativa, la exposición a radiación ionizante, la exposición a agentes antineoplásicos y sobreexpresión de oncogenes.

En 2019, empleando la secuenciación de ARN, Casella *et al.* reportaron que las diferencias más significativas entre distintos grupos de células senescentes

estaban influenciadas más fuertemente por el fenotipo de la línea celular, es decir, células endoteliales vs fibroblastos, y en menor grado por el estímulo inductor (acortamiento de telómeros vs exposición a radiación ionizante vs exposición a doxorubicina vs sobreexpresión de RAS). Además, analizando el solapamiento de genes regulados a la baja y al alta en los distintos modelos de senescencia, fueron capaces de identificar una firma de transcritos útil para la identificación de senescencia. Entre estos genes se encontraban MCUB, PTMA, HIST1H1D e HIST1H1A como transcritos regulados a la baja; y SRPX, PURPL, PTCHD4 y STAT1 como transcritos regulados al alta⁸⁴.

A nivel proteómico, se ha observado una correlación con lo mencionado anteriormente. En 2020, Marques *et al.* reportaron la regulación a la baja de proteínas implicadas en la traducción, biosíntesis y reparación de ácidos nucleicos, y degradación de proteínas en un modelo de senescencia de células de la microglía senescentes inducidas por exposición a doxorubicina. Además, se observó el incremento esperado en la concentración de citocinas proinflamatorias característico del SASP, incluyendo IL-6, IL-8, TNF- α , y GRO- α ⁸⁵.

Continuando con el nivel más bajo en los estudios ómicos, es decir, la metabolómica, se han identificado alteraciones en todo el metabolismo de las células senescentes. Por ejemplo, James *et al.* identificaron alteraciones en el metabolismo de aminoácidos, lípidos, nucleótidos, el sistema redox, y el metabolismo del triptófano y el NAD⁺, en células con senescencia replicativa. Dentro de estas se pueden destacar la presencia de marcadores de peroxidación

lipídica a nivel de membrana; la disminución y aumento de ácidos grasos poliinsaturados y ácidos conjugados a L-carnitina, respectivamente; y el mantenimiento de los niveles de NAD⁺ pero a expensas del incremento y disminución de diferentes metabolitos del metabolismo del triptófano y NAD⁺ como, por ejemplo, L-quinurenina y nicotinato, respectivamente⁸⁶. Siguiendo con esta misma línea, Quijano *et al.* que reportaron un aumento de la oxidación de lípidos en células senescentes inducidas por sobreexpresión de RAS. Esto se confirmó a través de la atenuación de este fenómeno por la inhibición farmacológica o antisentido de carnitina palmitoil transferasa ¹⁸⁷. Con respecto al metabolismo del NAD⁺, en 2020, Sun *et al.* reportaron la desregulación del metabolismo de NAD⁺ en respuesta al acortamiento de telómeros en un modelo de fibroblastos de disqueratosis congénita, una condición en la cual se hayan mutaciones en genes implicados en el mantenimiento del telómero. Como parte de la desregulación, se identificó una mayor actividad de la enzima NADasa así como una menor actividad de las poli(ADP-ribosa) polimerasa y SIRT1, esto condujo a la alteración mitocondrial. Estos cambios se revirtieron con la suplementación del ribosido de nicotamida⁸⁸.

Por otro lado, en el análisis del secretoma de las células senescentes se han obtenido resultados que concuerdan con aquellos obtenidos en análisis transcriptómicos. Por ejemplo, en 2020, Basisty *et al.* analizaron el proteoma de diferentes modelos de senescencia, epiteliales y mesenquimales, obtenidos por inducción con diversos estímulos, incluyendo sobreexpresión de RAS, exposición a radiación ionizante o atazanavir. De estos modelos se observó que el proteoma

presente en el medio condicionado de senescencia se alteraba dependiendo del fenotipo y el estímulo inductor de senescencia, siendo los fibroblastos (fenotipo mesenquimal) los más afectados en las condiciones. Además, se identificó que gran parte de los cambios proteómicos en el secretoma de los fibroblastos estaban relacionados con el aumento de proteínas implicadas en la regulación de la glucólisis y gluconeogénesis; con la regulación de IGF y sus proteínas transportadoras (IGFBPs); señalización de especies reactivas de oxígeno; degradación de la matriz extracelular; señalización oncogénica a través de las MAP, la respuesta a las proteínas no plegadas; y la apoptosis. Finalmente, el grupo de investigación demostró la presencia de los patrones moleculares asociados a daño (DAMP, por sus siglas en inglés) HMGB1 y CALR, así como un enriquecimiento del secretoma en factores asociados a la inflamación como quimiocinas (por ejemplo, CXCL5 y CCL3)⁸⁹.

Algunos grupos de investigación han demostrado la alteración del secretoma de las células senescentes en respuesta a cambios metabólicos. Por ejemplo, en 2019, Nacarelli *et al.*, a través de diversos ensayos *in vitro* e *in vivo*, demostraron que los principales componentes proinflamatorios del secretoma de células senescentes, como IL-6 e IL-8, aumentaban en respuesta a la suplementación con precursores del NAD⁺. Además, identificaron a la nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT, por sus siglas en inglés) como un regulador clave que favorece un secretoma inflamatorio. Un mecanismo planteado por los autores para los fenómenos observados fue la activación de NF-κB debido a la

supresión dependiente de NAD⁺ de los efectos inhibidores de AMPK inducidos por p53 sobre la vía de señalización p38 MAPK⁹⁰.

2.2 Metformina y su papel en la senescencia

El estudio de la metformina sobre células senescentes ya se ha llevado a cabo previamente, aunque solo se cuenta con pocos reportes acerca de sus efectos y estas descripciones tienen limitaciones graves, por lo tanto, todavía queda mucho por descubrir en este campo de investigación.

En 2013, Moiseeva *et al.* reportaron que la metformina, a nivel transcripcional, inducía la supresión de genes relacionados a la inmunidad y el metabolismo en fibroblastos senescentes inducidos por sobreexpresión de RAS. La metformina indujo una menor expresión de citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-6, IL-8, IL-1 β , CXCL5, CXCL10, CXCL1, CCL20, entre otros. En cuanto a los genes del metabolismo, se observó una menor expresión de la quinureninasa y la quinolinato fosforribosiltransferasa (QPRT, por sus siglas en inglés), enzimas clave en la síntesis de novo de NAD⁺. Sin embargo, el principal hallazgo fue la inhibición del factor NF- κ B luego de la exposición de las células senescentes a metformina (3 mM) por mecanismos independientes de AMPK⁹¹.

Por otro lado, en 2021, Acar *et al.* analizaron los efectos de la metformina sobre el proteoma de células estromales mesenquimales senescentes. Las células estromales son un grupo de células que se caracterizan por dar “mantenimiento” a los tejidos. Como parte de sus resultados, se reportó la modulación de la

señalización adrenérgica, el sistema de detoxificación y la vía de degradación del aspartato. Algunos de los factores de transcripción que mediaban estos efectos fueron CEBPA, TP53, y USF1. En este estudio, las concentraciones de metformina que se utilizaron fueron 3, 6 y 9 mM⁹².

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Justificación

Con base en toda la introducción y los antecedentes expuestos previamente se puede llegar a algunos puntos en concreto. El primero de estos es que el estudio de la senescencia aún se encuentra en sus primeros pasos, a pesar de que el fenómeno se describió formalmente por primera vez en 1961. Segundo, la relevancia del estudio de la senescencia comienza a destacar más, especialmente por su relación con las enfermedades crónicas, incluyendo a la enfermedad insignia de este proyecto, el cáncer. Tercero, a pesar de los reportes acerca del estudio transcriptómico de la senescencia o del fenotipo secretor asociado a senescencia a nivel proteómico o metabolómico, existen pocos reportes de un enfoque multi-ómico que permitan establecer conexiones acerca de la regulación y metabolismo de las células senescentes. Cuarto, los estudios de células senescentes empleando metformina presentan limitaciones, pues las concentraciones que se utilizan suelen ser inalcanzables con dosis terapéuticas estándar. Quinto, el mecanismo de acción de la metformina está lejos de estar completamente elucidado, y el estudio de sus efectos moleculares en un modelo

de senescencia podría generar nuevas propuestas que conduzcan a un mejor entendimiento. Por este motivo, en el presente proyecto se planteó estudiar el impacto que tiene la metformina como un posible agente senomórfico en un modelo de fibroblastos senescentes inducidos por exposición a un agente quimioterapéutico. Todo esto al emplear la metformina a concentraciones capaces de ser alcanzadas con dosis terapéuticas estándar, y empleando un enfoque multi-ómico que nos permitió identificar los efectos de la metformina a nivel transcriptómico en las células senescentes, y como estos se reflejaron en su secretoma a nivel proteómico y metabolómico. Además, con el objetivo de simular cual sería la contribución del secretoma proveniente de células senescentes tratadas con metformina sobre células cancerígenas, se planeó llevar a cabo un análisis transcriptómico en células MCF- 7 expuestas a los diferentes medios condicionados de senescencia que se obtengan. Por último, se planteó contribuir a la elucidación del mecanismo de acción de la metformina a través del establecimiento de una nueva propuesta de mecanismo de acción de está empleando una metodología computacional que pueda ser sustentada o refutada de manera experimental con los resultados del presente proyecto.

3.2 Hipótesis

La metformina modulará el transcriptoma de los fibroblastos senescentes y su secretoma a nivel proteómico y metabolómico, de manera significativa,

conduciendo a una disminución de los genes asociados a la malignidad de las células MCF-7, al exponerse a estos.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo general

Evaluar el transcriptoma de fibroblastos senescentes y su secretoma a nivel proteómico y metabolómico, en respuesta a la exposición a metformina, así como el transcriptoma de las células MCF-7 expuestas al secretoma de fibroblastos senescentes, o no senescentes, tratados o no con metformina. Además, proponer un posible mecanismo de acción de la metformina siguiendo una metodología computacional, y sustentarlo con la evidencia experimental obtenida en el presente proyecto.

3.3.2 Objetivos específicos

- Inducir senescencia celular en una línea celular de fibroblastos.
- Validar el modelo de senescencia celular en una línea celular de fibroblastos mediante técnicas celulares.
- Validar el modelo de senescencia celular en una línea celular de fibroblastos mediante técnicas moleculares.

- Evaluar el efecto de la metformina sobre los marcadores de senescencia en una línea celular de fibroblastos.
- Recolectar los medios condicionados de senescencia de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina.
- Realizar el análisis transcriptómico de fibroblastos senescentes, o no senescentes, tratados o no con metformina.
- Realizar el análisis proteómico de los secretomas provenientes de fibroblastos senescentes, o no senescentes, tratados o no con metformina.
- Realizar el análisis metabolómico de los secretomas provenientes de fibroblastos senescentes, o no senescentes, tratados o no con metformina.
- Realizar el análisis transcriptómico de células MCF-7 expuestas a los secretomas provenientes de fibroblastos senescentes, o no senescentes, tratados o no con metformina.
- Establecer una propuesta de mecanismo de acción de la metformina empleando una metodología computacional.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1 Materiales

Los materiales utilizados en el proyecto se dividieron en tres grandes categorías. Estas se muestran a continuación en las siguientes tablas, y se mencionan los materiales con su respectiva aplicación.

Tabla 2. Materiales para la inducción y validación de la senescencia celular.

Nombre	Aplicación(es)
Micropipeta de 100-1000 μ L	Manejo de volúmenes de reactivos, suspensiones y soluciones.
Micropipeta de 20-200 μ L	
Micropipeta de 2-20 μ L	
Micropipeta de 0.5-10 μ L	
Puntas de micropipeta de 1000 μ L	
Puntas de micropipeta de 200 μ L	
Puntas de micropipeta de 20 μ L	
Gasas	Limpieza de la campana de flujo laminar
Papel aluminio	Protección contra la luz durante el ensayo de la β -galactosidasa.
Tubos Falcon de 15 mL	<ul style="list-style-type: none">• Subcultivos• Preparación de reactivos para ensayo de la β-galactosidasa
Vaso de precipitados de 250 mL	Baño maría para la descongelación de células.

Tabla 3. Materiales para el establecimiento del modelo computacional de un posible mecanismo de acción de la metformina.

Nombre	Aplicación(es)
UCSF Chimera	Modelado molecular de proteínas y ligandos de bajo peso molecular.
Avogadro	Dinámica molecular de ligandos de bajo peso molecular.
AutoDock 4.2	Acoplamiento molecular entre proteínas y ligandos de bajo peso molecular.
AutoDock Tools	
R Project versión 4.2.2	<ul style="list-style-type: none"> • Análisis de componentes principales • Agrupamientos jerárquicos
RStudio	
Paquete tidyverse	
Paquete factoextra	
Paquete ggplot2	
Paquete ggcorrplot	
Paquete readr	
Paquete cluster	
Swiss ADME	Predicción de propiedades fisicoquímicas de moléculas
Swiss Target Prediction	Predicción basada en estructura de dianas farmacológicas
Protein Data Bank	Base de datos de archivos de proteínas cristalizadas
Uniprot	Base de datos de información estructural y funcional de proteínas
Protein Plus	Predicción de sitios de unión de ligandos en dianas farmacológicas

Tabla 4. Materiales para la implementación de las técnicas ómicas en la caracterización de la senescencia y su fenotipo secretor asociado a senescencia.

Nombre	Aplicación(es)
Línea celular de fibroblastos IMR90	Obtención de los distintos secretomas provenientes de fibroblastos senescentes o no, tratados con metformina
Cajas Petri de 35 mm	
Frascos de células de 25 cm ²	
Cámara de Neubauer	
Pipetas Pasteur de vidrio	
Filtros de 0.2 µm de baja unión a proteínas	Remoción de partículas y/o restos celulares de los secretomas

Tubos Amikon Ultra de 15 mL de 3 kDa	Concentración de proteínas de los secretomas colectados
Tubos Eppendorf de 2.5 mL	Almacenamiento en alícuotas de los secretomas colectados

Tabla 5. Materiales para evaluación de los efectos del fenotipo secretor asociado a senescencia sobre células cancerígenas.

Nombre	Aplicación(es)
Línea celular de cáncer de mama MCF-7	<ul style="list-style-type: none"> Evaluación de los efectos de los distintos secretomas colectados sobre el transcriptoma de células cancerígenas.
Frascos de células de 25 cm ²	
Cajas Petri de 35 mm	
Cámara de Neubauer	
Pipetas Pasteur de vidrio	

4.2 Reactivos

Los reactivos utilizados en el proyecto se dividieron en tres grandes categorías. Estas se muestran a continuación en las siguientes tablas, y se mencionan los materiales específicos con su respectiva aplicación.

Tabla 6. Reactivos para la inducción y validación de la senescencia celular.

Nombre	Aplicación(es)
Mitomicina C	Inducción de senescencia mediante exposición a mitomicina C
Hidrocloruro de metformina	Evaluación del efecto de la metformina sobre el desarrollo de senescencia en fibroblastos expuestos a mitomicina C
Suero fetal bovino	Suplementación de medios de cultivo
Tripsina-EDTA	Subcultivo de células
Medio de cultivo esencial mínimo de Eagle con modificación de Dulbecco	Descongelación, crecimiento y ejecución de ensayos en células
Medio de cultivo esencial mínimo de Eagle	
Cloruro de potasio	Preparación de PBS
Cloruro de sodio	
Fosfato dibásico de sodio	

Fosfato monopotásico	
Ácido clorhídrico	Ajuste de pH de diferentes soluciones
Hidróxido de sodio	
Kit de evaluación de actividad de β -galactosidasa	Evaluación de la inducción de senescencia por técnicas celulares
Mezcla maestra Power Up SYBR Green	Evaluación de la inducción de senescencia por técnicas moleculares
Transcriptasa reversa Superscript IV	
Par de oligonucleótidos dirigidos al gen CDKN1A	
Par de oligonucleótidos dirigidos al gen CDKN2A	
Par de oligonucleótidos dirigidos al gen 18S	
Par de oligonucleótidos dirigidos al gen IL-6	

Tabla 7. Reactivos para la implementación de las técnicas ómicas en la caracterización de la senescencia y su fenotipo secretor asociado a senescencia.

Nombre	Aplicación(es)
Inhibidor de proteasas cOmplete libre de EDTA	Recolección y procesamiento de los medios condicionados de senescencia
TRizol	Extracción de ARN
Agarosa	Electroforesis en gel de ARN
Urea	Solubilización de proteínas

Tabla 8. Reactivos para evaluación de los efectos del fenotipo secretor asociado a senescencia sobre células cancerígenas.

Nombre	Aplicación(es)
Suero fetal bovino	Suplementación de medios de cultivo
Tripsina-EDTA	Subcultivo de células
Medio de cultivo esencial mínimo de Eagle con modificación de Dulbecco	Descongelación, crecimiento y ejecución de ensayos en células
Medio de cultivo esencial mínimo de Eagle	
Cloruro de potasio	Preparación de PBS
Cloruro de sodio	
Fosfato dibásico de sodio	
Fosfato monopotásico	
Ácido clorhídrico	Ajuste de pH de diferentes soluciones
Hidróxido de sodio	
TRizol	Extracción de ARN
Agarosa	Electroforesis en gel de ARN

4.3 Equipos

Los equipos utilizados en el proyecto se dividieron en tres grandes categorías. Estas se muestran a continuación en las siguientes tablas, y se mencionan los materiales con su respectiva aplicación.

Tabla 9. Equipos para la inducción y validación de la senescencia celular.

Nombre	Aplicación(es)
Microscopio óptico	Visualización de cultivos de IMR90
Campana de flujo laminar	<ul style="list-style-type: none"> • Manejo de cultivos de IMR90 • Inducción de senescencia por exposición a mitomicina C • Extracción de ARN • Ensayo de la β-galactosidasa
Incubadora de CO ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Mantenimiento de cultivos de IMR90 en crecimiento • Inducción de senescencia por exposición a mitomicina C
Congelador de 4°C	Almacenamiento de medios de cultivo o reactivos empleados en ensayos celulares y/o moleculares
Congelador de -20°C	<ul style="list-style-type: none"> • Almacenamiento de reactivos empleados en el cultivo de células o en ensayos celulares y/o moleculares • Almacenamiento de ARN extraído
Congelador de -80°C	Almacenamiento de líneas celulares
Balanza analítica	Pesaje de sustancias químicas y/o medios de cultivo en polvo

Cámara de electroforesis	Análisis de la integridad del ARN total extraído de células IMR90 para las PCR cuantitativas
Termociclador para PCR cuantitativa	Validación de senescencia por técnicas moleculares

Tabla 10. Equipos para la implementación de las técnicas ómicas en la caracterización de la senescencia y su fenotipo secretor asociado a senescencia.

Nombre	Aplicación(es)
Campana de flujo laminar	<ul style="list-style-type: none"> • Recolección de los medios condicionados de senescencia • Concentración de proteínas • Extracción de ARN
Congelador de -20°C	<ul style="list-style-type: none"> • Almacenamiento de ARN extraído • Almacenamiento de los secretomas colectados
Cámara de electroforesis	Análisis de la integridad del ARN total extraído de células IMR90 para microarreglos

Tabla 11. Equipos para evaluación de los efectos del fenotipo secretor asociado a senescencia sobre células cancerígenas.

Nombre	Aplicación(es)
Microscopio óptico	Visualización de cultivos de MCF-7
Campana de flujo laminar	<ul style="list-style-type: none"> • Manejo de cultivos de MCF-7
Incubadora de CO ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Mantenimiento de cultivos de MCF-7 en crecimiento
Cámara de electroforesis	Análisis de la integridad del ARN total extraído de células MCF-7 para microarreglos

4.4 Metodología experimental

Prácticamente, toda la metodología experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, perteneciente a la Universidad Autónoma de Nuevo León, y localizado en Monterrey, Nuevo León. Sin embargo, algunos objetivos como la recolección del fenotipo secretor asociado a senescencia se llevaron a cabo en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social, y localizado en Monterrey, Nuevo León.

La metodología experimental del proyecto se dividió de acuerdo con los objetivos específicos planteados previamente. A continuación, se describe la metodología por objetivo de manera detallada.

4.4.1 Inducir senescencia celular en una línea celular de fibroblastos

Se inició con la descongelación de la línea celular de fibroblastos IMR90. El proceso consistió en sumergir el criotubo hasta la mitad en un baño de agua a 37°C por dos minutos o hasta la descongelación completa. Posteriormente, se transfirió el contenido del criotubo a un tubo Falcon de 15 mL previamente llenado con 5 mL de medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y atemperado a 37°C. De aquí en adelante, cuando se

indique medio EMEM siempre estará suplementado con SFB al 10% a menos que se indique lo contrario. Luego de esto, se llevó el tubo Falcon a centrifugar a 1300 rpm por 10 minutos. Una vez finalizado el tiempo de centrifugación, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células con 1 mL de medio EMEM. Finalmente, se transfirió la suspensión de células a un frasco de cultivo de 25 cm² previamente llenado con 2 mL de medio EMEM, se mezcló la suspensión en el frasco y se llevó a incubar por 24 horas a 37°C con 5% de CO₂.

A las 24 horas, las células se subcultivaron en 2 frascos para evitar el 100% de confluencia. El proceso para llevar a cabo el subcultivo inició con el retiro del medio de cultivo empleando una pipeta Pasteur y un sistema de vacío. Luego de esto, se agregaron 3 mL de buffer de fosfatos salino (PBS, por sus siglas en inglés) al frasco de cultivo, se mezcló el frasco y se retiró el PBS, nuevamente empleando una pipeta Pasteur. Posteriormente, se agregaron 500 µL de solución tripsina-EDTA 0.25% al frasco, se mezcló ligeramente y se llevó a incubar a 37°C con 5% de CO₂ por 5 minutos. Una vez finalizado el tiempo de espera, se llevó el frasco al microscopio para confirmar la tripsinización de las células. En caso de un resultado positivo, al frasco se le agregó 1 mL de medio EMEM para inactivar la solución de tripsina y se resuspendió la mezcla. Luego de esto, se transfirió la suspensión a un tubo Falcon de 15 mL y se llevó a centrifugar a 1300 rpm por 10 minutos. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se agregaron 2 mL de medio EMEM al tubo y se resuspendió el pellet de células. Se tomó una alícuota de 20 µL de dicha suspensión, se contaron las células en ambas cámaras de la cámara de Neubauer en la zona de leucocitos, y se calculó el número de células

considerando los factores de dilución apropiados. Finalmente, se transfirió la densidad celular deseada a nuevos frascos de cultivo previamente llenados con medio EMEM, y estos se llevaron a incubar a 37°C con 5% de CO₂.

Cada día se revisaron los frascos de cultivo en caso de que se requiriera un cambio de medio. Usualmente, estos se llevaron a cabo cada 3 días, aunque esto dependía de la densidad celular utilizada. El procedimiento para llevar a cabo el cambio de medio consistió en la remoción del medio de cultivo con una pipeta Pasteur y el sistema de vacío. Luego de esto, se agregaron 3 mL de medio de cultivo EMEM fresco a cada frasco y estos se llevaron a incubar a 37°C con 5% de CO₂.

Las células IMR90 se cultivaron por hasta 3 subcultivos con el objetivo de establecer una población de fibroblastos más homogénea en su capacidad de proliferación. Una vez alcanzados los 3 subcultivos, se inició con el procedimiento de inducción de senescencia por exposición a mitomicina C (MMC).

Previo a la inducción de senescencia, se preparó una solución stock disolviendo 2 mg de mitomicina C en 2 mL obteniendo una concentración de 1000 µg/mL. La solución madre preparada se filtró empleando filtros de 0.2 µm para eliminar posibles partículas y se almacenó a 4°C, esto debido a que se ha reportado el mantenimiento de hasta el 90% de su actividad por 3 meses cuando se almacena en estas condiciones⁹³. Para los ensayos de inducción de senescencia se decidió emplear la MMC a una concentración de 0.5 µg/mL basándonos en las concentraciones utilizadas (1-0.01 µg/mL) por otros autores en la literatura, donde emplean MMC para el mismo propósito^{19,94}.

Los ensayos de inducción de senescencia por exposición a MMC se llevaron a cabo partiendo de cultivos de fibroblastos IMR90 a una densidad celular de 180,000 células por caja Petri (35 mm). A los fibroblastos se les retiró el medio de cultivo con una pipeta Pasteur y un sistema de vacío y se les agregó una solución de MMC a 0.5 µg/mL en medio EMEM hasta un volumen final de 2 mL. Luego de esto, los fibroblastos se llevaron a incubar a 37°C con 5% de CO₂. Con el objetivo de identificar las mejores condiciones de inducción de senescencia se evaluaron, por triplicado, distintos tiempos de exposición a MMC, incluyendo 24 h, 48 h, 72 h y 144 h. Al completarse el tiempo de exposición, se retiró el medio de cultivo con MMC, los cultivos fueron subcultivados en nuevas cajas Petri a diferentes densidades con medio de cultivo EMEM fresco sin MMC, dependiendo de las técnicas que se emplearían posteriormente. Finalmente, los nuevos cultivos en proceso de volverse senescentes se llevaron a incubar a 37°C con 5% de CO₂ por 48 h. Se seleccionó este tiempo debido a que los cambios transcripcionales pueden darse tanto inmediatamente, como dentro de varias horas. Para dar sustento a esta afirmación, Veloso *et al.* reportó que la tasa de transcripción de la RNA polimerasa II suele ser de 1.5 kb/min, lo que sugeriría que la transcripción de algunos genes podría tomar alrededor de 24 horas⁹⁵.

4.4.2 Validar el modelo de senescencia celular en una línea celular de fibroblastos mediante técnicas celulares

Una vez inducida la senescencia por exposición a MMC, se procedió a confirmar y, posteriormente, validar el establecimiento de senescencia con las condiciones evaluadas en el punto anterior empleando técnicas celulares. Dentro de las técnicas celulares, se encontraban el análisis de la morfología celular y el ensayo de la β -galactosidasa.

El ensayo de la β -galactosidasa ha sido el marcador de oro para la identificación de senescencia por un largo tiempo. El ensayo identifica a las células senescentes basándose en que solo este tipo de células será capaz de hidrolizar el reactivo X-Gal, liberando galactosa y al cromóforo 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol que tiñe las células de color azul (Figura 4). En concordancia con lo anterior, se ha reportado un incremento en la expresión de β -galactosidasa en las células senescentes³².

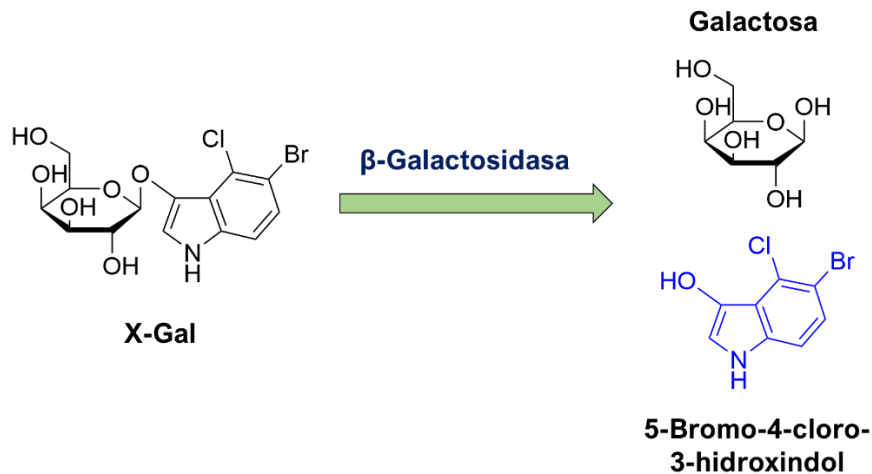


Figura 4. Fundamento químico del ensayo de la β -galactosidasa.

Partiendo de los fibroblastos presuntamente senescentes por incubación a distintos tiempos con MMC, y luego de haber pasado las 48 h de incubación post-exposición a MMC, se analizó la morfología de los cultivos en el microscopio de contraste de fases a 10X y 20X⁹⁶. Además, se llevó a cabo el ensayo de la β -galactosidasa, el estándar de oro actual para confirmar el desarrollo de senescencia⁹⁶.

El procedimiento del ensayo de la β -galactosidasa comenzó partiendo de un cultivo de células presuntamente senescentes a una densidad de 50,000 células por caja Petri. A los cultivos se les retiró el medio de cultivo y se lavaron dos veces con 1 mL de PBS. Luego de esto, se le añadió 1.5 mL de solución de fijación (perteneciente al kit del ensayo de la β -galactosidasa) a cada caja Petri. Las células se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos para promover su fijación. Posteriormente, se retiró la solución de fijación y los cultivos fijados se lavaron tres veces con 1 mL de PBS. Una vez lavados, a los cultivos se les

agregó 1 mL de la solución de tinción, se sellaron las cajas Petri con parafilm y se les cubrió con papel aluminio para evitar la exposición a la luz. Finalmente, los cultivos se incubaron a 37°C sin CO₂ por 16 horas, y luego de esto se observaron al microscopio. Se colectaron fotografías de 5 campos (centro, izquierda, derecha, superior, e inferior) en el objetivo 10X a campo claro y de contraste de fases para cada cultivo evaluado, y esto a su vez para cada triplicado. De acuerdo con lo reportado con Dimri *et al.* (1995) y para fines de este proyecto, las células que desarrollen una coloración azul o verde se consideraron positivas al ensayo y, por lo tanto, se clasificaron como senescentes³². Para analizar los resultados se determinó el porcentaje (%) de senescencia de cada campo y se promediaron los 5 campos contados para cada cultivo evaluado. Para determinar el porcentaje de senescencia se empleó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Senescencia} = \frac{\text{Células senescentes por campo}}{\text{Células totales por campo}} \times 100$$

Una vez confirmada la senescencia mediante el ensayo de la β -galactosidasa, se validó el método de inducción por triplicado.

4.4.3 Validar el modelo de senescencia celular en una línea celular de fibroblastos mediante técnicas moleculares

Una vez identificado el tiempo óptimo de exposición a MMC para la inducción de senescencia empleando el ensayo de la β -galactosidasa, se procedió a confirmar y, posteriormente, validar el establecimiento de senescencia empleando la PCR cuantitativa para medir la expresión de marcadores de senescencia.

La confirmación por PCR cuantitativa comenzó con la extracción de ARN total de células presuntamente senescentes empleando el método del TRIzol. Este comenzó con la remoción del medio de cultivo de las cajas Petri y la adición de 500 μ L de TRIzol a estas. Luego de esto, las cajas se agitaron vigorosamente para mejorar la lisis, la extracción de ARN y la inactivación de las posibles RNasas intracelulares. El lisado celular se transfirió a un tubo Eppendorf de 2.5 mL y se dejó en reposo entre 3-5 minutos. Se agregaron 100 μ L de CHCl_3 y se agitó por inversión por 30 s para luego dejarse en reposo por 2-3 minutos. Luego de esto, el tubo Eppendorf se llevó a centrifugar a 12,000 x g por 15 minutos. Esto promovió la generación de dos fases en el tubo Eppendorf. De vuelta en la campana de extracción, se recolectó la fase acuosa (superior) y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 2.5 mL. Se agregaron 250 μ L de isopropanol al tubo y se mezcló por inversión por 30 s, y en vortex por 10-15 s. Luego de esto, el tubo se llevó a centrifugar a 12,000 x g por 10 minutos para promover la precipitación y formación de un pellet de ARN. De vuelta en la campana, se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 μ L de EtOH al 70%, incluyendo una serie

de pasos de disgregación del pellet y agitación en vortex por 10-15 s. Posteriormente, el tubo se llevó a centrifugar a 7,500 x g por 5 minutos. El proceso del lavado se repitió hasta completar 3 lavados. Una vez finalizada la etapa del lavado, se removió el sobrenadante y el pellet se dejó secar destapado por 5-10 minutos, cuidando que este no se seque por completo. Finalmente, se disolvió el pellet en 50 µL de H₂O libre de RNasas, y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Para analizar la integridad del ARN total extraído, se tomó una alícuota de 6 µL de la solución final que se obtuvo previamente, y se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 2% empleando 3 µL de buffer de carga y 6 µL de red gel. El gel se corrió empleando un voltaje de 70 V por 5 minutos y, posteriormente, 110 V por 35 minutos. Al finalizar, el gel se llevó al fotodocumentador para analizar las bandas de los ARN ribosomales.

Para analizar la pureza y concentración del ARN total extraído, se tomó una alícuota de 2 µL y se colocó en el NanoDrop 2000, un espectrofotómetro especializado para el análisis rápido y en microescala de ácidos nucleicos y proteínas. Previo a la lectura de la muestra de ARN total, se colocaron como blanco 2 µL del agua libre de RNasas que se empleó para disolver el ARN en el paso final de la extracción. Una vez leída la muestra de ARN, se recolectaron tres parámetros: concentración, radio A260/A280 y radio A260/A230. Los últimos dos parámetros nos indican la posible contaminación de nuestra muestra con proteínas y compuestos orgánicos de bajo peso molecular (fenol, sales, entre otros), respectivamente.

Una vez analizado el ARN total en términos de pureza e integridad, se prosiguió con la generación de ADN complementario (ADNc) de manera previa a la PCR cuantitativa. El procedimiento para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción comenzó con la adición de 0.5 μL de solución Oligo d(T)₂₀ (50 μM), 0.5 μL de hexámeros aleatorios (50 ng/dL), 1 μL de solución de nucleótidos trifosfatados (10 mM), de 1 hasta 11 μL de solución de ARN de interés, y agua libre de RNasas hasta completar un volumen de 13 μL . Luego de adicionar estos componentes, se mezcló el tubo de PCR en un vortex por 10 s y se centrifugó a 12,000 x g por 20 s. Posteriormente, se calentó el tubo de PCR en un baño de agua a 65°C por 5 minutos, y después se enfrió en baño de hielo por 1 minuto. Mientras progresaban estos tiempos de incubación, en otro tubo de PCR se adicionaron 4 μL de buffer SSIV 5X, 1 μL de DTT (100 mM), 1 μL de inhibidor de RNasas y 1 μL de enzimas Super Script IV (200 UI/ μL). Este segundo tubo se mezcló en vortex por 10 s, se centrifugó a 12,000 x g por 20 s, y finalmente se mezcló con el primer tubo luego de finalizar el tiempo de incubación. Posteriormente, el tubo de reacción se llevó a incubar al termociclador. Primero, se incubó a 23°C por 10 minutos. Segundo, se incubó a 55°C por 10 minutos. Y tercero, se incubó a 80°C por 10 minutos. Finalmente, se agregó 1 μL de RNasa H para eliminar al ARN total y el tubo se incubó por última vez a 37°C por 20 minutos más. La mezcla de reacción se almacenó a -20°C hasta su uso.

Una vez obtenida la mezcla de reacción que contiene la biblioteca de ADN complementarios (ADNc) de las células presuntamente senescentes, se llevó a cabo la PCR cuantitativa empleando como marcadores de senescencia a los

genes *CDKN1A*, *CDKN2A*, e *IL6*. Asimismo, se empleó el gen *18S* como gen constitutivo para normalizar la expresión génica del resto (Tabla 12). Para llevar a cabo cada reacción, el procedimiento comenzó con la adición de 5 μL de la mezcla maestra de reacción PowerUp SYBR Green 5X, 1 μL de solución de primer forward (3 mM), 1 μL de solución de primer reverse (3 mM), 1-3 μL de la mezcla de reacción obtenida en el paso anterior, y agua grado molecular hasta completar 10 μL de volumen final de reacción. Cada reacción se preparó y se llevó a incubar al termociclador. Primero, se incubó a 50°C por 2 minutos como un paso de activación de la mezcla maestra de reacción. Segundo, se incubó a 95°C por 2 minutos para promover la desnaturalización completa de los distintos ADNc moldes. Tercero, se incubó a 95°C por 15 s y 60°C por 1 minuto, repitiéndose esto por 40 ciclos. En cada ejecución de PCR cuantitativa se recolectaron las curvas de fusión de las reacciones, sus curvas de amplificación y los valores de Ct. Una vez obtenidos dichos datos, se calculó la expresión génica relativa entre los grupos control y senescente empleando el método del $\Delta\Delta\text{Ct}$. Una vez confirmada la senescencia por PCR cuantitativa, se validó el método de inducción por triplicado.

El método $\Delta\Delta\text{Ct}$ se basa en la cuantificación relativa de la expresión génica entre dos grupos con diferentes condiciones. Para determinar los cambios en la expresión génica primero se obtienen los valores de Ct para cada gen evaluado en cada condición empleando la PCR cuantitativa. Una vez obtenidos los valores de Ct para los genes de interés, estos se normalizan en expresión al restarle a cada gen el valor de Ct del gen constitutivo de su condición correspondiente,

generando los valores de ΔCt de cada gen de interés. Luego de esto, se obtienen los valores de $\Delta\Delta Ct$ al restar del ΔCt de cada gen en la condición tratada el ΔCt de cada gen en la condición no tratada. El resultado se sustituye en la siguiente fórmula e indica la expresión relativa de un gen en la condición tratada con respecto a la condición no tratada.

$$\text{Expresión relativa en condición tratada vs condición no tratada} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Tabla 12. Secuencias de oligonucleótidos empleados en la cuantificación de la expresión relativa de marcadores de senescencia.

Gen	Sentido	Secuencia (5'→3')
CDKN1A	Forward	GACACCACTGGAGGGTGACT
	Reverse	CAGGTCCACATGGTCTTCCT
CDKN2A	Forward	CCAACGCACCGAATAGTTACG
	Reverse	GCGCTGCCCATCATCATG
IL6	Forward	CCGGGAACGAAAGAGAAGCT
	Reverse	GCGCTTGTGGAGAAGGAGTT
18S	Forward	CCCTATCAACTTTTCGATGGTAGTCG
	Reverse	CCAATGGATCCTCGTTAAAGGATTT

De manera similar a lo que se evaluó con las técnicas celulares, se empleó la PCR cuantitativa para determinar el periodo óptimo de incubación para el desarrollo de senescencia posterior a la exposición a MMC. El método de inducción de senescencia para todos los cultivos empleados fue el mejor tiempo de exposición a MMC obtenido en los puntos 4.4.1 y 4.4.2. Se evaluaron dos tiempos de incubación post-MMC: 48 h y 72 h. Se decidió agregar un día más al período de incubación post-MMC para evaluar si mejoraba la expresión de los

marcadores de senescencia, porque al ser un programa celular que involucra cambios epigenéticos es posible que dar más tiempo pudiera impactar positivamente en el desarrollo de células senescentes.

4.4.4. Evaluar el efecto de la metformina sobre los marcadores de senescencia en una línea celular de fibroblastos

De manera preliminar, se evaluó el efecto de la metformina sobre los fibroblastos senescentes empleando una concentración alcanzable (100 μ M) con dosis clínicas. Nuestra hipótesis sugiere que la metformina debería modular el proceso de senescencia. Por tal motivo, deberíamos observar cambios a nivel transcripcional en los marcadores de senescencia cuando a los fibroblastos senescentes se les trate con metformina.

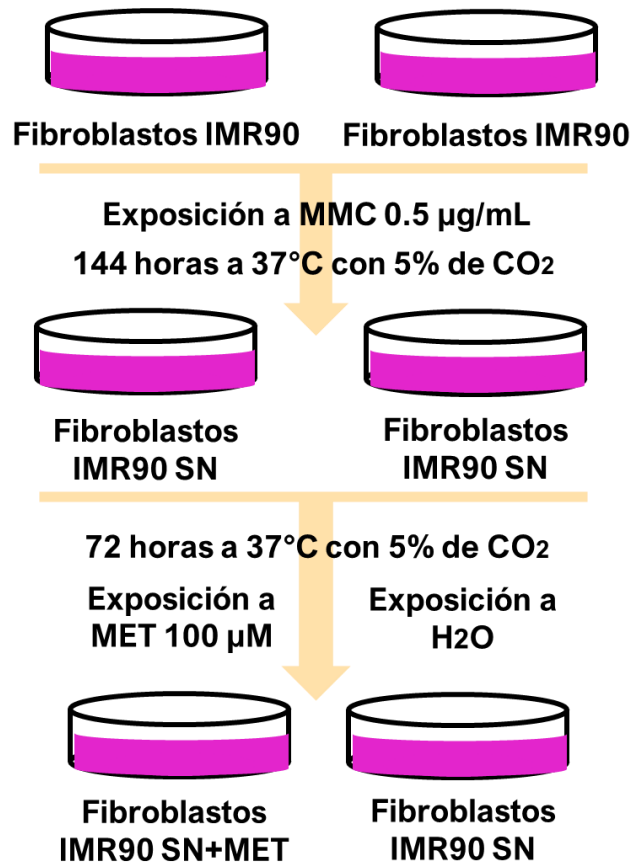


Figura 5. Diseño general del experimento planteado para la evaluación del efecto de la metformina (100 µM) sobre los marcadores moleculares de senescencia en el modelo de senescencia de IMR90 inducido por MMC.

Como se muestra en la figura 5, la evaluación del efecto de la metformina sobre los marcadores de senescencia comenzó con dos cultivos de fibroblastos sincrónicos. A cada cultivo se le indujo senescencia por medio de la metodología óptima que se elucidó en los pasos anteriores. Una vez retirada la MMC de los dos cultivos y previo al inicio de la incubación post-MMC, a uno de estos se le agregó clorhidrato de metformina hasta alcanzar una concentración final de 100 µM. Este cultivo sería el grupo senescente tratado con metformina (SN+MET) mientras que el no tratado sería el grupo senescente (SN). Luego de todo esto,

se les procedió a extraer el ARN total, a realizar la reacción de retrotranscripción y a la evaluación de los marcadores de senescencia por PCR cuantitativa para determinar los cambios en la expresión génica relativa comparando SN vs SN+M. El análisis estadístico se llevó a cabo empleando la prueba T de Student debido que la comparación se daría entre dos grupos.

4.4.5 Recolectar los medios condicionados de senescencia de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina

Una vez establecida la metodología óptima para la inducción de senescencia por exposición a MMC, esta se repitió partiendo con 3 grupos de fibroblastos, cada grupo conteniendo un triplicado. Dos grupos se expusieron a MMC 0.5 µg/mL por el tiempo de incubación óptimo determinado previamente, estos representaban a los grupos SN, y el grupo restante solo se trató con medio de cultivo y agua en lugar de MMC, representando al grupo CT. Posteriormente, se retiró la MMC de los grupos SN, y el medio con agua del grupo CT y se inició la incubación post-MMC durante el tiempo óptimo determinado previamente. Se seleccionó al azar un grupo SN, y se le agregó medio EMEM suplementado con clorhidrato de metformina hasta alcanzar una concentración final de 100 µM, representando al grupo SN+MET. A los grupos SN y CT restantes solo se les agregó medio EMEM con agua en lugar de clorhidrato de metformina, representando a los grupos SN y CT, respectivamente. A partir de este momento, se llevaron a incubar todos los cultivos a 37°C con 5% de CO₂ durante el tiempo óptimo post-MMC determinado

previamente. La figura 5 (sección 4.4.4) ilustra el diseño general de los grupos de fibroblastos IMR90 a partir de los cuales se pretendía recolectar los medios condicionados.

Como se muestra en la figura 6, al finalizar el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo de todos los cultivos y se les reemplazó por medio de cultivo EMEM sin SFB. Luego de esto, los cultivos se llevaron a incubar por 48 horas más a 37°C con 5% de CO₂. Tras finalizar el tiempo de incubación, se recolectó el medio condicionado de cada grupo en tubos Falcon de 50 mL usando la micropipeta de 1000 µL.

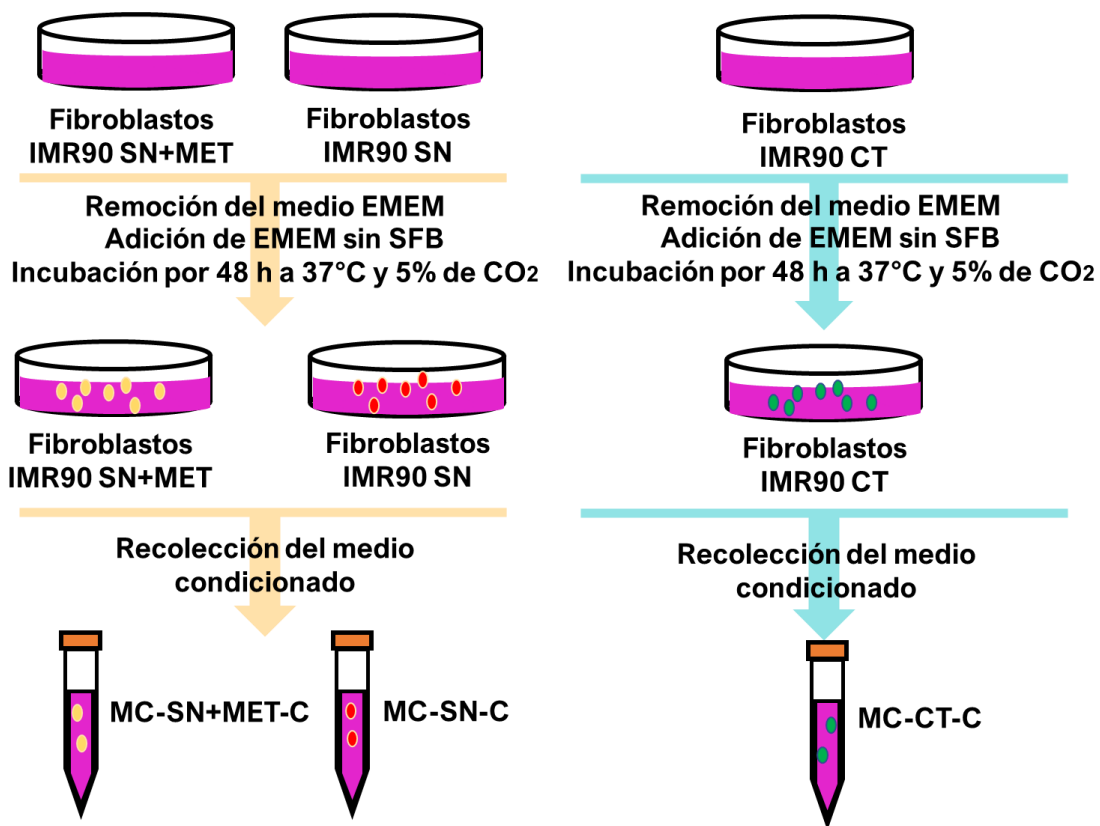


Figura 6. Diseño general del experimento planteado para la recolección de los diferentes medios condicionados a partir de los cultivos de fibroblastos IMR90 CT o SN, tratados o no con metformina.

Por último, como se muestra en la figura 7, cada medio de cultivo recolectado se filtró empleando una jeringa y un filtro de 0.2 μm de baja unión a proteínas. A cada medio condicionado se le asignó una clave de acuerdo con el grupo del cual se recolectó. Por ejemplo, a los medios condicionados provenientes de los grupos de fibroblastos senescentes tratados o no con clorhidrato de metformina se les denominó MC-SN+MET-C y MC-SN-C, respectivamente. Por otro lado, al medio condicionado proveniente del grupo de fibroblastos control se les denominó MC-CT-C. Cabe mencionar que la C que se encuentra al final de cada clave indicó que los medios condicionados todavía se encontraban completos y no habían sido separados en proteínas y metabolitos de bajo peso molecular todavía. Luego de filtrarse, los diferentes medios condicionados de senescencia se almacenaron a -20°C hasta su uso.

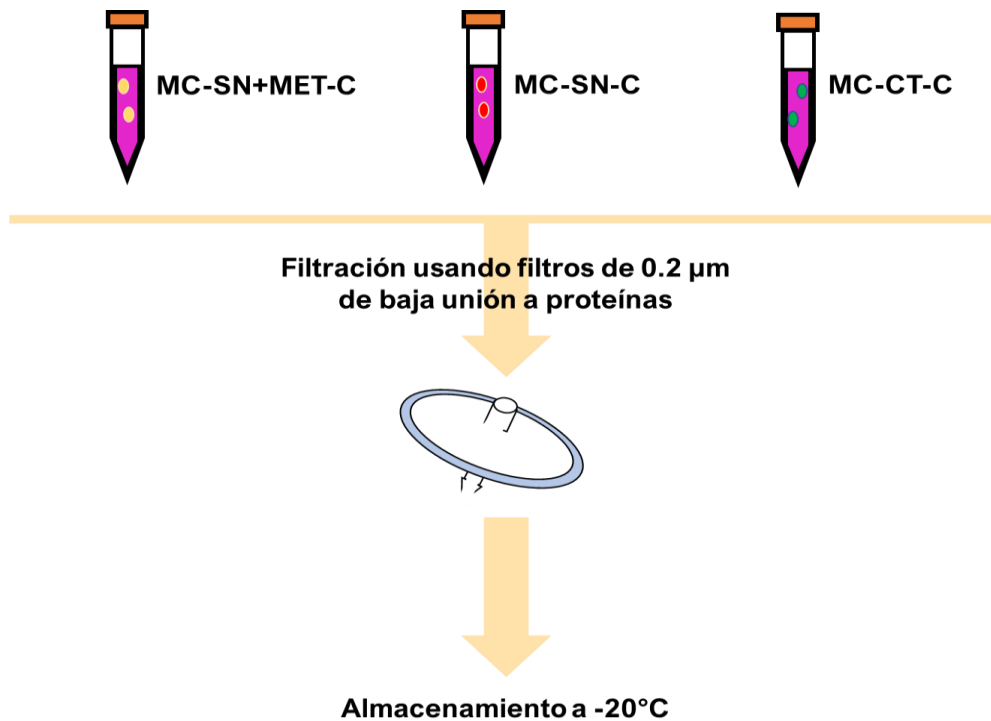


Figura 7. Filtración y almacenamiento de los diferentes medios condicionados recolectados de los fibroblastos CT o SN, tratados o no con metformina.

4.4.6 Realizar el análisis transcriptómico de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina

La realización del análisis transcriptómico de los fibroblastos senescentes tratados o no con metformina se llevó a cabo partiendo de dos grupos de fibroblastos. Estos se expusieron a MMC con la metodología óptima que se ha venido describiendo. Sin embargo, al comienzo del periodo de incubación post-MMC, uno de los grupos SN se expuso a clorhidrato de metformina a través del medio de cultivo EMEM con una concentración final de 100 µM, representando al grupo SN+MET. Por otro lado, el grupo SN restante fue tratado con medio

suplementado con agua en lugar de clorhidrato de metformina. Luego de haber finalizado el periodo de incubación post-MMC, se les retiró el medio de cultivo a los grupos y se les extrajo el ARN total como se describió previamente para la PCR cuantitativa. Los ARN totales extraídos fueron ensayados para su control de calidad en electroforesis en gel y espectrofotometría para determinar la integridad y pureza, respectivamente. Luego de dichas pruebas los ARN totales se almacenaron hasta su envío para el análisis de transcriptómica por microarreglo de ADN (Figura 8).



Figura 8. Diseño de experimentos del estudio del transcriptoma de los fibroblastos senescentes tratados o no con metformina.

Para llevar a cabo el análisis del transcriptoma, las muestras de ARN total se enviaron al servicio de microarreglos de ADN del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. El microarreglo que se adquirió (H10KA) contenía alrededor de 10,000 genes. Además, el servicio incluyó la síntesis de los ADNc, el marcaje con los fluoróforos Alexa 555 y Alexa 647, la hibridación de los ADNc marcados con los oligonucleótidos anclados al chip, y la lectura y cuantificación de los microarreglos de ADN.

Una vez obtenidos los resultados, las intensidades de fluorescencia obtenidas para cada gen de los dos grupos experimentales se normalizaron, y se procedió

a obtener el Z-score, el fold-change (FC) y el log FC. Para la interpretación de los resultados, se utilizó ShinyGO 0.77, una herramienta bioinformática de anotación funcional. En esta se introdujeron las listas de genes con Z-score mayores a 1.5 y menores a -1.5, representando a los genes regulados al alza y a la baja, respectivamente. Se configuró a la herramienta seleccionando al humano como organismo modelo, y aplicando un punto de corte de 0.05 en el False Discovery Rate (FDR) para la búsqueda de vías, ontología génica, u otras categorías de anotación funcional. Se seleccionó un valor de mínimo 2 y máximo 2000 miembros para el proceso de enriquecimiento. Finalmente, se recolectaron los resultados del análisis de enriquecimiento correspondientes al Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).

4.4.7 Realizar el análisis proteómico de los secretomas provenientes de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina

De manera previa a la identificación de proteínas, los medios condicionados colectados en el paso previo se procesaron con el objetivo de separar y concentrar el proteoma de cada medio. La metodología para obtener el proteoma inició a partir de los medios condicionados filtrados. Estos se transfirieron a tubos concentradores de proteínas, Amicon Ultra-15, que pueden concentrar un volumen de 15 mL hasta 200 μ L. Además, los tubos Amicon que se emplearon aquí eran capaces de retener proteínas de hasta 3 kDa en el concentrado, con una recuperación de hasta el 90%. Una vez en los tubos Amicon, los medios

condicionados se centrifugaron a 5000 x *g* por 30 minutos, pasando de un volumen de 15 mL hasta aproximadamente 3 mL. Una vez finalizada la centrifugación, se transfirió el concentrado de la parte superior a un tubo Falcon de 15 mL, separando únicamente una alícuota de 100 µL en un tubo Eppendorf para emplearse en la cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford. Finalmente, los proteomas provenientes de los MC-SN-C, MC-SN+MET-C, y MC-CT-C, se etiquetaron como MC-SN-P, MC-SN+MET-P, y MC-CT-P, respectivamente. Además, estos se almacenaron a -20°C hasta su posterior cuantificación y procesamiento.

De manera previa a su análisis, los proteomas se descongelaron y se llevaron a liofilizar. Una vez liofilizados, las muestras se enviaron a un servicio de identificación de proteínas empleando la técnica de shotgun proteomics en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria de la UNAM.

4.4.8 Realizar el análisis metabolómico de los secretomas provenientes de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina

Los metabolomas derivados de los distintos medios condicionados se obtuvieron directamente de la centrifugación de estos empleando los tubos concentradores Amicon Ultra-15. Luego de centrifugar los medios condicionados completos por 30 minutos a 5000 x *g*, se separó el proteoma de cada medio al retirar el concentrado de la parte superior, y el metaboloma se hallaba contenido en la parte inferior. Finalmente, los metabolomas provenientes de los MC-SN-C, MC-

SN+MET-C, y MC-CT-C, se etiquetaron como MC-SN-M, MC-SN+MET-M, y MC-CT-M, respectivamente. Además, estos se almacenaron a -20°C hasta su posterior cuantificación y procesamiento.

De manera previa a su análisis, los metabolomas se descongelaron y se llevaron a liofilizar. El análisis metabolómico se llevó a cabo empleando la identificación y cuantificación por resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H). Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales, perteneciente al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Unidad Mérida.

A grandes rasgos, el procedimiento que se siguió para el análisis de las muestras consistió en colocar al menos 10 mg de cada replica de los liofilizados de los secretomas en tubos de RMN. A cada tubo se le agregó el patrón interno, 3-trimetilsilil{2,2,3,3-H₂}propionato sódico (TSP, por sus siglas en inglés) en una concentración de 500 mM. Luego de esto, los tubos se introdujeron al equipo de RMN-¹H (Varian-Agilent AR Premium Compact) que tenía una potencia de 600 MHz, se recolectaron los espectros a 25 °C, y estos se procesaron utilizando MestReNova donde se les realizó la corrección de la línea base, el alineamiento del espectro, el bucketing, la normalización y finalmente la exportación de los resultados procesados.

Para analizar los espectros de RMN-¹H de las diferentes muestras evaluadas, se empleó la herramienta Bayesil. Para el análisis se seleccionó “Custom” en la opción de Biofluid, y se eligieron todos los metabolitos presentes en la base de datos. Además, se introdujeron las especificaciones mediante las cuales se

corrieron los ensayos, es decir, TSP como patrón interno, a una concentración de 500 mM, y 600 MHz como frecuencia del equipo. Finalmente, se cargaron los archivos fid de las muestras analizadas por RMN-¹H, y se seleccionó una velocidad de análisis estándar. Una vez finalizado el análisis, se descartaron aquellos metabolitos identificados que tenían un puntaje de confianza menor de 7.

El análisis estadístico y el proceso de anotación funcional de los resultados se llevó a cabo empleando la herramienta bioinformática MetaboAnalyst 5.0, en la cual se introdujeron los metabolitos identificados y su concentración. Para llevar a cabo los análisis en la plataforma, se cargaron los archivos de los metabolitos identificados y cuantificados en cada grupo experimental en formato .CSV. Al cargarse, los datos de entrada se autoescalaron, y se inició la comparación de medias entre los grupos experimentales mediante un ANOVA de un factor. Los resultados obtenidos se colectaron para su análisis posterior en la sección de “Análisis de enriquecimiento”, donde se introdujeron las listas de los metabolitos diferencialmente alterados en los distintos metabolomas, y la plataforma devolvió las vías sobrerrepresentadas o enriquecidas que se vieron afectadas a la baja o al alza entre los grupos experimentales.

Por último, se llevó a cabo un “Análisis de Unión de Vías” donde se introdujeron la lista de los genes diferencialmente expresados entre los fibroblastos SN vs SN+MET y la lista de los metabolitos diferencialmente alterados entre las mismas condiciones, así como sus correspondientes log FC. De esta manera, la herramienta devuelve las vías metabólicas afectadas por la metformina tomando

en consideración la concordancia los cambios significativos del transcriptoma y metaboloma.

4.4.9 Realizar el análisis transcriptómico de células MCF-7 expuestas a los secretomas provenientes de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina

Una vez recolectados los diferentes medios condicionados, se inició con la exposición de las células MCF-7 a estos. El procedimiento comenzó con dos grupos de células MCF-7, cada uno por triplicado, a los que se les retiró el medio de cultivo empleando pipetas Pasteur y un sistema de vacío. Posteriormente, se les agregó medio EMEM con SFB suplementado con MC-SN+MET-C o MC-SN-C. Luego de esto, los cultivos se llevaron a incubar a 37°C con 5% de CO₂ por 72 horas.

Hay que destacar que la suplementación del medio EMEM con los diferentes medios condicionados se llevó a cabo empleando la tasa de producción, obtenida de la división del volumen de medio recolectado sobre el número células productoras de secretoma. Asimismo, la tasa de producción se utilizó para diluir cada medio condicionado de manera tal que se adicionará el volumen de medio condicionado producido por 1 célula para 10 células MCF-7, es decir, en un radio de exposición 1:10, llegando al volumen final deseado adicionando medio EMEM sin SFB.



Figura 9. Diseño de experimentos del estudio del transcriptoma de las células MCF-7 expuestas a los diferentes medios condicionados recolectados de los fibroblastos senescentes, tratados o no con metformina.

Una vez cumplido el tiempo de incubación, se extrajo el ARN total de los cultivos de cada grupo mediante la metodología planteada previamente en la sección 4.4.3. Los ARN totales extraídos fueron ensayados para su control de calidad en electroforesis en gel y espectrofotometría para determinar la integridad y pureza, respectivamente. Luego de dichas pruebas, los ARN totales se almacenaron hasta su envío para el análisis de transcriptómica por microchip de ADN en la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, como se indicado en la sección 4.4.6 (Figura 9).

Una vez obtenidos los resultados, su procesamiento y los análisis de anotación funcional se llevaron a cabo de la misma manera que la metodología planteada en la sección 4.4.6.

4.4.10 Realizar un modelo computacional del posible mecanismo de acción de la metformina

Para elaborar la propuesta de mecanismo de acción de la metformina nos basamos en un enfoque estructural y fisicoquímico. Para poder elucidar los mecanismos a través de los cuales la metformina ejerce sus efectos biológicos, primero se deben establecer dianas candidatas sobre las que esta pueda actuar. La unión de un ligando a una diana molecular depende de distintos factores estructurales y fisicoquímicos como la forma, el tamaño, la planaridad, la flexibilidad, la polaridad, entre otros. Dado que la metformina podría compartir similitud estructural y fisicoquímica con algunos metabolitos endógenos, esta podría unirse a sus dianas correspondientes. Algunos ejemplos de estos metabolitos incluyen a la L-arginina, creatina, L-ornitina, entre otros. Si nuestra hipótesis fuera cierta, las biguanidas deberían ser comparables en términos estructurales y fisicoquímicos a los metabolitos endógenos relacionados a la L-arginina, y esto debería traducirse en un modo de unión similar de las biguanidas a estos últimos, en sus dianas correspondientes. Por tal motivo, la metodología seguida aquí para establecer un posible mecanismo de acción de la metformina se basó en técnicas computacionales con el objetivo de comparar a las biguanidas y los metabolitos relacionados a L-arginina, primero en términos estructurales y fisicoquímicos empleando herramientas quimioinformáticas y,

posteriormente, comparar su afinidad y modo de unión en sus dianas correspondientes empleando herramientas bioinformáticas.

La etapa quimioinformática comenzó con la creación de una base de datos que contenía al grupo de las biguanidas, así como distintos metabolitos pertenecientes al ciclo de la urea, al metabolismo del óxido nítrico, al metabolismo de las poliaminas, y al metabolismo de la creatina. De cada uno de estos, se recolectó su “compound ID (CID)” de la base de datos PubChem, así como su SMILES.

Una vez creada la base de datos, se inició con la comparación estructural entre biguanidas y los diferentes metabolitos candidatos. Dicha comparación se llevó a cabo a nivel 2D y 3D introduciendo los CID recolectados previamente en el servicio PubChem Score Matrix. En el caso de las comparaciones a nivel 3D, los análisis se llevaron a cabo optimizando la forma y las características, y seleccionando 10 conformeros. Los análisis 2D generaron puntajes denominados coeficientes de Tanimoto (TC, por sus siglas en inglés), que pueden ir desde 0 hasta 100, indicando una nula o completa similitud, respectivamente. Los análisis 3D, generaron dos puntajes denominados “shape Tanimoto (ST)” y “color Tanimoto (CT)”. Ambos puntajes pueden ir desde 0 a 100, siguiendo la misma lógica que el TC. El puntaje ST evalúa la similitud estructural en torno a la forma, mientras que el CT evalúa la similitud estructural entorno a las características, es decir, la presencia de anillos, dobles enlaces, puentes de hidrógeno, etc. Ambos puntajes pueden combinarse y generar un puntaje global, denominado combo T,

que evalúa la forma y las características en conjunto. Dicho puntaje puede ir desde 0 hasta 200.

Para la comparación a nivel fisicoquímico, primero se predijeron los parámetros fisicoquímicos de las biguanidas y los metabolitos candidatos introduciendo los SMILES recolectados en la herramienta SwissADME del Swiss Institute of Bioinformatics. Cabe mencionar que las estimaciones fisicoquímicas se llevaron a cabo en dos modalidades, en forma no ionizada y ionizada (a pH fisiológico de 7.4). De cada molécula, se recolectaron el peso molecular, los números de donadores y aceptores de hidrógenos, el coeficiente de partición estimado (o comúnmente conocido como Log P), la fracción de carbonos sp^3 , el número de enlaces rotacionales, y el área superficial polar topológica. Todos estos parámetros son indispensables para interacción de un ligando con una diana molecular. Una vez colectados todos los perfiles fisicoquímicos de las biguanidas y los metabolitos candidatos, se llevó a cabo un análisis de componentes principales para determinar los componentes principales que explican la mayor parte de la varianza en los resultados, puesto que estos se usarían más tarde para la elaboración de los agrupamientos jerárquicos. Luego de esto, se realizaron distintos agrupamientos jerárquicos en modalidad ionizada y no ionizada. Se realizó un agrupamiento jerárquico preliminar sin incluir ninguna biguanida para observar si el algoritmo de aprendizaje no supervisado era capaz de clasificar correctamente a los metabolitos de acuerdo con la vía metabólica a la que pertenecen. Posteriormente, se llevaron a cabo distintos agrupamientos jerárquicos entre los metabolitos candidatos y las biguanidas, una a la vez.

Finalmente, se recolectaron los dendrogramas de dichos agrupamientos jerárquicos.

Una vez comparadas las biguanidas y los metabolitos candidatos a nivel estructural y fisicoquímico, se buscó evaluar esa posible similitud entre ligandos, pero ahora en la afinidad y el modo de unión de estos en las correspondientes dianas de los metabolitos relacionados a la L-arginina. Para llevar a cabo dicha evaluación, se emplearon distintas herramientas bioinformáticas. A continuación, se describe el proceso que se siguió.

Primero, se recolectó un conjunto de dianas cuyos sustratos o ligandos identificados estaban incluidos dentro de los metabolitos candidatos de nuestra base de datos. Posteriormente, se descargaron los modelos tridimensionales de las proteínas desde el portal del Protein Data Bank (PDB). Los archivos 3D de las proteínas se procesaron a través de UCSF Chimera para eliminar moléculas pequeñas presentes en el archivo como, por ejemplo, agua, glicerol, inhibidores o iones. Luego de “limpiar” a los archivos 3D de las proteínas, se generaron los modelos 3D de los ligandos a evaluar, dentro de estos se encontraban las biguanidas y los metabolitos candidatos. Los modelos 3D en su conformación más estable se generaron empleando el software Avogadro a través de la herramienta de auto optimización, y seleccionando el campo de fuerza MMFF94. Luego de esto, los archivos 3D se guardaron en formato mol2. Posteriormente, se llevaron a cabo las simulaciones de acoplamiento molecular entre las dianas moleculares seleccionadas “limpias” y los ligandos en su conformación más estable, empleando AutoDock 4.2 y su interfaz gráfica AutoDockTools 1.5.7. La

simulación se llevó a cabo en modalidad rígida, se predijeron 10 conformaciones, y las coordenadas de la gridbox se seleccionaron de acuerdo con información de los sitios activos de las dianas moleculares reportadas en UniProt, PDB, y las predicciones del sitio activo generadas en DoGSiteScorer. Finalmente, de cada resultado de la simulación se recolectaron las energías de unión y las constantes de inhibición. Asimismo, se analizaron los modos de unión de los diferentes ligandos evaluados en UCSF Chimera para una determinada diana molecular.

4.5 Manejo y disposición de residuos

El manejo y disposición de los residuos generados en el presente proyecto siguió el programa de disposición de residuos implementado por la FCQ de la UANL, utilizando los siguientes contenedores:

- Colector A: Soluciones de sales inorgánicas, ácidos y bases neutralizados.
- Colector B: Sólidos inorgánicos.
- Colector C: Compuestos y disolventes orgánicos no halogenados.
- Colector D: Compuestos y disolventes orgánicos halogenados.
- Colector E: Muy tóxico, cancerígeno, orgánico.
- Colector G: Sólidos orgánicos.
- Vidrio impregnado de sustancias químicas.
- Plástico impregnado de sustancias químicas.
- Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos:

- i. Contenedor rojo rígido: residuos punzocortantes contaminados con sangre (agujas).
- ii. Contenedor rojo hermético: sangre, torundas y tubos contaminados con sangre.
- ii. Contenedor amarillo: residuos patológicos (órganos, tejidos, células biológico-infecciosas).

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Inducir senescencia celular en una línea celular de fibroblastos

La inducción de senescencia se llevó a cabo en la línea celular de fibroblastos IMR90 empleando al agente quimioterapéutico MMC. A grandes rasgos, la metodología comenzó con la generación de diferentes cultivos de fibroblastos IMR90 a una densidad de 180,000 por cada caja Petri utilizada, esto debido a que la confluencia en dicho recipiente se encontraba entre el 60-70%. Luego de esto, a los cultivos se les retiró el medio de cultivo empleando un sistema de vacío y una pipeta Pasteur. Posteriormente, a algunos de estos cultivos se le agregó medio suplementado con MMC a una concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$, a los cultivos restantes se les adicionó agua en lugar de la MMC, en un volumen equivalente. Posteriormente, los cultivos se llevaron a incubar a 37°C con 5% de CO_2 por 144 horas. Esto debido a que se ha reportado la generación de buenos niveles de células senescentes tras la exposición prolongada a un agente lesivo a una concentración subletal¹⁹. Además, esto coincide con lo que sucede con los pacientes oncológicos a nivel clínico, ya que estos reciben quimioterapia por varios días en numerosos ciclos con periodos intermedios de lavado, es decir, la

exposición a los agentes lesivos (los fármacos quimioterapéuticos) es más una exposición crónica que aguda⁹⁷.

Luego de esto, todos los cultivos fueron subcultivados y las células transferidas a nuevas cajas Petri, para finalmente llevarse a incubar a 37°C con 5% de CO₂ por 48 horas, esta vez con medio EMEM sin MMC. Al completarse las 48 horas, se confirmó la aparición de células senescentes empleando el ensayo de actividad de la β -galactosidasa. Como se puede observar en la figura 10, en los grupos de fibroblastos que se expusieron a MMC (SN) se aprecia un elevado número de células teñidas de azul, un claro resultado positivo al desarrollo de senescencia. Por otro lado, los grupos no expuestos a MMC (CT) muestran un bajo número de células teñidas de azul, como cabría esperar para células que no se expusieron a un agente lesivo.

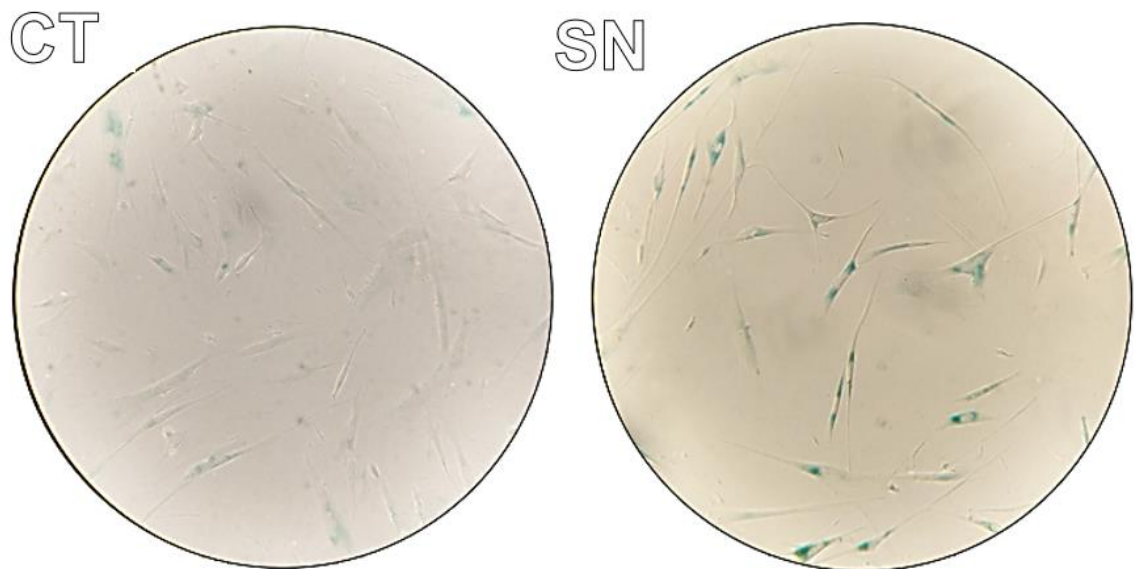


Figura 10. Ensayo de actividad de la β -galactosidasa de los fibroblastos no expuestos (CT) y expuestos a MMC (SN) empleando cultivos con una densidad de 50,000 células. Las imágenes se obtuvieron empleando el objetivo 10X.

Hay que destacar que las células empleadas para todos los ensayos del presente proyecto se mantuvieron siempre con un nivel de duplicación de la población (PDL, por sus siglas en inglés) menor de 50, puesto que se ha reportado el desarrollo de senescencia replicativa a partir de un PDL mayor de 58. En términos simples, el PDL refleja el número de divisiones que ha experimentado la línea celular. De acuerdo con la ATCC, las células IMR90 entran en senescencia replicativa por encima de un PDL de 58⁹⁸.

Con los resultados obtenidos en la presente sección 5.1, que representa el primer objetivo del proyecto, se demostró de manera preliminar que los fibroblastos IMR90 al exponerse a una dosis subletal de MMC (0.5 µg/mL) por 144 horas, y someterse a un periodo de incubación post-MMC por 48 horas son capaces de entrar en senescencia. No obstante, la principal desventaja de estas condiciones de inducción es el largo tiempo de la presente metodología para generar células senescentes, tomando alrededor de 10 días si incluimos los días en los que se preparan las células a la densidad deseada y el día en que se agrega la MMC al cultivo.

5.2 Validar el modelo de senescencia celular en una línea celular de fibroblastos mediante técnicas celulares

Una vez que se confirmó el desarrollo de senescencia en las células IMR90 inducidas por exposición a MMC por 144 horas y la incubación post-MMC de 48 horas, se decidió validar la metodología y optimizar el desarrollo de senescencia

empleando diferentes tiempos de exposición a MMC, incluyendo 24, 48, 72 y 144 horas, y manteniendo el mismo periodo de incubación post-MMC de 48 horas. Esto con el objetivo de identificar un conjunto de condiciones que lleven al mayor desarrollo de senescencia, reflejado por el mayor porcentaje de células senescentes obtenido en los ensayos de actividad de la β -galactosidasa. Para la evaluación de los distintos tiempos de exposición, se siguió la misma metodología planteada en la sección 5.1 variando únicamente la duración en la exposición de las células IMR90 a MMC. Todos los cultivos evaluados (CT o SN) a los diferentes tiempos de exposición de MMC se ensayaron por triplicado técnico y triplicado biológico. Además, los resultados obtenidos de estas replicas se sometieron a un análisis estadístico mediante la prueba T de Student para identificar diferencias estadísticamente significativas entre el grupo CT y SN a los diferentes tiempos de exposición. Los porcentajes de senescencia obtenidos con cada variación de la exposición y su análisis estadístico se muestran en la figura 11.

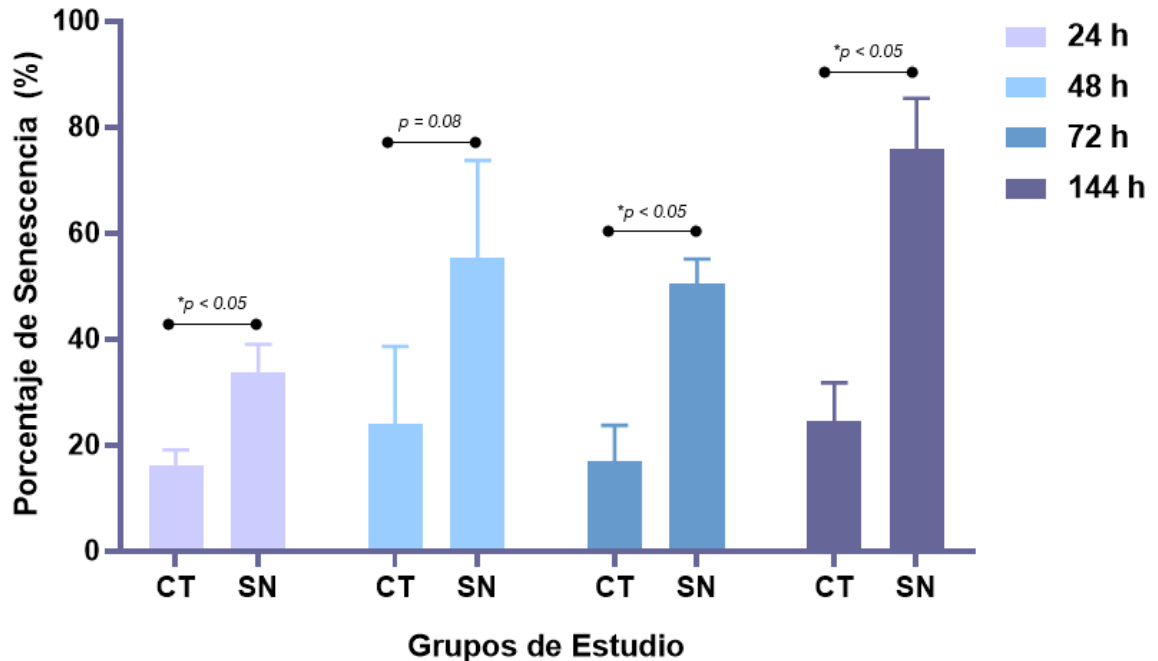


Figura 11. Porcentajes de senescencia del ensayo de actividad de la β -galactosidasa de los fibroblastos no expuestos (CT) y expuestos a MMC (SN) por diferentes tiempos y empleando cultivos con una densidad de 50,000 células.

Como se puede apreciar en la figura 11, en todos los tiempos de exposición a MMC se observó una diferencia estadísticamente significativa con $p < 0.05$ entre el grupo SN y CT, exceptuando el experimento a las 48 horas, donde el valor $p = 0.08$. Esto último sugiere una tendencia hacia una diferencia estadísticamente significativa pero que no se alcanzó, posiblemente debido a la desviación estándar del experimento a las 48 horas. Es importante destacar que el mayor porcentaje de senescencia se obtuvo con la exposición a MMC por 144 horas, donde dicha magnitud se encontraba cerca del 80%. Estos resultados concordaron con lo reportado por McKenna *et al.* cuyos valores de porcentaje de células positivas a β -galactosidasa fueron del 90% empleando MMC sobre células A549, una línea celular de cáncer de pulmón, durante 6 días a una

concentración de 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$, es decir, 25 veces menos concentración de MMC que la empleada en el presente proyecto¹⁹.

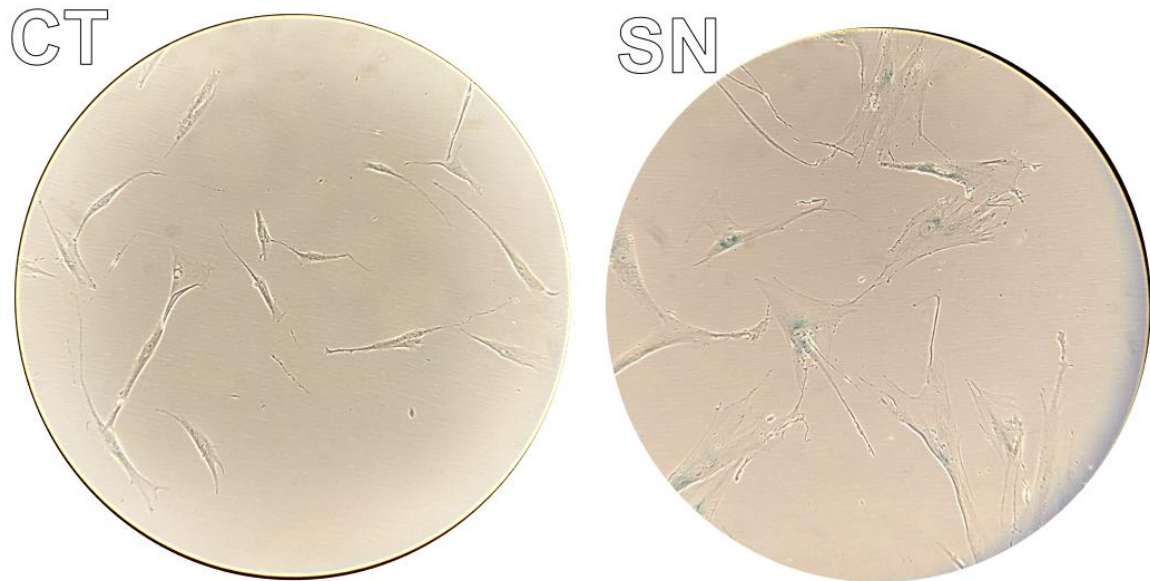


Figura 12. Microscopía óptica de fibroblastos IMR90 control y senescentes inducidas por exposición a MMC durante 144 horas e incubación post-MMC de 48 horas. Las imágenes se obtuvieron con el objetivo de 20X.

Además de la actividad de la β -galactosidasa asociada a senescencia, los cambios morfológicos son otra característica fundamental de este proceso. Se ha reportado que las células senescentes suelen incrementar de tamaño, y poseen una morfología irregular, plana y alargada⁹⁶. La figura 12 muestra las imágenes de microscopía óptica a 20X obtenidas de los fibroblastos IMR90 control y senescentes con las mejores condiciones para inducir senescencia, es decir, 144 horas de exposición a MMC y 48 horas de incubación post-MMC. En efecto se puede observar que, a pesar de que las imágenes se obtuvieron con el mismo aumento, los fibroblastos SN muestran un mayor tamaño, y una morfología alargada y plana, comparados con el grupo CT. Esto sugiere que nuestros

resultados concordaron con la literatura científica. Por ejemplo, en los resultados reportados por Yosef *et al.* y Casella *et al.*, se observó un claro aumento de tamaño en las células IMR90, comparadas con las células control, al desarrollar senescencia mediante exposición a etopósido (20 μM) o radiación ionizante (10 Gy), y por acortamiento de telómeros (PDL 50-59), respectivamente^{84,99}. Cabe mencionar que existe un reporte del trabajo de Stein *et al.* (1985) sobre los mecanismos de arresto del ciclo celular en el cual se indujo senescencia sobre la línea celular IMR90 por exposición a MMC a una concentración de 1.5 μM (es decir, la misma concentración que se empleó en el presente proyecto)¹⁰⁰. En concordancia con nuestros resultados, se observaron los cambios de morfología en las células senescentes, y el desarrollo de actividad de la β -galactosidasa. Lamentablemente, los autores no determinaron el porcentaje de senescencia, aunque, por lo que se aprecia en sus imágenes, más del 50% de las células dio un resultado positivo¹⁰⁰.

Con todos los resultados mostrados aquí, se demostró que el modelo de senescencia implementado en la línea celular IMR90 quedó validado mediante técnicas celulares de manera estadística. Además, a pesar de la desventaja relacionada al tiempo que se mencionó en la sección 5.1, las mejores condiciones para obtener el mayor porcentaje de células senescentes consistieron en la exposición a MMC por 144 h y un periodo post-MMC de 48 h.

5.3 Validar el modelo de senescencia celular en una línea celular de fibroblastos mediante técnicas moleculares

Para confirmar el desarrollo de senescencia de una manera más exhaustiva, se procedió a cuantificar la expresión relativa de marcadores de senescencia, incluyendo *CDKN1A*, *CDKN2A*, e *IL6*, usando el gen *18S* como gen constitutivo para normalizar la expresión. De manera previa a la cuantificación, se repitió la metodología planteada en la sección 5.1 aunque utilizando las condiciones óptimas identificadas en la sección 5.2, es decir, 144 horas de exposición a MMC y 48 horas de incubación post-MMC. De nuevo, se utilizó un cultivo de fibroblastos CT y otro SN, aunque por triplicado biológico y triplicado técnico. Luego de cumplirse la metodología, se extrajo el ARN total de cada cultivo y se obtuvo su respectivo ADNc mediante la reacción de transcripción inversa. En la figura 13 se puede apreciar el análisis electroforético de algunas muestras extraídas de ARN total de los fibroblastos CT y SN. Finalmente, se llevaron a cabo las reacciones de PCR cuantitativa empleando los oligonucleótidos correspondientes a los marcadores de senescencia y el gen constitutivo, así como la mezcla maestra SYBR Green Power Up. Las curvas de fusión de los oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de los marcadores de senescencia se pueden observar en las figuras 14, 15, y 16. Por otro lado, los resultados de expresión relativa se muestran debajo en la figura 17.

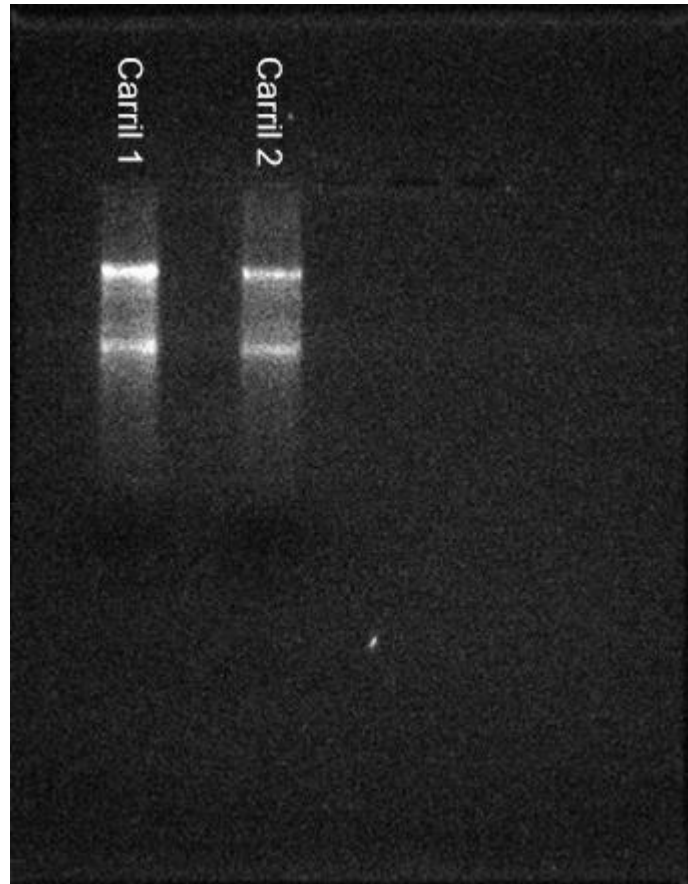


Figura 13. Análisis electroforético de las muestras de ARN total extraídas de los fibroblastos CT (Carril 1) y SN (Carril 2) expuestos a MMC por 144 h y sometidos a 48 h de incubación post-MMC. El gel estaba compuesto de agarosa al 2%, se generó y eluyó empleando el buffer TBE 1X. La elución se llevó a cabo en dos ciclos: el primer ciclo consistió en un voltaje de 70 V por 5 min y el segundo en 115 V por 35 min.

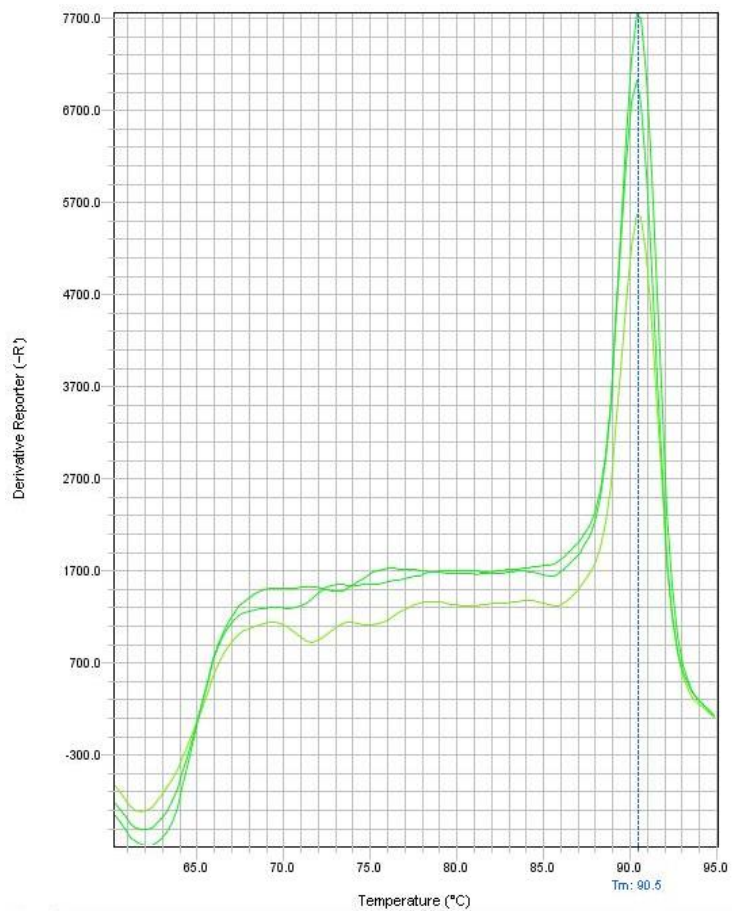


Figura 14. Curva de fusión de la amplificación de los oligonucleótidos empleados para la cuantificación de la expresión relativa de *CDKN1A*.

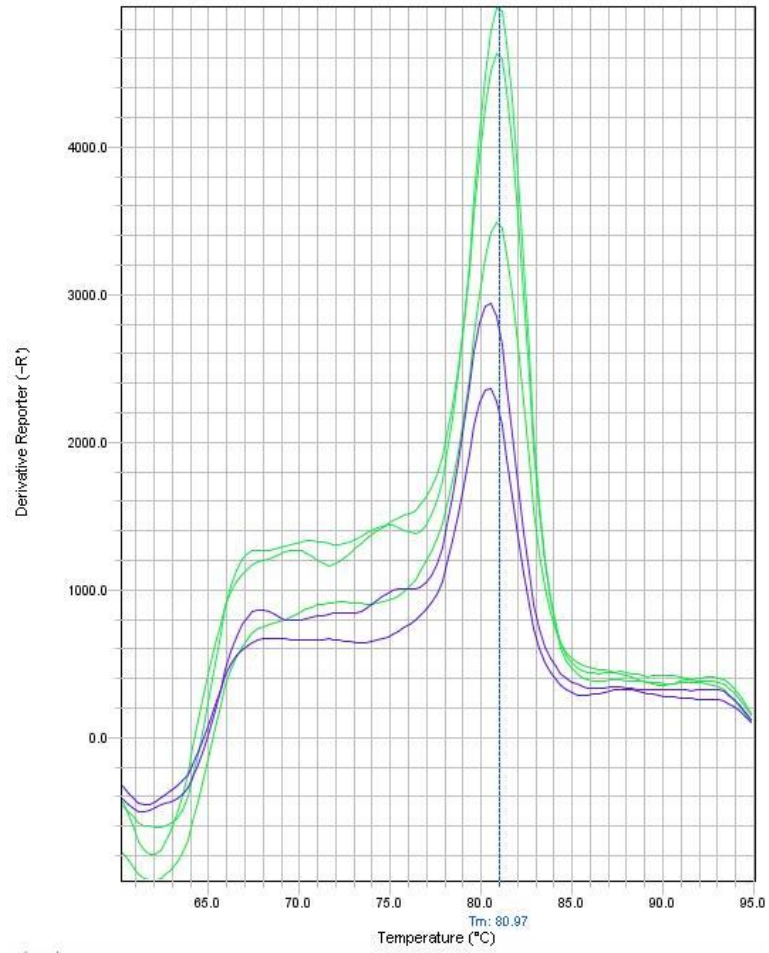


Figura 15. Curva de fusión de la amplificación de los oligonucleótidos empleados para la cuantificación de la expresión relativa de *CDKN2A*.

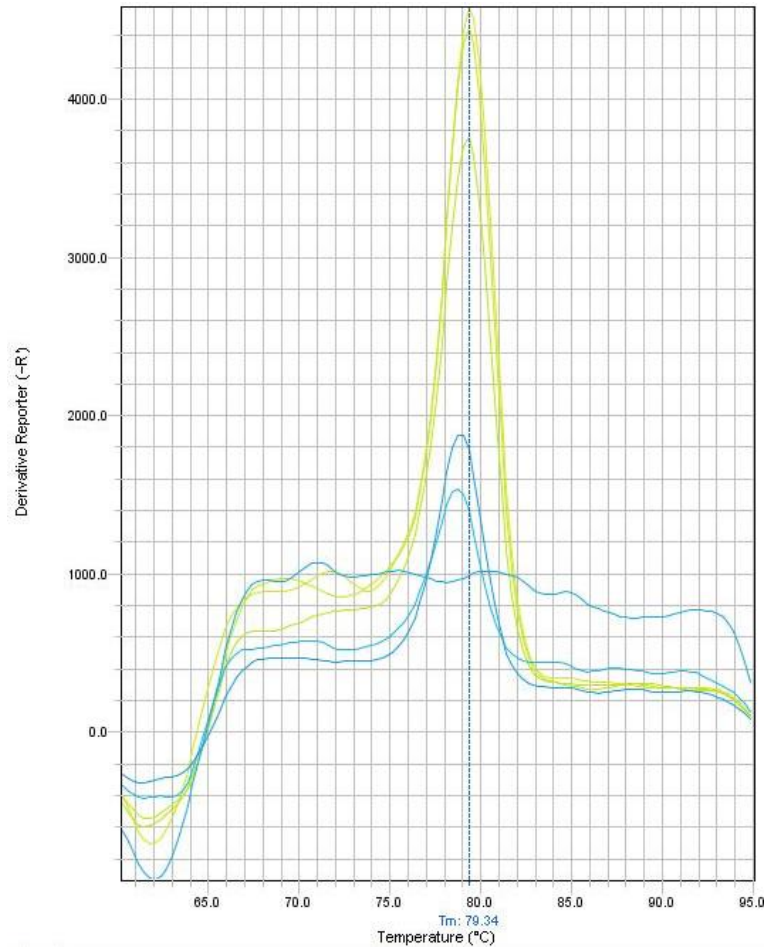


Figura 16. Curva de fusión de la amplificación de los oligonucleótidos empleados para la cuantificación de la expresión relativa de *IL6*.

Como se pudo observar en las figuras 14 y 15, las curvas de fusión de *CDKN1A* y *CDKN2A* demostraron la presencia de un solo pico a 90.5°C y 80.97°C, respectivamente, sugiriendo una amplificación específica con los oligonucleótidos descritos en la sección de metodología. En el caso del gen *IL6*, la amplificación también se dio de manera específica, como se puede observar en la figura 16. Sin embargo, algunas gráficas no muestran los picos en la curva de fusión puesto que algunas reacciones no amplificaron para dichos marcadores, posiblemente debido a una expresión reducida o incluso nula.

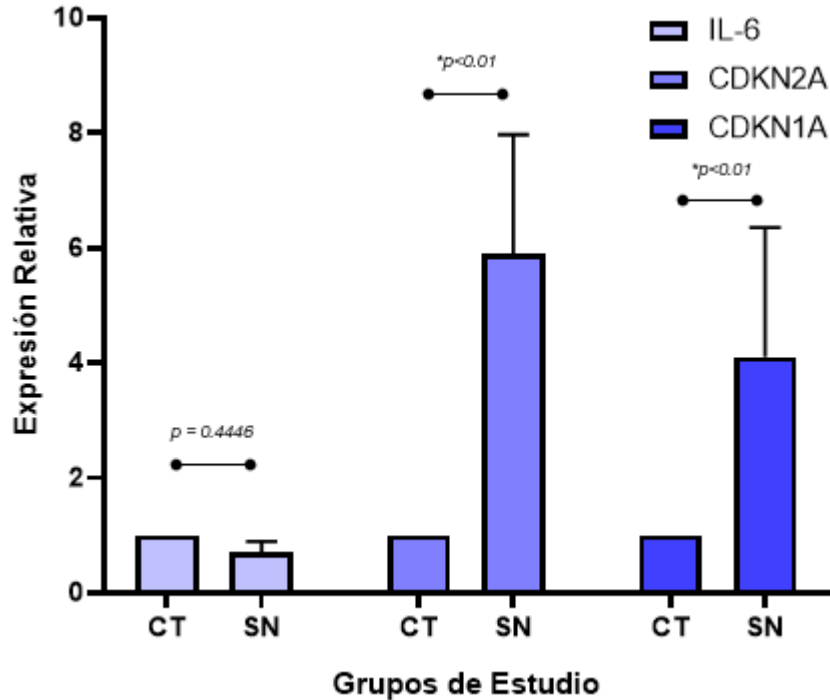


Figura 17. Expresión relativa de los marcadores de senescencia de los fibroblastos no expuestos (CT) y expuestos a MMC (SN) por 144 h y 48 h de incubación post-MMC.

Como se pudo observar en la figura 17, el desarrollo de senescencia se confirmó a nivel molecular en el grupo SN, esto representado por el incremento estadísticamente significativo en la expresión relativa de *CDKN1A* y *CDKN2A* en, aproximadamente, 4 y 5 veces más, respectivamente, comparado con el grupo CT. Por otro lado, la expresión relativa de *IL6* no fue estadísticamente significativa, lo que sugiere que no hubo un cambio de expresión entre los grupos ensayados. A pesar de que no se presentaron cambios estadísticamente significativos en todos los genes evaluados entre los dos grupos, la aparición de actividad de la β -galactosidasa obtenida en la sección 5.3, y los aumentos en la expresión de los marcadores de senescencia, *CDKN1A* y *CDKN2A*,

representaron evidencia suficiente para validar, de manera más completa, el modelo de senescencia en fibroblastos IMR90 inducidos por exposición a MMC.

No obstante, debido a que el tiempo necesario para que se den ciertos eventos transcripcionales puede demorar algunas horas, y el desarrollo de senescencia viene acompañado de cambios epigenéticos a nivel transcripcional, se decidió evaluar la influencia de 1 día más de incubación post-MMC en la expresión de los marcadores de senescencia, por lo que se llevó a cabo una comparación de la expresión relativa de *CDKN1A* y *CDKN2A* a partir del ARN total proveniente de fibroblastos CT y SN inducidos por exposición a MMC por 144 horas, y 72 horas de incubación post-MMC. En la figura 18, se muestra la cuantificación de la expresión relativa de los marcadores de senescencia empleando estas condiciones.

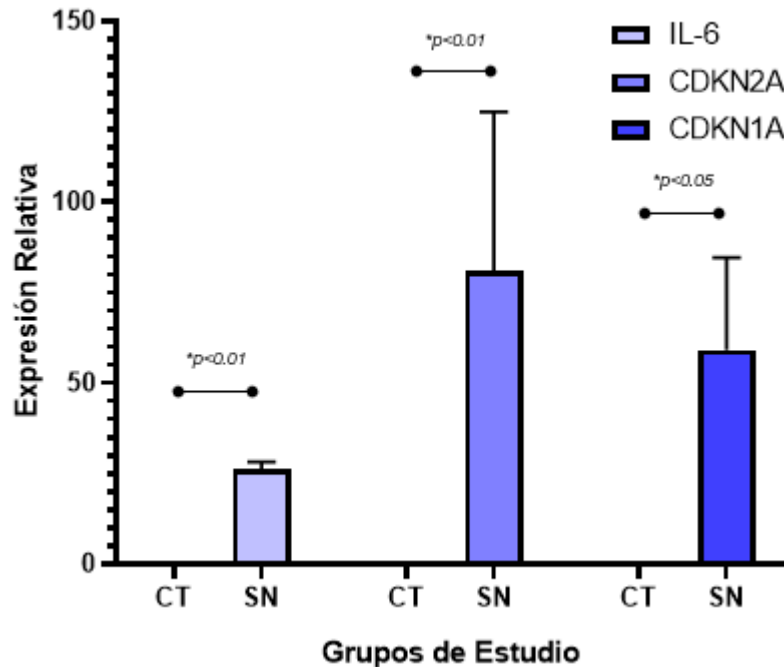


Figura 18. Expresión relativa de los marcadores de senescencia de los fibroblastos no expuestos (CT) y expuestos a MMC (SN) por 144 h y 72 h de incubación post-MMC.

Como se pudo apreciar en la figura 18, con agregar solo un día de incubación post-MMC la expresión relativa de *IL6*, *CDKN1A* y *CDKN2A* aumento casi 25, 75 y 60 veces, respectivamente, en el grupo SN con respecto al grupo CT. Además, hay que mencionar que estos cambios fueron estadísticamente significativos con valores $p < 0.01$ para *IL6* y *CDKN2A*, y un valor $p < 0.05$ para *CDKN1A*. En concordancia con los resultados obtenidos, Hoare *et al.* reportaron que la composición del secretoma de las células senescentes podía cambiar con el paso del tiempo, dependiendo de la actividad de ciertos reguladores maestros (por ejemplo, NOTCH1) conduciendo a la aparición de un fenotipo secretor caracterizado por una baja secreción de citocinas pero una mayor secreción de factores de crecimiento, para posteriormente dar lugar a un fenotipo secretor

inflamatorio que se caracteriza por secretar citocinas proinflamatorias (Por ejemplo, IL-6). En el presente proyecto no se midió la expresión de NOTCH1, pero si se dio un cambio significativo en la expresión de *IL6* solamente aumentando el periodo de incubación post-MMC¹⁰¹. Pudiera ser posible que NOTCH1 fuera el regulador maestro responsable de los efectos observados asociados a la modificación del tiempo de incubación post-MMC. No obstante, su modelo de senescencia usaba la sobreexpresión de oncogén como estímulo inductor, por lo que se debería comprobar que este mecanismo dependiente de NOTCH1 es aplicable independientemente del modelo de estudio.

Continuando con el análisis, y para una comparación más directa, en la figura 19 se muestran los resultados de la cuantificación de la expresión relativa comparando únicamente a los fibroblastos senescentes, aunque únicamente utilizando los marcadores *CDKN1A* y *CDKN2A*, debido a que fueron los dos marcadores que se mantuvieron estadísticamente significativos en ambas condiciones, a diferencia de *IL6*. De nuevo, los resultados concordaron con lo observado en la figura 18, obteniéndose una mejora estadísticamente significativa (con $p < 0.001$) en la expresión de *CDKN2A* en casi 45 veces en el grupo SN con 72 horas post-MMC con respecto al grupo SN con 48 horas post-MMC. Para el gen *CDKN1A*, los cambios de expresión no fueron estadísticamente significativos entre los grupos ($p = 0.2$). A pesar de que solo la expresión de *CDKN2A* fue estadísticamente significativa, su contribución al desarrollo tanto de senescencia como de su fenotipo secretor es esencial, pues se ha reportado que la pérdida de función de este gen o su supresión evita la

entrada de las células proliferantes al programa de senescencia, o promueve el escape de dicho programa si las células ya eran senescentes^{102,103}. De hecho, en modelos knockdown de *CDKN2A* desarrollados sobre células senescentes inducidas por sobreexpresión de oncogén o por daño al ADN se observa una disminución en la expresión de *IL6* y *CXCL8*, ambas citocinas proinflamatorias que forman parte del núcleo característico de proteínas secretadas¹⁰³. En nuestros resultados podemos apreciar que al aumentar la expresión de *CDKN2A* pasando de 48 h a 72 h en el periodo de incubación post-MMC, se da un aumento en la expresión de *IL6*, concordando con la evidencia reportada.

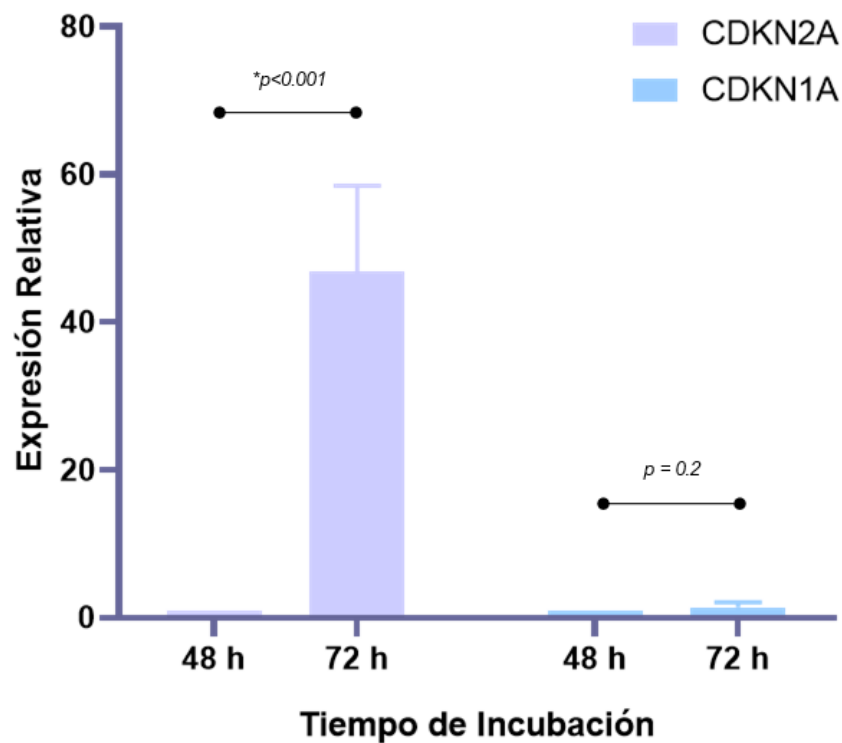


Figura 19. Expresión relativa de los marcadores de senescencia de los fibroblastos senescentes inducidos por exposición a MMC (SN) por 144 h y variando el tiempo de incubación post-MMC en 48 o 72 h.

Además, continuando con la comparación de nuestros resultados con lo reportado por Casella *et al.* (2019), se observa una mayor expresión de los marcadores de senescencia, *CDKN1A* y *CDKN2A*, en nuestro modelo de senescencia en IMR90 inducida por exposición a MMC. Por ejemplo, para el marcador *CDKN2A*, Casella *et al.* reportó incrementos de expresión relativa de 1.6 y 2.5 veces, con respecto al grupo control, en sus modelos de senescencia replicativa y senescencia inducida por radiación ionizante en IMR90, respectivamente, mientras que, en el presente proyecto, se obtuvieron incrementos de expresión de 4 y casi 60 veces cuando las células IMR90 se expusieron a MMC por 144 h y se sometían a un periodo de incubación post-MMC de 48 o 72 horas, respectivamente.

Es importante destacar que, para la inducción de la senescencia por radiación ionizante, Casella *et al.* expusieron a las células IMR90 a una única dosis de 10 Gy y, posteriormente, se cultivaron por 10 días. Para la senescencia replicativa, mantuvieron a las células IMR90 en proliferación hasta alcanzar un PDL de 52. A comparación de ellos, en el presente proyecto, el estímulo inductor de senescencia es más lesivo que el acortamiento de telómeros (senescencia replicativa) y la exposición fue más prolongada (crónica) a comparación de la radiación ionizante que simuló un daño agudo. Es posible que la exposición crónica al agente lesivo MMC, haya provocado un mayor daño al ADN y despertado la respuesta al daño al ADN que, a su vez, haya llevado a una mayor actividad y expresión de los factores de transcripción p53 y NF-κB, conduciendo

a la sobreexpresión de *CDKN1A* y *CDKN2A*, respectivamente, como ha sido descrito en la literatura previamente¹⁰⁴.

5.4 Evaluar el efecto de la metformina sobre los marcadores de senescencia en una línea celular de fibroblastos

De manera previa al análisis transcriptómico, se decidió evaluar el efecto de la metformina a concentraciones alcanzables con dosis clínicas (100 μ M) sobre los marcadores de senescencia en el modelo validado para la línea celular IMR90. Por tal motivo, el ensayo comenzó con la generación de dos grupos de cultivos de fibroblastos IMR90: SN y SN+MET. Con el grupo SN se siguió la metodología validada para inducir senescencia, es decir, se expusieron a MMC por 144 h y, posteriormente, se incubaron por 72 h más sin MMC. No obstante, para el grupo SN+MET, la metodología fue idéntica con excepción de la adición de clorhidrato de metformina al medio de cultivo, hasta alcanzar una concentración final de 100 μ M, durante la fase de incubación post-MMC. Una vez finalizado el ensayo, se extrajo el ARN total de los diferentes grupos, se obtuvieron los correspondientes ADNc a través de una reacción de transcripción inversa, y se cuantificó la expresión relativa de los marcadores de senescencia clásicos, *CDKN1A* y *CDKN2A*. En las figuras 20 y 21 se muestran las expresiones relativas obtenidas mediante PCR cuantitativa para los genes *CDKN1A* y *CDKN2A*, respectivamente.

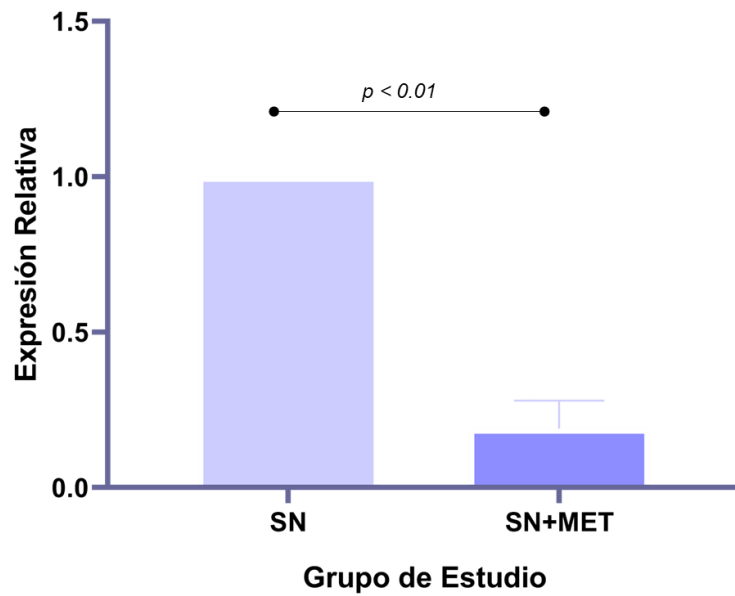


Figura 20. Comparación de la expresión relativa del gen *CDKN1A* de los fibroblastos no senescentes (CT), los fibroblastos senescentes (SN) y los fibroblastos SN tratados con metformina durante la incubación post-MMC (SN+MET).

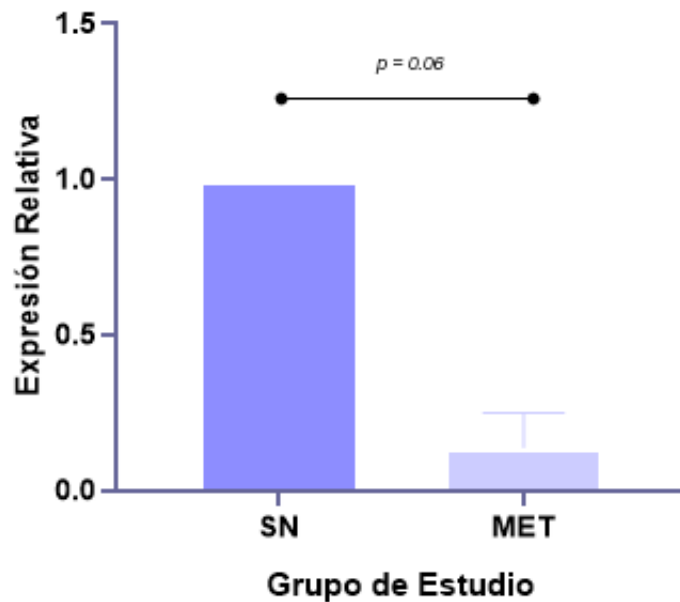


Figura 21. Comparación de la expresión relativa del gen *CDKN2A* de los fibroblastos senescentes (SN) y los fibroblastos SN tratados con metformina durante la incubación post-MMC (SN+MET).

Como se puede apreciar en la figura 20, el tratamiento con metformina durante el periodo de incubación post-MMC redujo la expresión de *CDKN1A* en las células senescentes en casi un 80%. Cabe mencionar que la reducción fue estadísticamente significativa con un valor $p < 0.01$. Por otro lado, aunque no hubo un cambio estadísticamente significativo, la figura 21 demostró una tendencia (con un valor p cercano a 0.05) hacia la significancia estadística de la reducción de la expresión del gen *CDKN2A* (cercana a un 90%) en el grupo SN+MET comparado con el grupo SN.

Los resultados obtenidos en este objetivo concordaron con los reportados por Molnar *et al.* (2014) donde se demostró que la metformina suprimía la expresión de *CDKN1A* (p21) inducida por concentraciones elevadas de glucosa¹⁰⁵. En el caso de *CDKN2A* (p16) también se ha reportado que la metformina es capaz de disminuir su expresión, así como su nivel de proteína, en distintos modelos de senescencia o envejecimiento acelerado. Por ejemplo, Yan *et al.* (2023) demostraron que la metformina fue capaz de disminuir los niveles de proteína de p16 en un modelo de senescencia de condrocitos. No obstante, la concentración de metformina que utilizaron era 1 mM, una concentración aparentemente inalcanzable hoy en día con dosis clínicas¹⁰⁶. Sin embargo, Li *et al.* (2022) demostraron que la metformina, a una concentración de 100 μ M (la misma que la utilizada en el presente proyecto), fue capaz de disminuir la expresión de p21 y p16 cuando se añadió como pretratamiento para prevenir el desarrollo de senescencia en células madre derivadas de tejido adiposo¹⁰⁷.

5.5 Recolectar los medios condicionados de senescencia de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina

Una vez validada la metodología para inducir senescencia en la línea celular IMR90, y luego de la demostración preliminar de los efectos de la metformina sobre los marcadores de las células senescentes, se prosiguió con el estudio del fenotipo secretor asociado a senescencia y como la composición de su secretoma correspondiente cambió luego de exponer a las células senescentes a metformina. De manera previa a la caracterización del secretoma y de los cambios que este experimentó por la exposición de los fibroblastos senescentes a la metformina, se llevó a cabo una etapa de recolección y procesamiento de los diferentes medios condicionados.

La metodología comenzó con la generación de tres grupos de fibroblastos, a los cuales se les indujo senescencia por exposición a MMC por 144 horas e incubación post-MMC de 72 horas para obtener los grupos SN. Para obtener el grupo CT se empleó la misma metodología, pero agregando el mismo volumen de agua que la solución de MMC. Para obtener el grupo SN+MET se tomó un grupo SN y, durante el periodo de incubación post-MMC, se le adicionó clorhidrato de metformina hasta alcanzar una concentración final de 100 μ M. Una vez finalizado el periodo de incubación post-MMC de todos los grupos de fibroblastos, se les retiró el medio de cultivo y se les agregó el mismo volumen del medio EMEM sin suero SFB. Los cultivos se llevaron a incubar cinco días

más a 37°C con 5% de CO₂ con un cambio de medio a la mitad del periodo de tiempo. Posteriormente, se recolectaron los medios condicionados de los diferentes cultivos, se transfirieron a tubos Falcon de 50 mL, y finalmente se filtraron empleando filtros de jeringa de 0.2 µm de baja unión a proteínas para retirar detritos celulares o partículas en general. De los medios condicionados completos filtrados, se transfirió una parte de estos a tubos Falcon para emplearse en los ensayos de transcriptómica, mientras que el restante de los medios condicionados se transfirió a los tubos Amicon Ultra-15 de 3 MWCO y se llevó a centrifugar a 5000 x g por 30 min, pasando de volúmenes iniciales de 30-35 mL a volúmenes finales de 3-5 mL. Luego de las centrifugaciones se obtuvieron dos componentes de cada medio condicionado: el concentrado (de la parte superior del tubo) que contiene hasta el 90% de las proteínas de la muestra original, y el filtrado (de la parte inferior del tubo) que contiene un menor contenido de proteínas y un mayor contenido de metabolitos de bajo peso molecular. Por ende, luego de este procesamiento se obtuvieron los proteomas y metabolomas de los diferentes medios condicionados de los fibroblastos ensayados (CT, SN, y SN+MET). Los medios condicionados fraccionados en sus fracciones de proteoma y metaboloma se llevaron a liofilizar. Debido que la base del medio de cultivo es agua, la liofilización tomo alrededor de 3 días. En la figura 22, se muestra una imagen de los medios condicionados fraccionados luego de la liofilización.

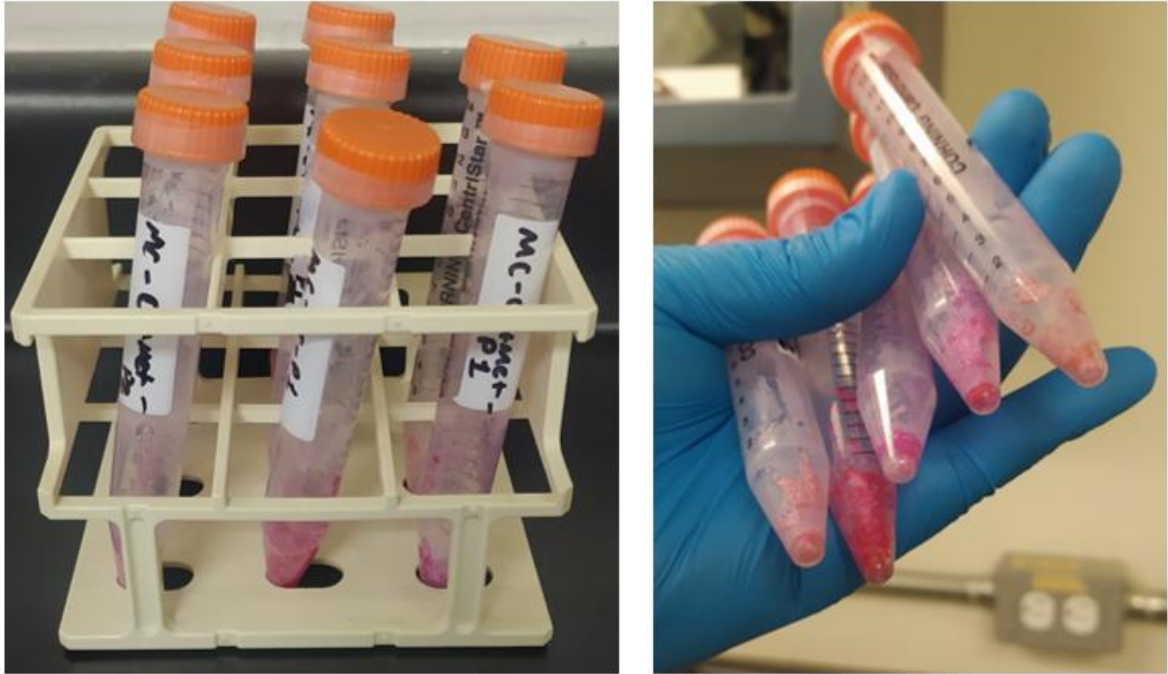


Figura 22. Apariencia física de los medios condicionados fraccionados en sus fracciones de proteoma y metaboloma luego del proceso de liofilización.

Finalmente, los liofilizados de los diferentes medios condicionados fraccionados se almacenaron en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso posterior en los análisis proteómico y metabolómico.

5.6 Realizar el análisis transcriptómico de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina

Una vez obtenidas las condiciones óptimas para la inducción de senescencia en la línea celular IMR90 y evaluado el efecto de la metformina sobre los marcadores de senescencia, se decidió evaluar el efecto de la metformina sobre las células senescentes a nivel transcriptómico. Por este motivo, se generaron dos grupos

de fibroblastos SN con las mismas condiciones, variando únicamente el periodo de incubación post-MMC, donde a uno de estos grupos SN se le adicionó clorhidrato de metformina hasta alcanzar una concentración final de 100 μ M. De esta manera, se contó con dos grupos de fibroblastos: SN y SN+MET. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de ARN total empleando el método del TRIzol que se describió en la sección de metodología. Una vez obtenidos los ARN totales de los fibroblastos, estos se analizaron espectrofotométrica y electroforéticamente para obtener su concentración, pureza e integridad. En la figura 23 se puede observar el gel de electroforesis de los ARNs totales extraídos de las células IMR90 SN y SN+MET. En caso de observarse remanentes de ADN en las muestras, se llevó a cabo una digestión empleando DNasa I, y las muestras se volvieron a analizar por electroforesis luego de la digestión para verificar la desaparición del ADN (Figura 24). Las muestras se decidieron analizar mediante el servicio de transcriptómica de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para el envío de las muestras, se precipitaron alrededor de 10 μ g de ARN total y se enviaron a temperatura ambiente.

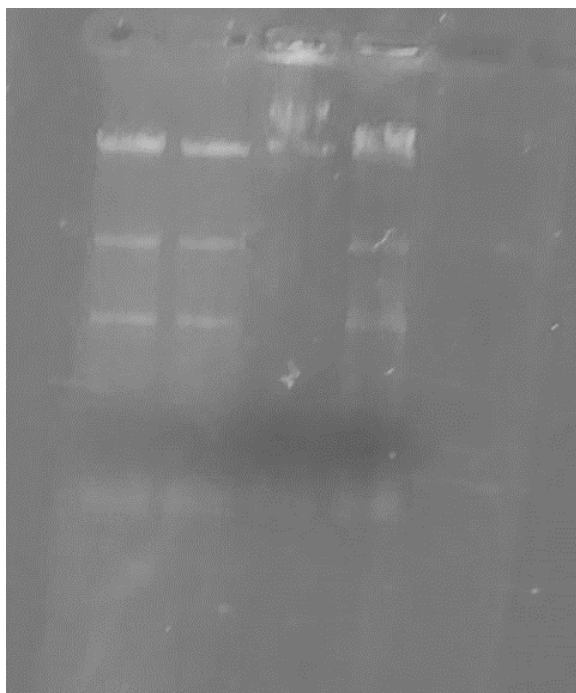


Figura 23. Electroforesis en gel (agarosa al 1%) de los ARNs totales extraídos de células IMR90 senescentes y senescentes tratadas con metformina. El gel de electroforesis se corrió con TAE 1X, y la revelación se dio empleando red gel. La corrida se llevó a cabo empleando un periodo de 5 min con 70V y 30 min con 115V.



Figura 24. Electroforesis en gel (agarosa al 1%) de los ARNs totales extraídos de células IMR90 senescentes y senescentes tratadas con metformina luego de la digestión con DNasa I. El gel de electroforesis se corrió con TBE 0.5X, y la revelación se dio empleando SYBR Green. La corrida se llevó a cabo empleando un periodo de 5 min con 70V y 30 min con 115V.

Las muestras enviadas se hibridaron con dos chips de genes humanos H10KA provenientes del servicio subrogado. Cabe mencionar que previo al proceso de hibridación, los ADN complementarios obtenidos de los ARNs totales de las muestras de fibroblastos SN se marcaron con Alexa555. Por otro lado, los ADN complementarios obtenidos de los ARNs totales de las muestras de fibroblastos SN+MET se marcaron con Alexa647. Las imágenes de los microarreglos al exponerse a la radiación ultravioleta se muestran en la figura 25.

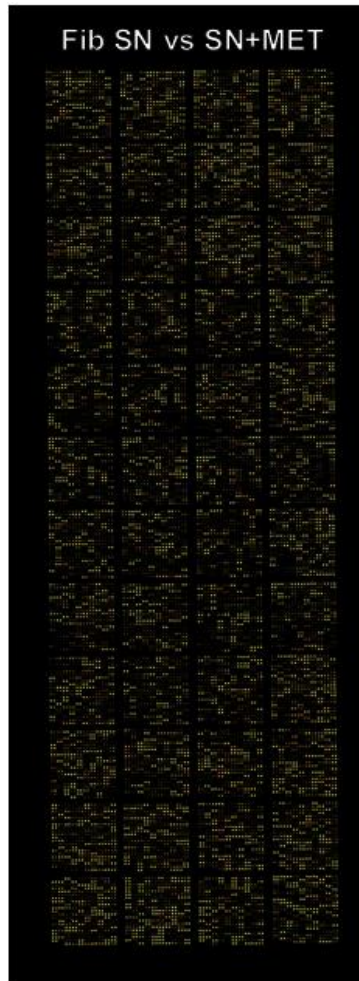


Figura 25. Chips de microarreglos de ADN de la expresión de los fibroblastos SN vs SN+MET.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de las imágenes se analizaron con Genarise. A partir de estos se calcularon los valores de Z-score, y se filtraron únicamente aquellos genes cuya expresión, regulada a la baja o al alza, se encontraba superior a 1.5 desviaciones estándar. Posteriormente, las listas de los genes filtrados se introdujeron en ShinyGO 0.77. Se configuró la herramienta seleccionando al humano como organismo modelo, y aplicando un punto de corte de 0.05 en el False Discovery Rate (FDR) para la búsqueda de vías, ontología génica, u otras categorías de anotación funcional. Se seleccionó un valor de

mínimo 2 y máximo 2000 miembros para el proceso de enriquecimiento. En la figura 26 y 27 se muestran las vías enriquecidas en el ser humano de acuerdo con los genes regulados a la baja y al alza cuyos valores de Z-score se encontraron superiores a 1.5 desviaciones estándar, y con un FDR < 0.05, según la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).

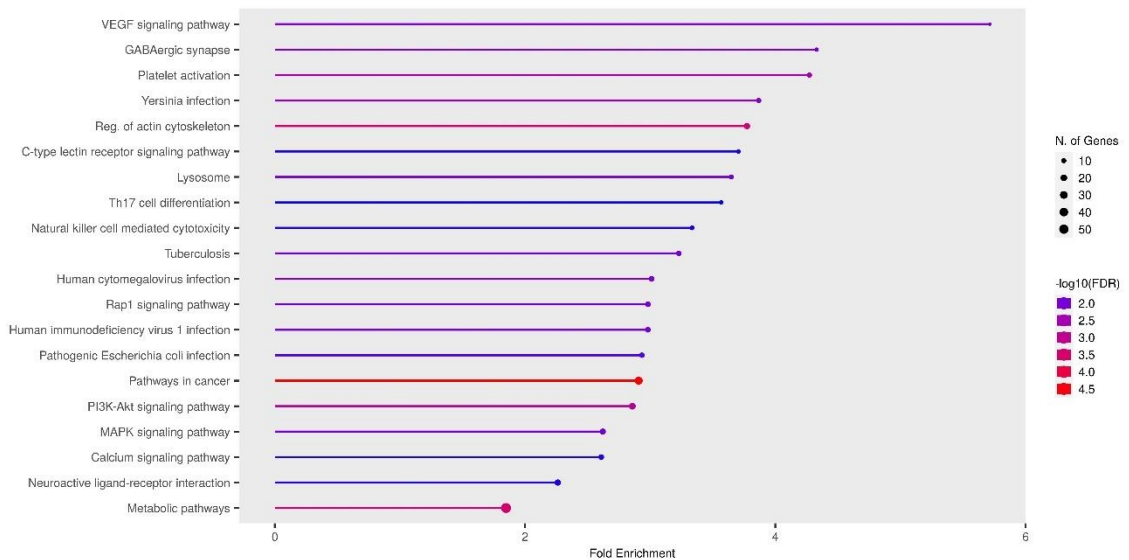


Figura 26. Vías afectadas por la regulación a la baja en la expresión génica de fibroblastos senescentes tratados con metformina en comparación con fibroblastos senescentes no tratados.

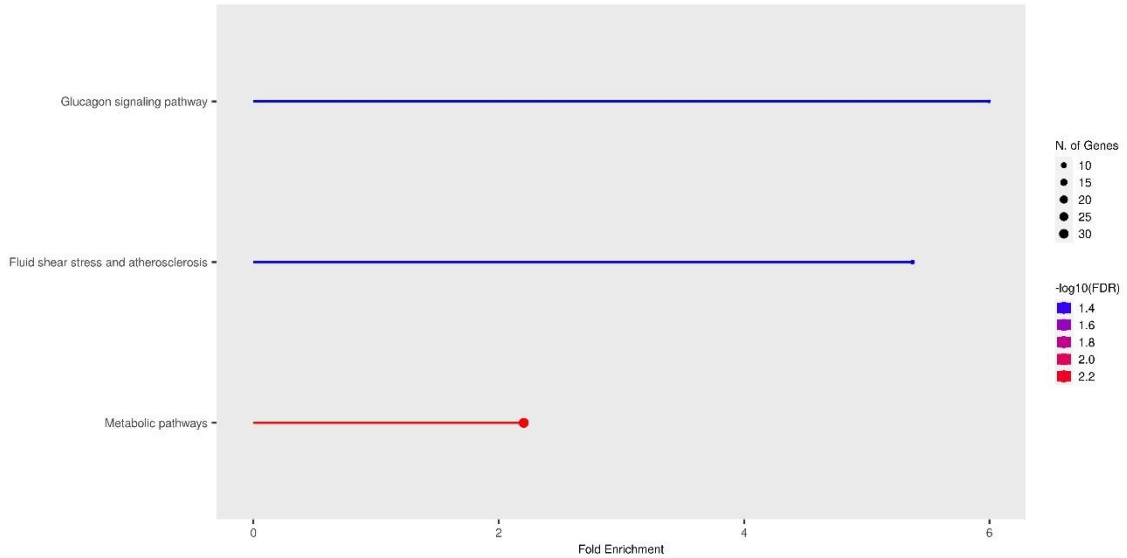


Figura 27. Vías afectadas por la regulación al alza en la expresión génica de fibroblastos senescentes tratados con metformina en comparación con fibroblastos senescentes no tratados.

Como se puede apreciar en la figura 26, el tratamiento con metformina tendió a disminuir la expresión de genes involucrados en la vía de señalización del VEGF, la regulación del citoesqueleto de actina, la fisiología del lisosoma, las vías de señalización PI3K-Akt y MAPK, vías relacionadas al cáncer, vías metabólicas en general, entre otros procesos. Por otro lado, de acuerdo con la figura 27, la metformina también condujo únicamente al aumento en la expresión de algunos genes asociados con la vía de señalización del glucagón, del estrés por cizallamiento y aterosclerosis, y vías metabólicas en general. Toda esta anotación funcional de acuerdo con los algoritmos de enriquecimiento del KEGG. De la misma manera, en las tablas 13 y 14 podemos observar los genes que fueron regulados a la baja y al alza, en los procesos más relevantes para el presente proyecto.

Tabla 13. Genes regulados a la baja en las células IMR90 senescentes por el tratamiento con metformina, desglosados por proceso biológico según KEGG.

Proceso biológico	Genes regulados a la baja
Vías relacionadas al cáncer	GNA13, GNB5, CRK, CSF2RB, DAPK1, ESR1, FGFR2, ARHGEF12, FGF20, FGF21, GLI3, GNAI1, GNG5, IFNA8, IL2, IL2RA, IL4, KNG1, MAX, MLH1, NFKBIA, WNT16, POLK, PRKCG, RAD51, RALA, RARB, BCL2, BMP2, BIRC7, FZD7, ARHGEF1
Vías metabólicas generales	PLA2G4B, CDIPT, SPTLC1, PMVK, B4GAT1, CHIT1, TREH, INMT, CYP2R1, ADH1B, CYP1A1, ABAT, ENO2, ALDH1A1, ALDH2, ALDH1A3, SIRT4, GCAT, TGDS, ALOX12, FUT2, KDSR, GCH1, AMPD3, DHDH, GLUD1, GOT1, GMPPA, PSAT1, IDS, IVD, ME1, MTM1, ATIC, NOS3, NT5E, LAP3, ATP5MC1, PFKP, ATP6V0A1, PNLIPRP1, PNPO, MTMR8, NT5M, BCAT2, SORD, BST1, BTD, UROS, GGCT, ALDH5A1, MOGAT2, HYAL3, COX7A2L, B4GALT6, PCYT1B, ACYP1, CDA, PTDSS1
Reg. de la actina del citoesqueleto	GNA13, CHRM1, CRK, DIAPH1, FGFR2, ITGA11, ARHGEF12, FGF20, FGF21, ITGA5, ITGAL, ITGB4, KNG1, SSH3, SRC, WASL, ARHGEF1
Vía de señalización de PI3K-Akt	GNB5, CHRM1, ERBB3, FGFR2, ITGA11, FGF20, FGF21, GNG5, IFNA8, IL2, IL2RA, IL4, IRS1, ITGA5, ITGB4, NOS3, OSM, BCL2, SYK, THBS4, YWHAZ
Activación de plaquetas	PLA2G4B, GNA13, ARHGEF12, GNAI1, GP1BB, NOS3, P2RX1, MAPK12, SRC, SYK, ARHGEF1
Vía de señalización de VEGF	PLA2G4B, NOS3, PPP3CA, PPP3CC, PRKCG, MAPK12, SRC
Vía de señalización de MAPK	PLA2G4B, CRK, DUSP2, ERBB3, FGFR2, MAPK8IP2, FGF20, FGF21, HSPA6, MAX, IRAK4, PPP3CA, PPP3CC, PRKCG, MAPK12, RAPGEF2
Vía de señalización de RAP1	ADORA2B, CRK, FGFR2, FGF20, FGF21, GNAI1, GRIN2B, ITGAL, PRKCG, RALA, MAPK12, SRC, RAPGEF2
Vía de señalización del calcio	CHRM1, ADORA2B, ERBB3, FGFR2, FGF20, FGF21, MST1R, NOS3, P2RX1, PPP3CA, PPP3CC, PRKCG, TNNC1

Fisiología del lisosoma	AP3S2, AP3M2, CTNS, CTSS, IDS, IGF2R, LAMP1, ATP6V0A1, CLTCL1, HYAL3
-------------------------	--

Tabla 14. Genes regulados al alza en las células IMR90 senescentes por el tratamiento con metformina, desglosados por proceso biológico según KEGG.

Proceso biológico	Genes regulados al alza
Vías metabólicas generales	ME3, DAO, FBP1, HIBCH, GCNT1, B4GALT1, GNS, HSD11B2, HSD17B3, HSD17B4, IMPA1, ALDH6A1, ASS1, MTHFD1, NDUFA9, P4HA1, HSD17B12, PDE3B, ACSL5, QRSL1, MCCC1, PYGL, RPN2, OXCT2, SRM, CA5A, PLA2G7, SUV39H2, LIPF, SYNJ1, PAPSS2, ACY1
Vía de señalización del glucagón	FBP1, PDE3B, PHKB, PHKG1, PRKAA2, PYGL
Estrés por cizallamiento y aterosclerosis	MAPK14, IL1A, IL1R1, ASS1, NFE2L2, PRKAA2, TRPV4

Los resultados mostrados anteriormente concuerdan con algunos hallazgos de la literatura. Por ejemplo, esta reportado que el proceso de autofagia mediado por el lisosoma favorece el desarrollo de senescencia y la adquisición de su fenotipo secretor¹⁰⁸. En el presente proyecto, el tratamiento con metformina (100 μ M) indujo la regulación a la baja de genes relacionados al funcionamiento del lisosoma, sugiriendo que el fármaco efectivamente podría ejercer un efecto modulador sobre las células senescentes. Siguiendo con este supuesto, Sasaki *et al.* (2010) demostraron que la expresión de marcadores lisosomales de autofagia, como LAMP-1, estaban correlacionados a los marcadores de senescencia¹⁰⁹. Los resultados obtenidos aquí, demostraron que el tratamiento con metformina indujo la disminución en la expresión de *LAMP1* en los fibroblastos SN. Otro ejemplo es la regulación a la baja inducida por metformina

del gen *CTSS* que codifica a la catepsina S, una enzima proinflamatoria, que se ha asociado al envejecimiento relacionado al ojo seco¹¹⁰.

Por otro lado, el tratamiento con metformina también fue capaz de disminuir la expresión de genes cuyos productos génicos están involucrados en la señalización. Por ejemplo, *P2RX1* codifica para un receptor purinérgico acoplado a proteínas G que está involucrado en procesos como la comunicación sináptica, la contracción y la apoptosis. Además, se ha visto regulado al alza en enfermedades por envejecimiento metabólicas, neurológicas, inflamatorias, y fibróticas¹¹¹. Otro ejemplo es el gen *SYK* que codifica para una proteína con el mismo nombre que está involucrada en la señalización de plaquetas y distintas células inflamatorias innatas y adaptativas. Se ha visto que luego de su inhibición se dio un efecto antifibrótico y anticancerígeno debido a su participación en procesos como la angiogénesis, inflamación, proliferación, senescencia, etc¹¹².

Con respecto a la modulación transcripcional que la metformina indujo sobre las vías metabólicas podemos observar que disminuyó la expresión del gen *BCAT2*, una aminotransferasa implicada en la producción de aminoácidos de cadena ramificada (L-Leucina, L-Isoleucina y L-Valina). Además, en congruencia con esta observación, el tratamiento con metformina aumento la expresión de genes implicados en la degradación de los aminoácidos de cadena ramificada, conduciendo a la regulación al alza de *OXCT2*, *MCCC1*, *ALDH6A1*, y *HIBCH*.

Por otro lado, la metformina también disminuyó la expresión de *ENO2* y *PFKP* que codifican para la enolasa 2 y la fosfofructocinasa tipo plaquetaria, respectivamente, y condujo al aumento en la expresión de *FBP1* que codifica

para la fructosa bifosfatasa 1, todas enzimas relevantes para los procesos de glucólisis y gluconeogénesis.

Y como último ejemplo, otra vía metabólica que disminuyó a nivel transcripcional fue la biosíntesis de L-arginina, donde los genes regulados a la baja fueron *GLUD1*, *GOT1*, y *NOS3* que codifican para la glutamato deshidrogenasa 1, la transaminasa glutámico-oxaloacético 1, y la óxido nítrico sintasa endotelial. Además, de nuevo se volvió a presentar congruencia entre los resultados, pues algunos de los genes regulados al alza por el tratamiento con metformina pertenecían al metabolismo de L-arginina y L-prolina, incluyendo a los genes *ASS1*, *SRM*, y *P4H41*.

Además del metabolismo, los resultados mostraron que la metformina fue capaz de reducir la expresión de genes asociados a la vía de señalización de las MAPK y la señalización del calcio, dos procesos esenciales en el establecimiento y mantenimiento de las células senescentes, así como en la producción del SASP. Por ejemplo, Simone *et al.* reportaron que la MAPK p38 regula positivamente el desarrollo de senescencia a través del complejo SWI/SNF, un remodelador de la cromatina, al desplazar a los complejos represores Polycomb del locus INK4-ARF, el sitio donde se localizan los genes *CDKN2A* y *CDKN2B*¹¹³. De manera similar, Wang *et al.* reportaron que la MAPK p38 regulaba positivamente la expresión de p16 (*CDKN2A*) a través del reclutamiento de la histona acetiltransferasa p300; mientras que Xu *et al.* reportaron que p38 regulaba positivamente a p53, conduciendo a un aumento en la expresión de p21 (*CDKN1A*)^{114,115}. Los resultados que obtuvimos mostraron que el tratamiento con

metformina fue capaz de disminuir la expresión de la MAPK p38, así como algunos otros componentes de su vía, incluyendo IRAK3/4, MAX, entre otros. Con respecto a la señalización del calcio, Martin *et al.* han reportado incrementos en la concentración de calcio libre intracelular en respuesta a diferentes estímulos de senescencia, y en diferentes modelos celulares¹¹⁶. Asimismo, Wu *et al.* reportaron que la activación de NFAT por la calcineurina inducía el desarrollo de senescencia dependiente de p53 en células de piel¹¹⁷. Estos reportes demuestran la relevancia de la señalización del calcio en el programa de senescencia. Sin embargo, los resultados que obtuvimos demostraron que la metformina fue capaz de disminuir la expresión de calcineurina, así como otros componentes de su vía de señalización, incluyendo la proteína cinasa C, la troponina C, entre otros.

Otro hallazgo relevante de nuestros resultados fue que el tratamiento con metformina fue capaz de llevar a la baja la expresión génica de algunos genes relacionados a vías del cáncer en las células senescentes. Esto fue interesante porque, como la evidencia ha sugerido en los últimos años, las células senescentes comparten algunas características, especialmente a nivel epigenético, con las células cancerígenas, incluso algunos autores han llegado a sugerir que las células senescentes pudieran llegar a ser las precursoras de las células iniciadoras del cáncer^{118,119}. Debido a que el epigenoma tiene gran influencia sobre los procesos bioquímicos y celulares al controlar los perfiles de expresión génica de enzimas, receptores, y proteínas estructurales, es razonable pensar que las células senescentes pudieran presentar una mayor actividad de

vías metabólicas relacionadas al cáncer. La evidencia proporcionada en la tabla 13 demostró que la metformina, a una concentración de 100 μ M, fue capaz de disminuir la expresión de genes involucrados en vías relacionadas al cáncer en el modelo de fibroblastos senescentes.

Finalmente, la exposición a metformina indujo la expresión al alza de algunos genes relacionados a la vía de señalización del glucagón, y del estrés por cizallamiento y aterosclerosis. Por ejemplo, nuestros resultados mostraron que las células senescentes tratadas con metformina expresaban una mayor cantidad de glucógeno fosforilasa y fosforilasa cinasa, dos enzimas relevantes en la glucogenólisis. Esto resulta interesante puesto que, de acuerdo con lo reportado por Seo *et al.* se ha observado que en la senescencia predomina una mayor actividad del proceso glucogenogénico¹²⁰. Además de este hallazgo, se observó que las células senescentes tratadas con metformina mostraron una mayor expresión de AMPK y Nrf2. De acuerdo con Zhan *et al.*, la activación del eje AMPK-TSC2 indujo una disminución y retraso en el desarrollo de senescencia a través de la supresión de mTORC1 en un modelo de senescencia replicativa de células vasculares musculares lisas¹²¹. Por otro lado, Romero *et al.* reportaron que la activación de la vía Nrf2 conducía a una disminución en el desarrollo de senescencia inducida por angiotensina II en células HUVEC¹²².

Tabla 15. Top 20 procesos biológicos regulados a la baja en las células IMR90 senescentes por el tratamiento con metformina según Gene Ontology.

Proceso biológico	FDR	Valor <i>p</i>
Cellular process	4.66E-11	3.63E-15
Positive regulation of cellular process	2.73E-07	4.26E-11
Positive regulation of biological process	3.63E-07	8.48E-11
Metabolic process	8.74E-06	2.72E-09
Regulation of biological process	9.11E-06	3.55E-09
Developmental process	9.52E-06	4.44E-09
Nitrogen compound metabolic process	1.28E-05	6.95E-09
Response to stimulus	1.72E-05	1.07E-08
Biological regulation	1.72E-05	1.15E-08
Regulation of cellular process	4.49E-05	3.62E-08
Organic substance metabolic process	4.49E-05	3.49E-08
Primary metabolic process	6.50E-05	6.07E-08
Anatomical structure development	7.39E-05	7.47E-08
Regulation of cellular metabolic process	8.08E-05	8.81E-08
Cellular metabolic process	8.08E-05	8.96E-08
Positive regulation of cellular metabolic process	8.16E-05	1.02E-07
Regulation of metabolic process	8.46E-05	1.12E-07
Positive regulation of nitrogen compound metabolic process	9.86E-05	1.38E-07
Regulation of primary metabolic process	9.86E-05	1.39E-07
System development	0.00013	1.96E-07

Tabla 16. Top 20 procesos biológicos regulados al alza en las células IMR90 senescentes por el tratamiento con metformina según Gene Ontology.

Proceso biológico	FDR	Valor <i>p</i>
Cellular process	4.66E-11	3.63E-15

A pesar de que los resultados obtenidos tras el análisis funcional de la transcriptómica empleando el KEGG nos brindaron indicios importantes de los procesos afectados por la metformina en el modelo de senescencia, decidimos hacer otro análisis empleando la base de datos del Gene Ontology. Esto debido a que, por lo visto, el KEGG suele sugerir anotaciones muy específicas

relacionados a una enfermedad o procesos fisiológicos complejos como, por ejemplo, la fisiología del lisosoma o la activación de plaquetas. Por otro lado, el Gene Ontology, dependiendo de la categoría, hace anotaciones más generales, pero no relacionadas a una enfermedad o proceso fisiológico particular, y estas pueden ser a nivel de función molecular, de proceso biológico, o de componente celular. De esta manera, pudimos sacar más provecho de los resultados obtenidos durante la transcriptómica de los fibroblastos SN y SN+MET.

Como se pudo apreciar en las tablas 15 y 16, hubo concordancia entre la anotación funcional del Gene Ontology, los resultados del KEGG, y los patrones de expresión génica. Por ejemplo, el Gene Ontology destaca la influencia negativa de la metformina sobre los procesos metabólicos de los compuestos nitrogenados, y la regulación positiva de los procesos metabólicos de los compuestos nitrogenados, y como se mencionó previamente, el fármaco fue capaz de disminuir la expresión de genes asociados a la biosíntesis de L-arginina, e incrementar la expresión de genes implicados en su metabolismo.

5.7 Realizar el análisis proteómico de los secretomas provenientes de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina

Al haber obtenido los diferentes proteomas derivados de los medios condicionados, se llevó a cabo una electroforesis en gel empleando un gel de poliacrilamida al 10% a manera de evaluación preliminar, para ver la distribución de las proteínas contenidas en cada proteoma obtenido. Las muestras se

corrieron empleando buffer Tris-Glicina-SDS (TGS) a un voltaje de 80 V por 20 minutos, y posteriormente, a 120 V por 90 min. Luego de esto, el gel se tiñó por 60 minutos en agitación a 40 rpm. Finalmente, el gel se destiñó en tres periodos de 30 minutos a 40 rpm, y posteriormente, en un periodo de toda la noche a la misma agitación. En la figura 28 se muestra el gel de electroforesis obtenido.

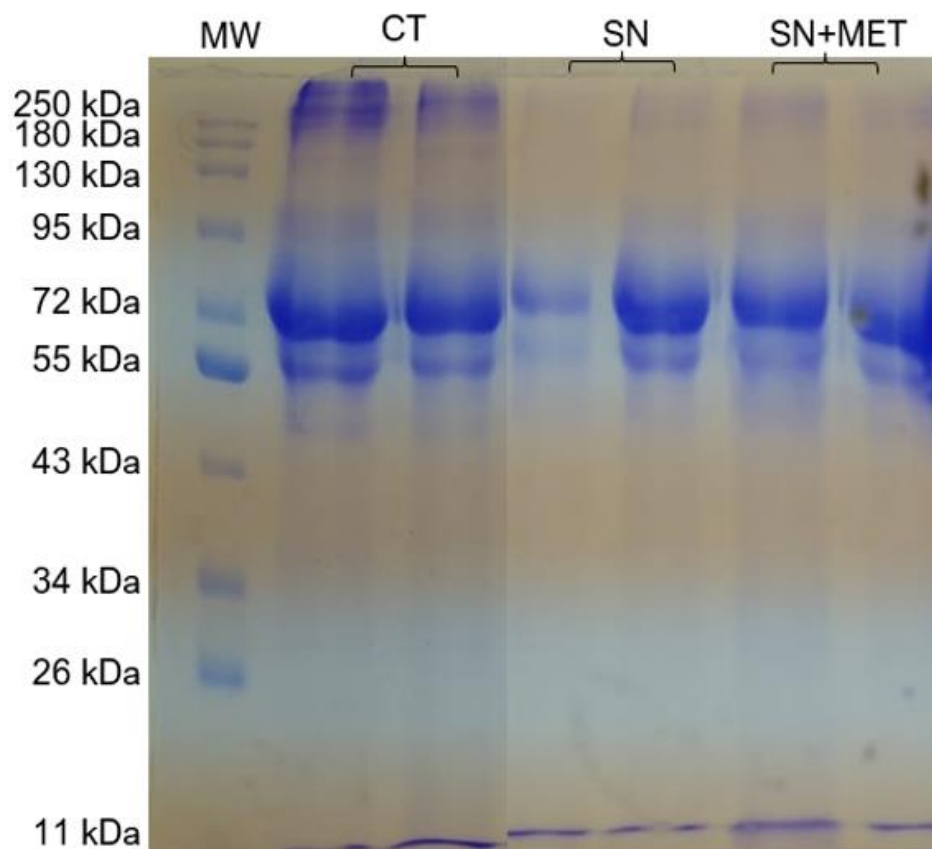


Figura 28. Gel de electroforesis de los proteomas derivados de los medios condicionados obtenidos de fibroblastos IMR90 senescentes o no, tratados o no con metformina.

Luego de obtener los diferentes medios condicionados, procesarlos para separar y concentrar el proteoma, y liofilizarlos, todos los medios condicionados de

fibroblastos se analizaron por la técnica de huella peptídica en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los resultados de la caracterización proteómica de los secretomas de los fibroblastos CT, SN y SN+MET se muestran a continuación en las tablas 17, 18, y 19, respectivamente.

Tabla 17. Proteínas identificadas mediante la técnica de huella peptídica en el secretoma de fibroblastos CT.

Nombre de la proteína	Entrada en UniProt	Peso molecular (kDa)	Péptidos identificados
Tripsina de <i>Sus scrofa</i>	TRYP_PIG	24.393	18
Glicoproteína α 2-Heremans-Schmid de <i>Bos taurus</i>	FETUA_BOVIN	38.394	5
Albumina sérica de <i>Bos taurus</i>	ALBU_BOVIN	69.248	19
Proteína bifuncional de la biosíntesis de coenzima A de <i>Parabacteroides merdae</i>	A0A3R6M2U7_9BACT	43.242	7
Proteína de choque por frío de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A0A086BXT9_PSEAI	20.293	1

Tabla 18. Proteínas identificadas mediante la técnica de huella peptídica en el secretoma de fibroblastos SN.

Nombre de la proteína	Entrada en UniProt	Peso molecular (kDa)	Péptidos identificados
Tripsina de <i>Sus scrofa</i>	TRYP_PIG	24.393	27
Glicoproteína α 2-Heremans-Schmid de <i>Bos taurus</i>	FETUA_BOVIN	38.394	24
Albumina sérica de <i>Bos taurus</i>	ALBU_BOVIN	69.248	65
Albumina sérica de <i>Felis catus</i>	ALBU_FELCA	68.615	18
Proteína de unión a PRE del aislado 3D7 de <i>Plasmodium falciparum</i>	Q8IJS7_PLAF7	131.544	3
Queratina 14 tipo 1 de <i>Homo sapiens</i>	K1C14_HUMAN	51.529	17
Queratina 1 tipo 2 de <i>Pan troglodytes</i>	K2C1_PANTR	65.449	38
Queratina 9 tipo 1 de <i>Homo sapiens</i>	K1C9_HUMAN	62.026	22

Proteína no caracterizada de <i>Streptococcus spp.</i>	T0U4U9_9STRE	139.340	4
--	--------------	---------	---

Tabla 19. Proteínas identificadas mediante la técnica de huella peptídica en el secretoma de fibroblastos SN+MET.

Nombre de la proteína	Entrada en UniProt	Peso molecular (kDa)	Péptidos identificados
Tripsina de <i>Sus scrofa</i>	TRYP_PIG	24.393	18
Glicoproteína α 2-Heremans-Schmid de <i>Bos taurus</i>	FETUA_BOVIN	38.394	12
Albumina sérica de <i>Bos taurus</i>	ALBU_BOVIN	69.248	55
Actina beta gamma 1 de <i>Emmonsia crescens</i>	A0A0G2IEA2_9EURO	41.582	4

Como se puede observar en las tablas 17, 18 y 19, el número de proteínas identificadas en los secretomas fue muy bajo comparado a lo esperado y a lo reportado en la literatura⁸⁹. Las tres principales razones por las que se pudieron haber obtenido estos resultados se discuten a continuación.

La primera razón puede ser la contaminación de los secretomas con proteínas de la piel debido a un mal manejo al momento de la recolección, procesamiento o análisis de la muestra. Esta suposición surge debido a la presencia de queratinas de la piel, que es indicativo de una contaminación por manejo de las muestras sin guantes. Cabe mencionar que, al momento de su recolección y procesamiento, los procedimientos se llevaron a cabo empleando guantes de nitrilo para reducir la contaminación con queratinas. No obstante, es posible que no haya sido suficiente y se debieron emplear mejores estrategias.

La segunda razón, y por la que aparece la tripsina en los resultados de todas las muestras, es debido a que esta se utiliza como reactivo en el procesamiento de los secretomas para generar los péptidos que se analizarán mediante espectrometría de masas.

La tercera razón es que el análisis por espectrometría de masas de los péptidos generados a partir de los secretomas se haya llevado de una manera incorrecta o inadecuada. Esto se sospecha debido a que tuvimos la oportunidad de analizar una banda del secretoma de fibroblastos CT mediante espectrometría de masas en la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica del CINVESTAV Unidad Zacatenco. Los resultados de dicho análisis de se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Proteínas identificadas mediante la técnica de huella peptídica en una banda derivada del gel de electroforesis del secretoma de fibroblastos CT.

Nombre de la proteína	Entrada en UniProt	Peso molecular (kDa)	Péptidos identificados
Proteína ig-h3 inducida por TGF- β	BGH3_HUMAN	75.308	11
Proteína 3 relacionada a Dickkopf	DKK3_HUMAN	39.587	8
Isoforma 2 de la colagenasa tipo IV de 72 kDa	MMP2_HUMAN	66.620	10
RNA helicasa DDX3X dependiente de ATP	DDX3X_HUMAN	73.642	9
Proteína 3 asociada a la subunidad reguladora CDK5	CK5P3_HUMAN	57.262	5
Subunidad beta de hemoglobina	HBB_HUMAN	16.112	3
Complemento C3	CO3_HUMAN	188.688	21
Mucina 6	MUC6_HUMAN	263.324	14
Albumina	A0A0C4DGB6_HUMAN	71.222	6
Dermcidina	DCD_HUMAN	11.397	2
Antígeno 5 asociado al esperma	SPAG5_HUMAN	135.790	18
Proteína inducible por prolactina	PIP_HUMAN	16.857	5
Enzima conjugadora de ubiquitina E2 G1	UB2G1_HUMAN	19.623	3
α 2-Glicoproteína 1 de unión a Zinc	C9JEV0_HUMAN	26.524	4

Proteína de repetición del dipéptido del ácido glutámico-arginina	RERE_HUMAN	173.564	13
Miembro 3 de la familia AF4/FMR2	AFF3_HUMAN	134.643	14
Isoforma 3 de la proteína cinasa activada por mitógeno 8	MK08_HUMAN	44.421	6
Proteína 12 contenedora de dominios de repetición de Anquirina	ANR12_HUMAN	237.191	17
Afadina	AFAD_HUMAN	207.831	16
Miembro 4B de la familia G que contiene dominios de homología de Pleckstrina	PKH4B_HUMAN	141.663	22
Isoforma 2 de la proteína ABHD12B	AB12B_HUMAN	32.283	3
Proteína piccolo	PCLO_HUMAN	562.525	44
Proteína diana de señalización lateral 2 homólogo	LST2_HUMAN	98.315	7
Oxidasa dual 1	DUOX1_HUMAN	178.832	16
Factor de licenciamiento de replicación del DNA MCM4	A0A3B3ITP6_HUMAN	83.624	5
Isoforma 2 de la proteína que contiene dominios de unión a calcio 13	EFC13_HUMAN	89.371	11
Miembro 8I de la subfamilia putativa golgin A	GOG8I_HUMAN	71.843	5
Proteína del material pericentriolar 1	PCM1_HUMAN	230.198	20
Citocromo P450 4Z1	CP4Z1_HUMAN	59.656	4
Nesprina 2	A0A0C4DGK3_HUMAN	411.581	33
Vitronectina	VTNC_HUMAN	55.104	5
Isoforma 2 del Glipican 3	GPC3_HUMAN	60.331	4
Isoforma 3 de la proteína 88 de transporte intraflagelar	IFT88_HUMAN	92.951	7
Proteína 6 que contiene el dominio SWIM	ZSWM6_HUMAN	135.181	8
Epiplakina	EPIPL_HUMAN	558.111	23
Subunidad NBAS del complejo NRZ	NBAS_HUMAN	271.879	22
Rootletina	CROCC_HUMAN	228.823	22
Proteína dedo de zinc 614	ZN614_HUMAN	68.982	4
Proteína Red	RED_HUMAN	65.716	8
Proteína que interactúa con el receptor de tiroides 11	TRIPB_HUMAN	228.271	23

Como se pudo apreciar, el número de proteínas identificadas en una única banda del gel de electroforesis rondaba los 40 miembros. Con base en esto sería lógico

suponer que en la muestra completa deberíamos obtener un mayor número, puesto que en el gel de electroforesis de la figura 24 se pueden apreciar diversas bandas. Además, todas las proteínas que se identificaron de esta banda se relacionaron al *Homo sapiens*, que es el organismo modelo del cual se obtuvieron las proteínas, mientras que en los análisis de las muestras completas aparecieron especies diferentes, incluso especies que no se encuentran en la localidad, como lo es *Pan troglodytes*, el chimpancé. Lamentablemente, no se pudieron enviar bandas de los secretomas de fibroblastos SN y SN+MET para poder hacer una comparación directa con los resultados mostrados en la tabla 16 de la banda de fibroblastos CT.

5.8 Realizar el análisis metabolómico de los secretomas provenientes de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina

De manera similar al análisis proteómico, una vez que se obtuvieron los diferentes metabolomas de los tres grupos experimentales, se procedió al análisis metabolómico mediante RMN-¹H. Como se mencionó en la sección 4.4.8 de metodología, los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales, perteneciente al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Unidad Mérida. En esa misma sección se describe el procedimiento y los datos experimentales pertinentes a la identificación y cuantificación de los metabolitos mediante la técnica de RMN-¹H. Del análisis metabolómico se identificaron 44 metabolitos en el grupo CT, 43 metabolitos en

el grupo SN, y 44 metabolitos en el grupo SN+MET, todos estos con un puntaje de confianza de 7 o superior. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis estadístico de la cuantificación de los metabolomas, así como la anotación funcional de estos empleando las herramientas de MetaboAnalyst 5.0.

En la figura 29, se muestran los resultados del agrupamiento mediante K-means para la formación de 3 conjuntos. Se pudo llegar a observar que, de acuerdo con su composición, las muestras fueron agrupadas correctamente como se esperaba, es decir, todas las muestras del grupo CT se agruparon en un conjunto, así mismo para los grupos SN y SN+MET. Esto resalta el hecho de que, a nivel metabolómico, las muestras tienen concordancia entre sí dependiendo del grupo a donde pertenecen.

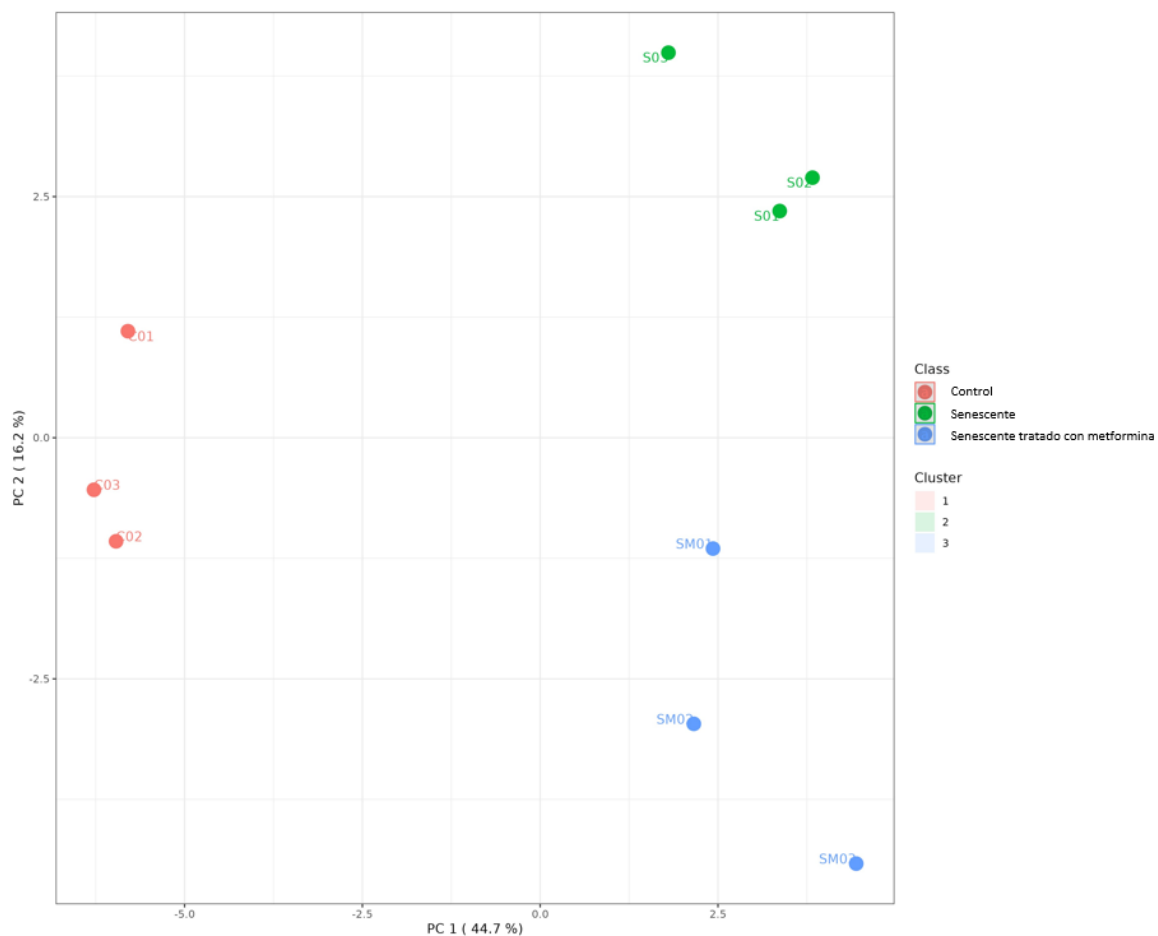


Figura 29. Agrupamiento de las muestras de los diferentes metabolomas de fibroblastos CT, SN y SN+MET, mediante el método de K-means para la formación de 3 conjuntos.

Además del agrupamiento por K-means, las muestras se sometieron a un agrupamiento jerárquico para ver las similitudes entre ellas, de acuerdo con la composición de su metaboloma. En la figura 30 se muestra el agrupamiento jerárquico que se obtuvo al usar la distancia euclidiana y el método de Ward como parámetros de configuración.

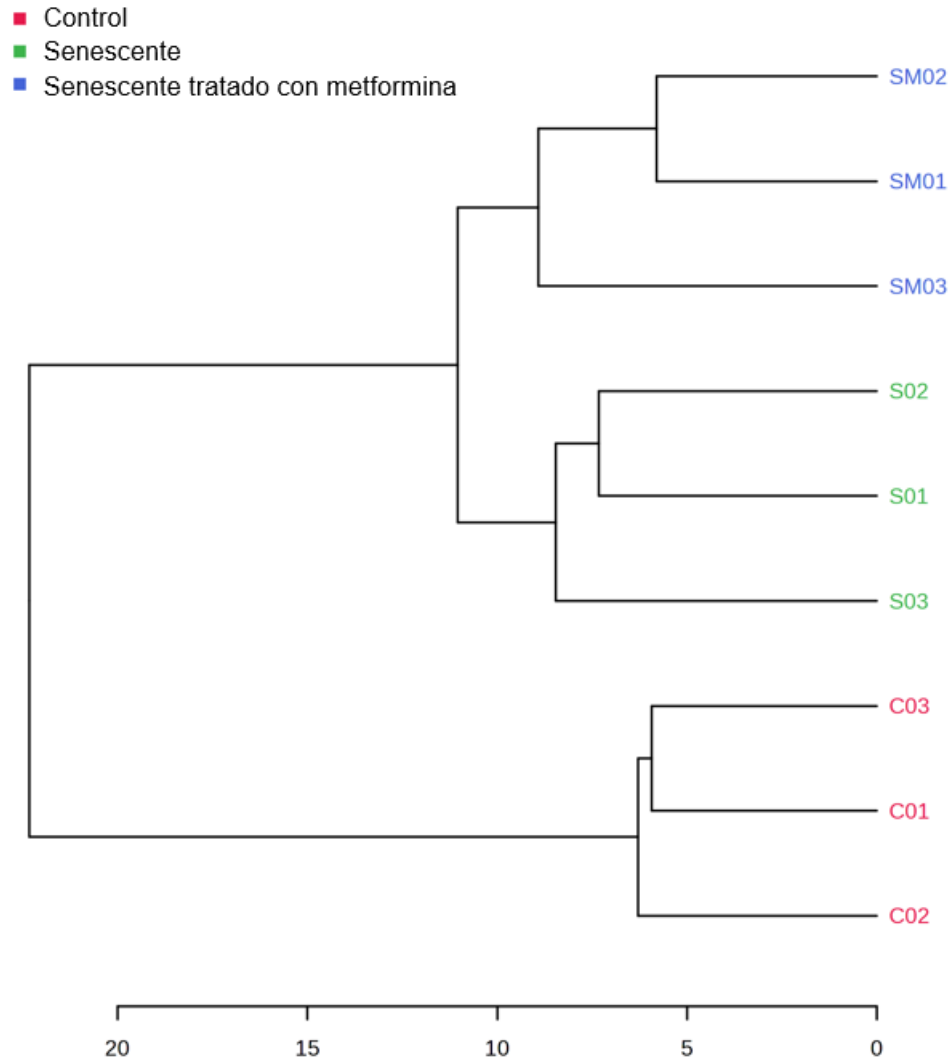


Figura 30. Dendrograma del agrupamiento jerárquico de las muestras de los diferentes metabolomas de los fibroblastos CT, SN y SN+MET.

Debido a que el fenotipo senescente involucra muchos cambios bioquímicos y moleculares esenciales para su establecimiento y mantenimiento, es de esperar que haya cambios en los metabolitos secretados al compararse con las células de fenotipo no senescente. En efecto, la figura 30 evidenció que los fibroblastos SN, independientemente del tratamiento con metformina, siguen siendo relativamente diferentes a los fibroblastos CT como era de esperarse. No

obstante, y aunque existen similitudes de acuerdo con el agrupamiento jerárquico, los fibroblastos SN+MET presentan diferencias en su metaboloma debido a como se agruparon como un conjunto bien diferenciado de los fibroblastos SN. A nivel metabolómico, esto pudiera sugerir que la metformina no está alterando de manera global el fenotipo senescente, pero si pudiera estar modulando su metabolismo a través de la regulación transcripcional como se demostró en secciones anteriores.

Para indagar de una mejor manera en los efectos de la metformina sobre el fenotipo senescente se analizaron los resultados obtenidos de la identificación y la cuantificación de los metabolomas de los distintos grupos. En la tabla 21 se muestran los resultados estadísticamente significativos del ANOVA de un factor incluyendo los análisis post-hoc para observar los contrastes entre grupos, realizados mediante la prueba de Tukey.

Tabla 21. Metabolitos diferencialmente alterados y estadísticamente significativos ($p < 0.05$ y $FDR < 0.05$) de los metabolomas de fibroblastos CT, SN o SN+MET de acuerdo con el ANOVA de un factor y el consecuente análisis post-hoc mediante prueba de Tukey.

Metabolito	Valor p	Valor FDR	Diferencias según el análisis post-hoc
L-Metionina	2.3057e-07	1.0837e-05	SN vs CT; SN+MET vs CT
Ácido L-láctico	3.7728e-06	8.8662e-05	SN vs CT; SN+MET vs CT
Ácido 3-hidroxibutírico	3.24e-05	0.00043939	SN vs CT; SN+MET vs CT
Ácido 2-hidroxibutírico	3.7395e-05	0.00043939	SN vs CT; SN+MET vs CT; SN vs SN+MET
Ácido isobutírico	0.00013026	0.0012245	SN+MET vs CT; SN+MET vs SN
Ácido piroglutámico	0.00015951	0.0012495	SN vs CT; SN+MET vs CT; SN vs SN+MET
Ácido acético	0.00022976	0.0015427	SN vs CT; SN+MET vs CT
L-Isoleucina	0.0010065	0.0057824	SN+MET vs CT; SN+MET vs SN
L-Histidina	0.0011073	0.0057824	SN vs CT; SN+MET vs SN
Formiato	0.0014011	0.0065851	SN vs CT; SN+MET vs CT
Glicina	0.0017797	0.0071182	SN vs CT; SN+MET vs CT
Dimetilamina	0.0018174	0.0071182	SN vs CT; SN+MET vs SN
Metanol	0.0031467	0.011376	SN vs CT; SN+MET vs CT

D-Glucosa	0.0046523	0.015618	SN vs CT; SN+MET vs CT
L-Valina	0.0075649	0.023703	SN+MET vs CT
Hipoxantina	0.013571	0.037123	SN vs CT
Ácido cítrico	0.013703	0.037123	SN vs CT
L-Fenilalanina	0.014218	0.037123	SN vs CT; SN+MET vs CT
Colina	0.016438	0.040661	SN vs CT; SN+MET vs CT
L-Triptófano	0.017772	0.041763	SN+MET vs CT; SN+MET vs SN
L-Treonina	0.021693	0.048552	SN vs CT

Como se pudo observar en la tabla 20, solo 21 metabolitos se vieron diferencialmente alterados de los más de 40 que se identificaron y cuantificaron para cada grupo. Por ejemplo, la D-glucosa se vio diferencialmente alterada y demostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el grupo CT y los dos grupos SN o SN+MET (Figura 31). En efecto, este resultado coincidió con lo esperado puesto que las células CT siguen conservando su capacidad proliferativa, y está demostrado que las células en proliferación muestran un elevado consumo y flujo de glucosa hacia la glucólisis para la generación de energía y la formación de esqueletos carbonados esenciales para la formación de nucleótidos y aminoácidos. Sin embargo, debido a que las células senescentes son incapaces de proliferar, se espera que las concentraciones de glucosa sean altas, como lo demostró la evidencia presentada en la figura 31.

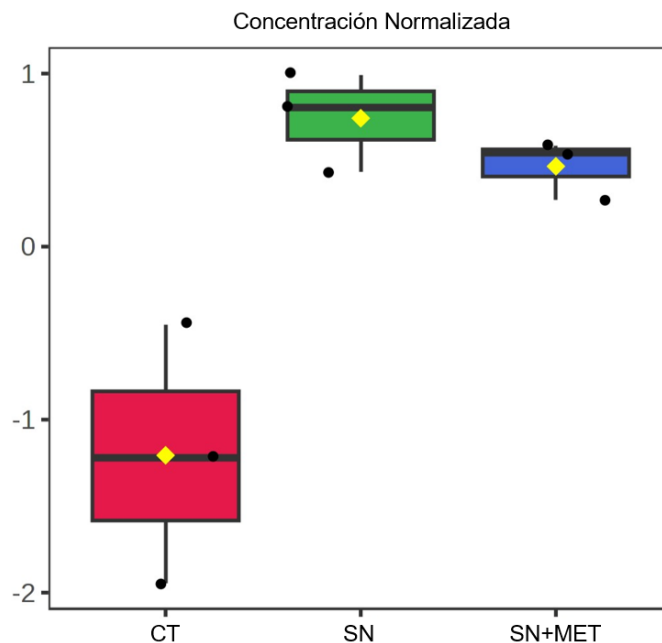


Figura 31. Análisis estadístico (ANOVA) de la concentración de D-glucosa presente en los metabolomas de los fibroblastos CT, SN y SN+MET. En el eje de las ordenadas se muestran las concentraciones autoescaladas luego de centrarse con respecto a la media aritmética y dividirse entre la desviación estándar de cada variable.

Además de la disminución en la concentración de glucosa, es común que las células en proliferación generen niveles elevados de ácido L-láctico debido a que la fermentación homoláctica suele permitir que la glucólisis se mantenga a un ritmo elevado debido a la regeneración del NAD⁺ que ofrece la reducción del piruvato a lactato. Por este motivo, era de esperar que las células CT mostraran niveles elevados de ácido L-láctico en comparación a las células SN o SN+MET, por el mismo motivo expuesto con anterioridad. En efecto, la figura 32 demostró que la concentración de ácido L-láctico era más elevada, y estadísticamente significativa, en el grupo CT, en comparación a los grupos senescentes.

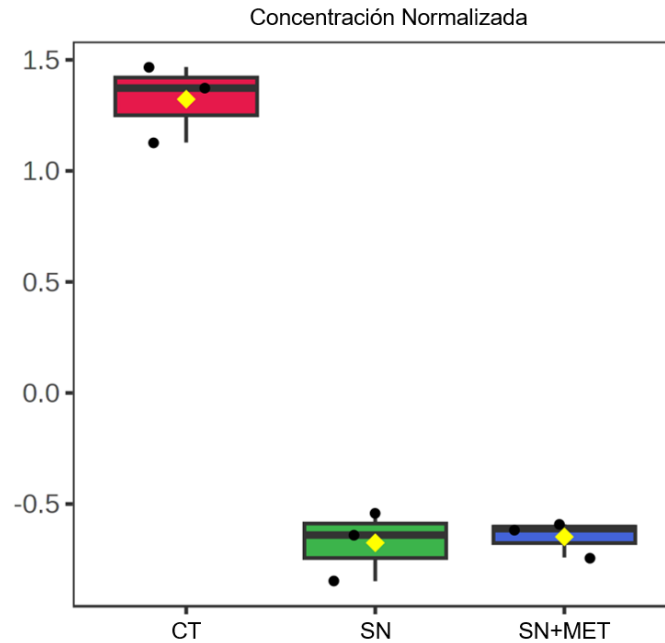


Figura 32. Análisis estadístico (ANOVA) de la concentración de ácido L-láctico presente en los metabolomas de los fibroblastos CT, SN y SN+MET. En el eje de las ordenadas se muestran las concentraciones autoescaladas luego de centrarse con respecto a la media aritmética y dividirse entre la desviación estándar de cada variable.

De nuevo, la metformina no parece influir sobre la incapacidad de las células senescentes de proliferar, puesto que el grupo SN+MET no mostró niveles más bajos de D-glucosa o niveles más altos de ácido L-láctico estadísticamente significativos comparado con el grupo SN.

No obstante, para indagar de una manera más adecuada en las vías metabólicas afectadas por la metformina en los fibroblastos SN, se decidió hacer un análisis de anotación funcional empleando los datos de metabolómica, aunque ahora se limitó el ensayo a los resultados de los grupos SN y SN+MET. Para esto se hizo uso de la sección “Enrichment Analysis” de MetaboAnalyst 5.0, donde se

introdujeron las listas de los metabolitos diferencialmente alterados entre los metabolomas de los fibroblastos SN y SN+MET. Además, se seleccionó que el análisis de sobrerrepresentación que genera la herramienta de enriquecimiento tomará como base al KEGG, y que tomará al menos dos metabolitos como criterio de enriquecimiento. En la tabla 22 se muestran los resultados del análisis de las vías metabólicas enriquecidas por los metabolitos diferencialmente alterados. De manera similar, una representación gráfica de las vías metabólicas enriquecidas se muestra en la figura 33.

Tabla 22. Resultados del análisis de enriquecimiento que muestra las vías metabólicas enriquecidas con base en los metabolitos diferencialmente alterados entre los metabolomas de los fibroblastos SN y SN+MET, y sus parámetros estadísticos.

Vía metabólica alterada	Estado de asociación	Valor p	Valor FDR	Metabolitos de la vía metabólica
Biosíntesis de aminoacil-tRNA	5/48	4.84E-7	4.07E-5	L-Histidina, L-Valina, L-Isoleucina, L-Treonina, y L-Triptófano
Biosíntesis de valina, leucina e isoleucina	3/8	3.22E-6	1.35E-4	L-Treonina, L-Isoleucina, y L-Valina
Degradación de valina, leucina e isoleucina	2/40	0.0128	0.358	L-Valina y L-Isoleucina
Metabolismo de histidina	1/16	0.0729	1.0	L-Histidina
Biosíntesis de pantotenato y CoA	1/19	0.0866	1.0	L-Valina
Metabolismo de la beta-Alanina	1/21	0.0957	1.0	L-Histidina
Metabolismo del propanoato	1/23	0.105	1.0	Ácido 2-hidroxibutírico
Metabolismo del glutatión	1/28	0.128	1.0	Ácido piroglutámico
Metabolismo de la glicina, serina y treonina	1/33	0.15	1.0	L-Treonina
Metabolismo del triptófano	1/41	0.187	1.0	L-Triptófano

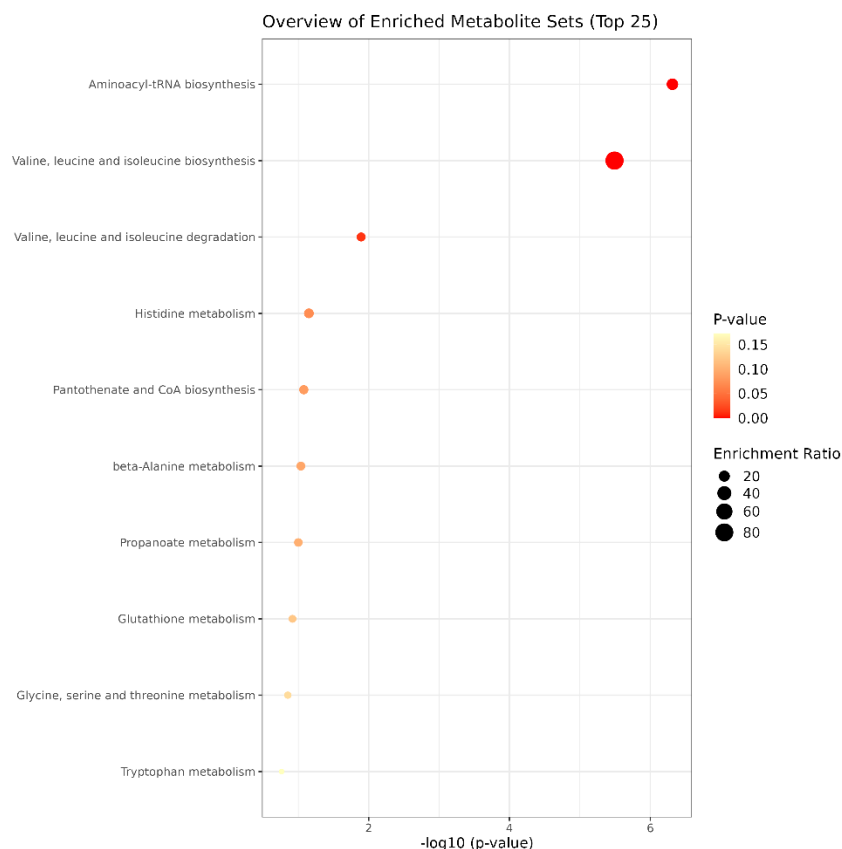


Figura 33. Resultados del análisis de sobrerrepresentación que muestra las vías metabólicas enriquecidas con base en los metabolitos diferencialmente alterados entre los metabolomas de los fibroblastos SN y SN+MET, y que se muestran de forma gráfica.

Como se pudo apreciar en la tabla 22 y en la figura 33, los cambios en las concentraciones de los metabolitos diferencialmente alterados en los metabolomas de fibroblastos SN y SN+MET se asociaron con enriquecimientos en la biosíntesis de aminoacil-tRNAs y en la biosíntesis de valina, leucina e isoleucina. Estos enriquecimientos fueron estadísticamente significativos pues los valores p y los FDR eran menores de 0.05. Además de estas dos vías metabólicas, se presentaron enriquecimientos estadísticamente significativos en otras vías metabólicas como el metabolismo de la histidina, el metabolismo del

triptófano, entre otros. Sin embargo, estos solo fueron significativos considerando el valor p, pues los valores de FDR superaron el valor de corte de 0.05. Por este motivo, no sería válido considerarlos.

Una vez finalizado el análisis funcional de los metabolomas, se decidió llevar a cabo un análisis de unión de vías en MetaboAnalyst para generar una mejor anotación basándose en los resultados obtenidos en los transcriptomas de los fibroblastos y los metabolomas de sus secretomas correspondientes. La metodología y los parámetros del análisis se mencionaron previamente en la sección 4.4.8. En la tabla 23 se muestran las vías enriquecidas obtenidas en el análisis de unión de vías.

Tabla 23. Resultados del análisis de unión de vías que muestra las vías metabólicas sobrerrepresentadas con base en los metabolitos diferencialmente alterados entre los metabolomas y los genes diferencialmente expresados de los fibroblastos SN y SN+MET, y sus parámetros estadísticos.

Vía metabólica alterada	Estado de asociación	Valor p	Valor FDR	Impacto
Biosíntesis de valina, leucina, e isoleucina	4/12	9.8242E-4	0.082523	1.0
Degradación de valina, leucina, e isoleucina	10/88	0.0024667	0.1036	0.35632
Metabolismo de beta-Alanina	6/44	0.007738	0.21666	0.37209
Glucólisis o gluconeogénesis	7/61	0.010553	0.22162	0.36667
Biosíntesis de arginina	4/27	0.021823	0.35943	0.46154
Metabolismo del nicotinato y nicotinamida	5/42	0.025673	0.35943	0.2439
Metabolismo de arginina y prolina	7/78	0.036493	0.41482	0.27273
Metabolismo del retinol	5/47	0.039507	0.41482	0.34783
Metabolismo de glicolípidos	4/35	0.050927	0.4529	0.35294

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 23, algunas vías metabólicas enriquecidas y con valores $p < 0.05$ se mantuvieron, mientras que otras nuevas se sumaron a la lista. Sin embargo, todas mostraron valores de FDR mayores de 0.05, por lo que no deberían considerarse válidas, incluso la biosíntesis de valina, leucina, e isoleucina que previamente había superado el punto de corte. No obstante, el valor de FDR para esta última vía se acerca lo suficiente al valor de 0.05 como para sugerir una tendencia hacia la significancia estadística.

5.9 Realizar el análisis transcriptómico de células MCF-7 expuestas a los secretomas provenientes de fibroblastos senescentes tratados o no con metformina

Para indagar acerca de los efectos moleculares ejercidos por los diferentes medios condicionados, específicamente el MC-SN-C y el MC-SN+MET-C, sobre una línea celular de cáncer, se decidió exponer a dos grupos de células MCF-7 a los dos medios condicionados por separado, por dos días, conforme a lo descrito en la sección de metodología. Una vez cumplidos los tiempos de exposición de las células MCF-7, se les extrajo el ARN total con el método del TRIzol, y este se caracterizó mediante técnicas espectrofotométricas y electroforéticas para obtener la concentración, pureza e integridad de las muestras (Figura 34). En caso de presencia de ADN en las muestras, estas se digirieron mediante DNasa I, y se volvieron a analizar mediante electroforesis para corroborar la eliminación del ADN (Figura 35). Finalmente, las muestras de

ARN se precipitaron conforme lo descrito en la sección de metodología, y se enviarán a la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología de la Universidad Nacional Autónoma de México para su análisis.



Figura 34. Gel de electroforesis (agarosa al 1%) de los ARNs totales extraídos de células MCF-7 tratadas con los secretomas recolectados de células senescentes tratadas o no con metformina. El gel se corrió con TAE 1X, y la revelación se dio con red gel. La corrida se llevó a cabo empleando un periodo de 5 min con 70V y 30 min con 115V.

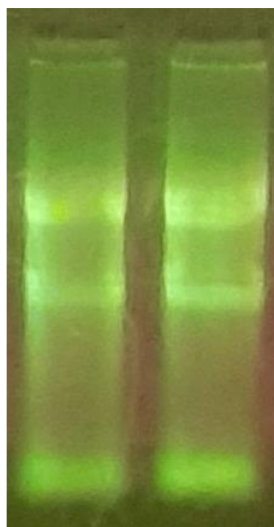


Figura 35. Gel de electroforesis (agarosa al 1%) de los ARNs totales extraídos de células MCF-7 tratadas con los secretomas recolectados de células senescentes tratadas o no con metformina, luego de la digestión con DNasa I. El gel se corrió con TBE 0.5X, y la revelación se dio con SYBR Green. La corrida se llevó a cabo empleando un periodo de 5 min con 70V y 30 min con 115V.

Las muestras enviadas se hibridaron con dos chips de genes humanos H10KA provenientes del servicio subrogado. Cabe mencionar que previo al proceso de hibridación, los ADN complementarios obtenidos de los ARNs totales de las muestras de células MCF-7 tratadas con el secretoma de fibroblastos SN se marcaron con Alexa555. Por otro lado, los ADN complementarios obtenidos de los ARNs totales de las muestras de células MCF-7 tratadas con el secretoma de fibroblastos SN+MET se marcaron con Alexa647. Las imágenes de los microarreglos al exponerse a la radiación ultravioleta se muestran en la figura 36.

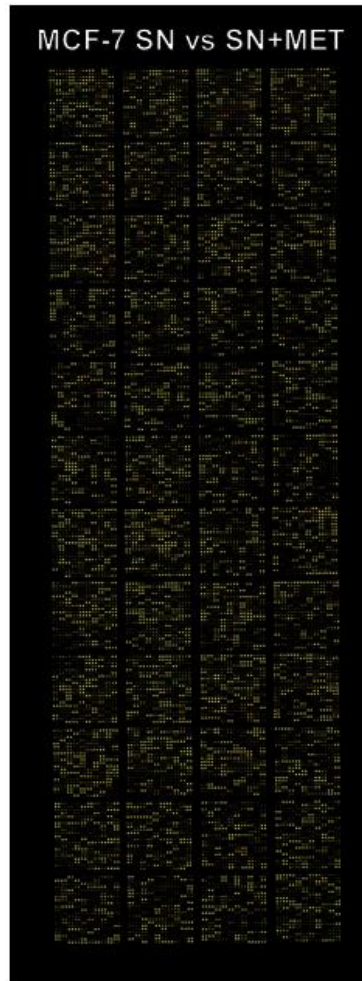


Figura 36. Chips de microarreglos de ADN de la expresión de las células MCF-7 tratadas con los secretomas de fibroblastos SN vs SN+MET.

Al igual que con el análisis transcriptómico de los fibroblastos senescentes, los resultados obtenidos de la cuantificación de las imágenes se analizaron con Genarise, y a partir de estos se calcularon los valores de Z-score, y se filtraron únicamente aquellos genes cuya expresión, regulada a la baja o al alza, se encontraba superior a 1.5 desviaciones estándar. De la misma manera, las listas de los genes filtrados se introdujeron en ShinyGO 0.77 y se seleccionaron los mismos parámetros para el proceso de anotación funcional. En las figuras 37 y 38 se muestran las vías enriquecidas en el ser humano de acuerdo con los genes

regulados a la baja y al alza cuyos valores de Z-score se encontraron superiores a 1.5 desviaciones estándar, y con un FDR < 0.05, según la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Además, en las tablas 24 y 25 se muestran los genes regulados a la baja y al alza, de una manera más detallada.

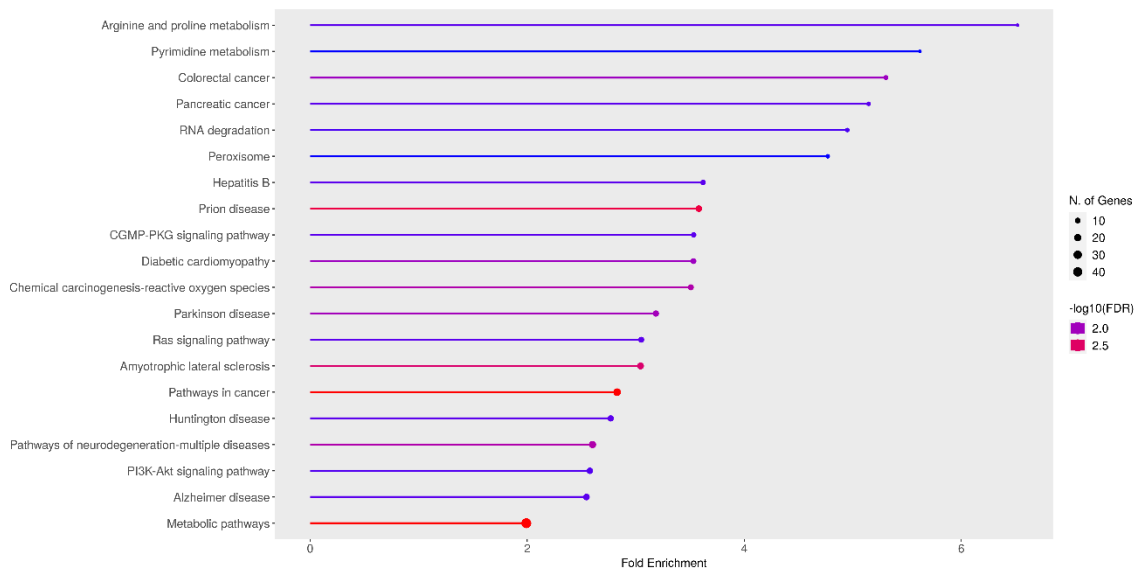


Figura 37. Vías afectadas por la regulación a la baja en la expresión génica de las células MCF-7 tratadas con los secretomas de fibroblastos senescentes o fibroblastos senescentes tratados con metformina.

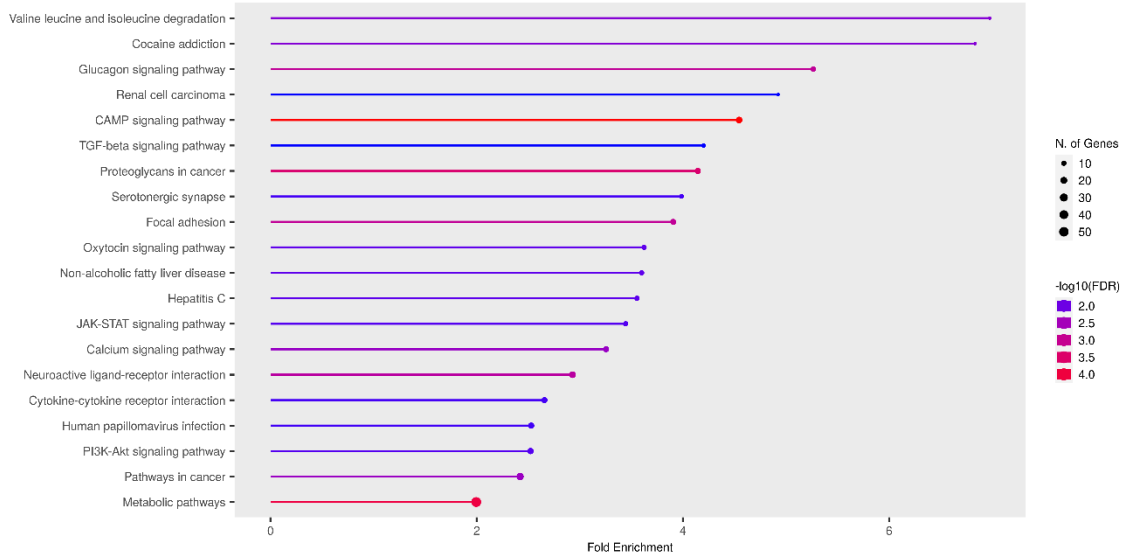


Figura 38. Vías afectadas por la regulación al alza en la expresión génica de las células MCF-7 tratadas con los secretomas de fibroblastos senescentes o fibroblastos senescentes tratados con metformina.

Tabla 24. Genes regulados a la baja en las células MCF-7 tratadas con los secretomas de fibroblastos senescentes o fibroblastos senescentes tratados con metformina, desglosados por proceso biológico según KEGG.

Proceso biológico	Genes regulados a la baja
Vías metabólicas generales	ACAA2, MGAT4A, COX7A1, CYP1A1, ENO2, ALDH3A2, FH, AMD1, HIBCH, NME7, HCCS, HMGCR, HSD17B1, IDH1, APRT, MGAT2, MTM1, ATIC, NDUFC2, NME2, NOS3, NT5E, LAP3, NT5C3A, ISYNA1, SCLY, ATP5MC1, GALNT7, PRPS2, CTPS2, PYGM, SDHB, MPPE1, SMS, TYRP1, UQCRFS1, CA6, GALNT14, PANK2, PDHX, TKTL1, DPM2, NFS1, PIGQ, DGKI, B4GALT6, PTDSS1
Vías relacionadas al cáncer	GNA13, GNB5, RALBP1, CRK, FGFR2, FH, HEY1, GNB1, IFNG, IL7, RHOA, LAMB1, SMAD3, SMAD4, MSH3, WNT16, MAPK8, RAD51, RALA, GNB4, CASP3, PTCH2, ROCK2
Carcinogénesis química	COX7A1, CYP1A1, ABL2, NDUFC2, ATP5MC1, MAPK8, MAPK13, AS3MT, SDHB, SOD1, UQCRFS1, VDAC3
Cardiomiopatía diabética	COX7A1, CPT1B, SMAD3, NDUFC2, NOS3, ATP5MC1, MAPK8, MAPK13, SDHB, UQCRFS1, VDAC3

Cáncer colorrectal	RHOA, SMAD3, SMAD4, MSH3, MAPK8, RALA, CASP3
Metabolismo de L-prolina y L-arginina	ALDH3A2, AMD1, NOS3, LAP3, SMS
Vía de señalización de Ras	GNB5, RALBP1, FGFR2, ABL2, GNB1, RHOA, ANGPT4, MAPK8, RALA, GNB4, RAPGEF5
Vía de señalización de PI3K-Akt	GNB5, CDC37, ATF2, FGFR2, GNB1, IL7, LAMB1, NOS3, ANGPT4, GNB4, STK11, THBS4, TLR2, YWHAZ
Metabolismo de pirimidinas	NME7, NME2, NT5E, NT5C3A, CTPS2

Tabla 25. Genes regulados al alza en las células MCF-7 tratadas con los secretomas de fibroblastos senescentes o fibroblastos senescentes tratados con metformina, desglosados por proceso biológico según KEGG.

Proceso biológico	Genes regulados al alza
Degradación de L-valina, L-leucina y L-isoleucina	ABAT, ACAT2, ALDH6A1, ALDH7A1, MCCC1, OXCT2
Vía de señalización del AMPc	ABCC4, RAPGEF3, RAPGEF4, ADCYAP1, DRD2, EDNRA, EP300, F2R, FOS, GNAI1, GNAI3, HTR1A, PPP1R12A, PAK1, PLCE1, PDE4B, PPARA, CAMK2B
Vías metabólicas generales	DHRS9, NEU3, ME3, COX6A1, CYP3A5, DAO, ABAT, FDPS, GANAB, SIRT5, FPGS, FUT7, B3GAT3, HK3, HMBS, HSD17B4, ACAT2, CYP4F3, ARSA, MGAT3, MGAT5, ALDH6A1, MTHFD1, NAGLU, NDUFA1, OAT, ALDH7A1, HSD17B12, HAO2, PLCE1, PDE4B, PDE6D, PFKFB1, PGAM1, PKM, PNPO, QRSL1, ALLC, ASH1L, MCCC1, RPN1, RPN2, OXCT2, BLVRB, BPGM, SRM, TPH1, AGMAT, PIP5K1A, DDO, MTMR4, COX7A2L, ATP6V1F, ACY1, ENTPD2
Vía de señalización del glucagón	EP300, PFKFB1, PGAM1, PHKB, PHKG1, PKM, PPARA, PRKAA2, PRKAG1, CAMK2B
Vías relacionadas al cáncer	CDK2, CDKN1A, FZD10, DAPK1, EDNRA, EP300, EPOR, ESR1, F2R, FOS, GNAI1, GNAI3, GRB2, MSH6, LAMA3, LAMC2, PDGFRA, GNG13, STAT2, ELOC, VEGFB, CAMK2B, CCNA2
Metabolismo de L-arginina y L-prolina	DAO, OAT, ALDH7A1, SRM, AGMAT

Como se esperaba, de acuerdo con nuestra hipótesis, y como se pudo apreciar en los resultados mostrados anteriormente, el tratamiento de las células MCF-7 con el secretoma SN+MET condujo a la regulación a la baja de genes implicados en vías relacionadas al cáncer y la carcinogénesis química, en comparación a las células MCF-7 tratadas únicamente con el secretoma de fibroblastos SN. Por ejemplo, se observó la regulación a la baja de los genes *RHOA*, *ROCK2*, *WNT16*, y *GNA13*, pertenecientes a la vía de señalización de Wnt que está implicada en los procesos de invasión y metástasis. En efecto, Yi et al. reportaron que la expresión de ROCK era más alta en tumores, y que se correlacionaba positivamente con el estadio¹²³. Además, también se redujo la expresión de los genes *IL7*, *CRK*, *CRKL*, y *FGFR2* que están implicados en desencadenar el proceso de la proliferación celular. De hecho, Tsuda et al. han reportado que la expresión de *CRK* se asocia con un pronóstico de supervivencia pobre en cáncer de pulmón¹²⁴. Asimismo, Park et al. reportaron que tanto la expresión de *CRK* y *CRKL* se asocian con un pronóstico de supervivencia pobre en pacientes con cáncer gástrico, de pulmón, colorrectal, entre otros¹²⁴. Por otro lado, Lv et al. reportaron que la sobreexpresión de *FGFR* se asociaba con un peor pronóstico de supervivencia en los pacientes con cáncer debido a una menor expresión del receptor de estrógeno¹²⁵. Como últimos ejemplos, también se redujo la expresión de los genes *XIAP*, *CYP1A1*, y *HEY1*, implicados en el proceso de evasión de apoptosis, generación de mutágenos por biotransformación de xenobióticos, e inducción de angiogénesis, respectivamente. Como se pudo observar en los resultados y lo descrito anteriormente, parece ser que efectivamente el tratamiento con metformina indujo cambios en la composición del secretoma de

los fibroblastos senescentes, de esta manera las células MCF-7 que se expusieron a este presentaban una regulación a la baja en múltiples genes de los denominados hallmarks of cancer, en comparación a las células MCF-7 expuestas al secretoma de fibroblastos SN. Como se mencionó previamente en la introducción, los hallmarks of cancer son un conjunto de 10 características que reúne el comportamiento celular y molecular de los tumores malignos.

Además de las vías relacionadas al cáncer y a la carcinogénesis química, las células MCF-7 tratadas con el secretomas de fibroblastos SN+MET vieron reducida la expresión de múltiples genes relacionados a vías metabólicas generales. Por ejemplo, se reguló a la baja la expresión de distintos genes implicados en el proceso de fosforilación oxidativa, incluyendo a *NDUFC2*, *NDUFB11*, *SDHB*, *COX7A1*, y *ATP5F1D*, entre otros. Estos genes codifican a diferentes subunidades de los complejos de la cadena transportadora de electrones. Relacionado a esto, también se disminuyó la expresión de algunos genes implicados en el ciclo de Krebs como, por ejemplo, *FH*, *IDH1*, y *PDHX*; en la biosíntesis de nucleótidos como *PRPS2*, *ATIC*, *NME2*, y *NME7*; la biosíntesis de poliaminas incluyendo a *SMS*, *ALDH3A2*, y *AMD*; y el metabolismo de ácidos grasos como *ACAA2*, *ACOT2*, y *ACSBG1*; además de otras vías metabólicas.

Por otro lado, y entrando en discusión acerca de los genes regulados al alza por el secretoma de los fibroblastos SN+MET sobre las células MCF-7, se observó un aumento en la expresión de genes implicados en la degradación de aminoácidos de cadena ramificadas, como *OXCT2*, *ALDH6A1*, y *ACAT2*; en el metabolismo glucolítico y gluconeogénico, como *PKM*, *PGAM1*, *HK3*, *BPGM*, y

PFKFB1; y el metabolismo de la L-arginina y metabolitos derivados, incluyendo a *SRM*, *OAT* y *AGMAT*; además de otras vías metabólicas.

Por último, otro proceso que se vio regulado al alza por el secretoma de los fibroblastos SN+MET en las células MCF-7 fue la expresión de algunos relacionados a la matriz extracelular, por ejemplo, los genes *TIMP3* y *FLNC*.

Tabla 26. Procesos biológicos regulados a la baja en las células MCF-7 tratadas con los secretomas de fibroblastos senescentes o fibroblastos senescentes tratados con metformina según Gene Ontology.

Proceso biológico	FDR	Valor <i>p</i>
Cellular process	7.42E-05	5.77E-09
Metabolic process	9.11E-05	2.00E-08
Cellular metabolic process	9.11E-05	1.42E-08
Primary metabolic process	0.00018	5.65E-08
Organic substance metabolic process	0.00026	1.01E-07
Nitrogen compound metabolic process	4.00E-04	1.85E-07
Organonitrogen compound metabolic process	0.00052	2.83E-07
Purine ribonucleoside biosynthetic process	0.006	3.71E-06
Cellular biosynthetic process	0.012	1.03E-05
Cellular macromolecule metabolic process	0.0148	1.38E-05
Biosynthetic process	0.0164	1.65E-05
Purine-containing compound biosynthetic process	0.0181	1.97E-05
Organonitrogen compound biosynthetic process	0.0369	4.31E-05
Response to organic substance	0.0373	4.65E-05
Cellular nitrogen compound metabolic process	0.0389	5.27E-05
Cellular protein metabolic process	0.0389	5.14E-05
Nucleoside metabolic process	0.0399	5.95E-05
Organic substance biosynthetic process	0.0399	5.90E-05

Tabla 27. Top 20 procesos biológicos regulados al alza en las células MCF-7 tratadas con los secretomas de fibroblastos senescentes o fibroblastos senescentes tratados con metformina según Gene Ontology.

Proceso biológico	FDR	Valor <i>p</i>
Cellular process	7.08E-06	5.51E-10
Cellular response to chemical stimulus	2.34E-05	3.64E-09

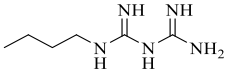
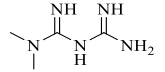
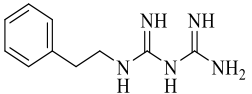
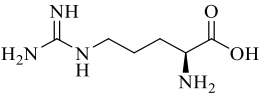
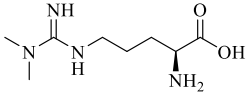
Response to organic substance	2.69E-05	6.28E-09
Positive regulation of biological process	2.69E-05	8.35E-09
Negative regulation of biological process	2.69E-05	8.62E-09
Nitrogen compound metabolic process	2.77E-05	1.37E-08
Response to oxygen-containing compound	2.77E-05	1.30E-08
Organic substance metabolic process	5.40E-05	3.36E-08
Cellular response to organic substance	5.50E-05	3.85E-08
Negative regulation of cellular process	7.26E-05	5.65E-08
Biological regulation	8.80E-05	7.53E-08
Metabolic process	0.00014	1.46E-07
Response to chemical	0.00014	1.30E-07
Regulation of metabolic process	0.00019	2.12E-07
Primary metabolic process	0.00019	2.25E-07
Regulation of biological process	0.00023	2.90E-07
Organic cyclic compound metabolic process	0.00035	4.57E-07
Cell surface receptor signaling pathway	0.00048	6.76E-07
Cellular nitrogen compound metabolic process	5.00E-04	7.44E-07
Response to stimulus	5.00E-04	7.33E-07

De manera similar a lo que se hizo con los resultados de transcriptómica de la sección 5.6, se repitió el análisis de anotación funcional, pero empleando la base de datos del Gene Ontology, y los resultados concordaron bastante bien con los obtenidos con KEGG. Por ejemplo, nuestros genes diferencialmente expresados y la anotación funcional del KEGG sugirieron cambios en la biosíntesis o el metabolismo de la L-arginina, poliaminas, o nucleótidos, concordando con la regulación sobre los procesos de compuestos de nitrógeno, procesos metabólicos de nucleósidos, y procesos biosintéticos de purinas ribonucleósidos, que mostró el Gene Ontology.

5.10 Realizar un modelo computacional del posible mecanismo de acción de la metformina

En primer lugar, se creó una base de datos que contenía a las moléculas endógenas candidatas que se pretendían comparar con las biguanidas, incluyendo a estas últimas. Las moléculas bioactivas incluidas pertenecían al ciclo de la urea, al metabolismo del óxido nítrico, al metabolismo de las poliaminas, la vía mTORC1, y al metabolismo de la creatina. Para generar un análisis más completo, se decidió incluir a las tres biguanidas principales: metformina, buformina y fenformina. De cada molécula incluida en la base de datos se recolectó su identificación de compuesto (CID) de PubChem así como su SMILES. En la tabla 28, se muestra la base de datos construida, incluyendo las moléculas y sus correspondientes CID y SMILES.

Tabla 28. Base de datos de las moléculas candidatas incluidas en el análisis computacional.

Nombre	SMILES	CID	Estructura química
Buformina	<chem>CCCCNC(=N)NC(N)=N</chem>	2468	
Metformina	<chem>CN(C)C(=N)NC(N)=N</chem>	4091	
Fenformina	<chem>NC(=N)NC(=N)NCCC1=CC=CC=C1</chem>	8249	
L-Arginina	<chem>N[C@@H](CCCNC(N)=N)C(O)=O</chem>	6322	
ADMA	<chem>CN(C)C(=N)NCCC[C@H](N)C(O)=O</chem>	123831	

SDMA	<chem>CNC(=NC)NCCC[C@@H](C(=O)O)N</chem>	169148	
L-Citrulina	<chem>C(C[C@@H](C(=O)O)N)CNC(=O)N</chem>	9750	
L-Ornitina	<chem>C(C[C@@H](C(=O)O)N)CN</chem>	6262	
Carbamoil fosfato	<chem>C(=O)(N)OP(=O)(O)O</chem>	278	
Ácido L-argininosuccínico	<chem>C(C[C@@H](C(=O)O)N)CN=C(N)N[C@@H](CC(=O)O)C(=O)O</chem>	16950	
Ácido L-aspártico	<chem>C([C@@H](C(=O)O)N)C(=O)O</chem>	5960	
Ácido fumárico	<chem>OC(=O)C=C\C(O)=O</chem>	444972	
Creatina	<chem>CN(CC(=O)O)C(=N)N</chem>	586	
Cadaverina	<chem>C(CCN)CCN</chem>	273	
Espermidina	<chem>C(CCNCCCNCN)CN</chem>	1102	
Putrescina	<chem>C(CCN)CN</chem>	1045	
Urea	<chem>C(=O)(N)N</chem>	1176	

Una vez colectados los CID de las moléculas candidatas, estos valores se introdujeron en la herramienta PubChem Score Matrix Service para generar las diferentes comparaciones estructurales a nivel 2D y 3D. Para obtener las comparaciones a nivel 2D y 3D se seleccionaron las opciones “2D similarity” y, “3D similarity (shape optimized)” y “3D similarity (feature optimized)”, respectivamente, en el tipo de puntuación (Score type). Además, en el caso de

la comparación 3D se seleccionó la creación de 10 confórmeros por CID. Los diferentes resultados obtenidos de las comparaciones biguanida vs metabolito endógeno en ambos niveles, 2D y 3D, se muestran en la tabla 29.

Tabla 29. Comparación estructural (2D y 3D) entre las biguanidas y los metabolitos candidatos.

	Metformina				Buformina				Fenformina			
	TC	ST	CT	ST+CT	TC	ST	CT	ST+CT	TC	ST	CT	ST+CT
Ácido L-aspártico	16	89	41	130	26	80	11	91	14	59	7	66
Ácido fumárico	7	90	0	90	14	79	0	79	14	65	0	65
AAS	29	49	10	59	34	60	9	69	24	71	10	81
Agmatina	56	82	40	122	88	86	34	120	32	62	27	89
L-Arginina	31	82	21	103	46	81	21	121	27	77	17	91
Buformina	63	75	45	120	100	100	100	200	33	69	40	111
Cadaverina	32	88	13	101	58	79	15	94	26	63	11	74
Carbamoil fosfato	12	84	10	94	12	69	9	78	5	56	5	61
L-Citrulina	23	74	13	87	31	84	8	92	20	84	7	91
Creatina	46	93	36	129	42	77	25	102	20	69	14	83
ADMA	38	75	16	91	43	81	15	96	26	87	7	94
SDMA	33	73	18	91	39	73	15	88	25	82	9	91
Espermidina	35	80	13	93	54	85	25	110	22	66	25	91
Espermina	36	58	11	69	55	70	9	79	25	75	11	86
Fenformina	23	68	21	89	33	69	40	109	100	100	100	200
AGA	36	95	35	130	50	75	29	104	22	61	21	82
L-Ornitina	19	92	17	109	32	81	11	92	19	66	10	76
Metformina	100	100	100	200	63	75	47	122	23	68	20	89
Putrescina	34	82	17	99	62	62	31	93	23	53	13	66
Urea	25	61	14	75	24	46	12	58	9	31	11	42

AAS: Ácido L-argininosuccínico; AGA: Ácido guanidinoacético.

Como se puede observar en la tabla 29, a nivel 2D las moléculas que demostraron mayor similitud estructural con respecto a la metformina fueron creatina y agmatina con valores de TC de 46 y 56, respectivamente. No obstante, únicamente el valor de la agmatina correspondió más a una similitud estructural moderada, pues se alejan un poco del valor de TC de 65 que se consideró, para fines de este proyecto, el valor de corte para establecer una similitud estructural

alta, aunque fue mayor o igual a 50. Para la buformina, únicamente la agmatina demostró una alta similitud estructural (TC de 88), mientras que se observaron similitudes moderadas para el caso de putrescina (TC de 62), cadaverina (TC de 58), espermina (TC de 55), espermidina (TC de 54), ácido guanidinoacético (TC de 50). Para la última biguanida, la fenformina, esta demostró carecer de similitudes estructurales altas y moderadas contra todos los metabolitos candidatos evaluados.

Sin embargo, a nivel 3D la situación para las biguanidas mejoró, al menos para la metformina y la buformina. Tomando como referencia los valores de combo T, es decir, la suma de los valores de ST y CT, se pudo observar que la metformina mostró una similitud estructural alta ($ST+CT \geq 130$) con el ácido L-aspártico (ST+CT de 130) y el ácido guanidinoacético (ST+CT de 130), y algunas similitudes moderadas ($ST+CT \geq 100$) con creatina (ST+CT de 129), agmatina (ST+CT de 122), L-ornitina (ST+CT de 109), L-arginina (ST+CT de 103), y cadaverina (ST+CT de 101). En el caso de la buformina, también se observaron similitudes estructurales moderadas con L-arginina (ST+CT de 121), agmatina (ST+CT de 120), espermidina (ST+CT de 110), ácido guanidinoacético (ST+CT de 104), y creatina (ST+CT de 102). Hay que destacar que al analizar la contribución en solitario de cada parámetro del combo T, se observó que, tanto para la metformina como para la buformina, la forma (ST) era el principal rasgo que contribuía a la similitud estructural al compararse contra las moléculas candidatas que mostraron similitudes altas y moderadas. Específicamente, las contribuciones promedio del ST y CT a los valores de combo T observados fueron

de 73-76% y 24-27%, respectivamente. En efecto, era de esperarse que los valores de CT fueran más bajos que los valores de ST dada la amplia diversidad de características funcionales de las moléculas candidatas. Por ejemplo, solo comparando la similitud estructural en torno a características funcionales de la metformina y la L-ornitina, cuyo análisis de similitud arrojó un valor de CT de 17, es posible identificar que las carencias de los grupos carboxilo y amino de la L-ornitina en la estructura de la metformina, así como la carencia de los grupos guanidino de la metformina en la estructura de la L-ornitina contribuyeron a la disminución del CT. Esta misma situación se dio con aquellas moléculas que no alcanzaron valores moderados de similitud estructural.

A grandes rasgos, se puede apreciar que el análisis de similitud estructural a nivel 2D y, especialmente, a nivel 3D sugiere relaciones entre las biguanidas, específicamente, metformina y buformina, con algunos metabolitos candidatos implicados en el ciclo de la urea, el metabolismo del óxido nítrico, el metabolismo de las poliaminas, y la biosíntesis de creatina. Estos hallazgos preliminares concuerdan con la hipótesis propuesta anteriormente, ya que, para poder unirse a diferentes dianas en su mecanismo de acción, se esperaría una alta o moderada similitud estructural por parte de las biguanidas con sus metabolitos endógenos correspondientes.

Para continuar con la identificación de similitud entre las biguanidas y los diversos metabolitos candidatos, se llevó la comparación al nivel fisicoquímico. Para iniciar la comparación fisicoquímica, primero se predijeron distintos parámetros fisicoquímicos de todas las moléculas incluidas en la base de datos, empleando

la herramienta SwissADME del Swiss Institute of Bioinformatics. Los parámetros que se recolectaron para cada molécula incluyeron el peso molecular, el log P estimado consenso (simplemente llamado aquí, Log P), el área superficial polar topológica (TPSA, por sus siglas en inglés), el número de aceptores de puente de hidrógeno, el número de donadores de puentes de hidrógeno, la fracción de carbonos sp³ (o simplemente fracción Csp³), y el número de enlaces rotacionales. Como se mencionó en la sección de metodología, la predicción se llevó para las moléculas de la base de datos en dos modalidades: modalidad no ionizada (neutra) y modalidad ionizada (a pH 7.4). Esto debido a que los análisis de similitud estructural que se describieron anteriormente solo se pudieron llevar a cabo en condiciones no ionizadas por las limitaciones de la herramienta PubChem Score Matrix Service. Por tal motivo, se pretendió emplear ambas modalidades para observar si las similitudes fisicoquímicas, y posiblemente (aunque de manera poco probable) las similitudes estructurales, que se observaron únicamente se presentan en condiciones no ionizadas o si permanecen a pH fisiológico, buscando analizar a las moléculas en un ambiente más realista. En las tablas 30 y 31, se pueden observar los resultados de la predicción de propiedades fisicoquímicas de las moléculas candidatas en las modalidades no ionizada y ionizada, respectivamente.

Tabla 30. Predicción de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas candidatas empleando la herramienta SwissADME en modalidad no ionizada.

Nombre	Peso molecular (Da)	Log P	TPSA (Å ²)	Aceptores de H	Donadores de H	Fracción Csp ³	Enlaces rotacionales
Ácido L-aspártico	133.1	-2.04	100.62	5	3	0.5	3
Ácido fumárico	116.07	-0.35	74.6	4	2	0	2

Ácido L-argininosuccínico	290.27	-2.95	188.33	8	6	0.6	10
Agmatina	130.19	-0.66	90.42	2	3	0.8	4
L-Arginina	174.2	-2.04	127.72	4	4	0.67	5
Buformina	157.22	-0.15	102.78	2	3	0.67	4
Cadaverina	102.18	0.2	52.04	2	2	1	4
Carbamoil fosfato	141.02	-1.2	119.66	5	3	0	2
L-Citrulina	175.19	-1.83	118.44	4	4	0.67	6
Creatina	131.13	-0.97	90.41	3	3	0.5	3
ADMA	202.25	-1.41	104.94	4	3	0.75	6
SDMA	202.25	-1.34	99.74	4	4	0.75	7
Espermidina	145.25	0.12	64.07	3	3	1	7
Espermina	202.34	0.33	76.1	4	4	1	11
Fenformina	205.26	0.48	102.78	2	3	0.2	4
Ácido guanidinoacético	117.11	-1.26	101.7	3	3	0.33	2
L-Ornitina	132.16	-1.79	89.34	4	3	0.8	4
Metformina	129.16	-0.89	91.49	2	3	0.5	2
Putrescina	88.15	-0.1	52.04	2	2	1	3
Urea	60.06	-0.99	69.11	1	2	0	0

Tabla 31. Predicción de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas candidatas empleando la herramienta SwissADME en modalidad ionizada (pH 7.4).

Nombre	Peso molecular (Da)	Log P	TPSA (Å²)	Aceptores de H	Donadores de H	Fracción Csp3	Enlaces rotacionales
L-Aspartato	132.09	-3.03	107.9	4	1	0.5	3
Fumarato	114.06	-0.88	80.26	4	0	0	2

L-Argininosuccinato	288.26	-4.16	198.44	7	3	0.6	10
Agmatina	132.21	-1.81	91.28	0	4	0.8	5
L-Arginina	175.21	-3.14	131.41	2	4	0.67	6
Buformina	158.22	-0.31	102.02	1	4	0.67	5
Cadaverina	104.19	-1.56	55.28	0	2	1	4
Carbamoil fosfato	139	-1.04	125.32	5	1	0	2
L-Citrulina	175.19	-2.53	122.89	3	3	0.67	6
Creatina	131.13	-1.6	94.98	2	2	0.5	3
ADMA	203.26	-2.52	108.63	2	3	0.75	7
SDMA	203.26	-2.45	105.8	2	4	0.75	7
Espermidina	148.27	-2.58	71.89	0	3	1	7
Espermina	206.37	-3.31	88.5	0	4	1	11
Fenformina	206.27	0.14	102.02	1	4	0.2	5
Guanidinoacetato	117.11	-2.3	103.77	2	3	0.33	3
L-Ornitina	133.17	-3.32	95.41	2	2	0.8	4
Metformina	130.17	-1.2	93.23	1	3	0.5	2
Putrescina	90.17	-1.86	55.28	0	2	1	3
Urea	60.06	-0.99	69.11	1	2	0	0

Como se puede observar en las tablas 30 y 31, la identificación de relaciones fisicoquímicas entre las biguanidas y los diferentes metabolitos candidatos es difícil de llevar a cabo de manera manual. Sin embargo, es posible extraer patrones y relaciones no obvias a simple vista empleando algunos algoritmos de machine learning, un término en inglés que hace alusión a técnicas informáticas relacionadas a la inteligencia artificial que facilitan la organización, el análisis de datos, la visualización, y predicción de datos. Para comenzar el análisis de los resultados obtenidos en las tablas 30 y 31 empleando herramientas de machine learning, los datos se sometieron a análisis de componentes principales y agrupamiento jerárquico, dos herramientas de aprendizaje no supervisado. En las figuras 39 y 40, se muestran los análisis de componentes principales de los datos obtenidos en la predicción de propiedades fisicoquímicas de las moléculas de la base de datos en las modalidades no ionizada y ionizada.

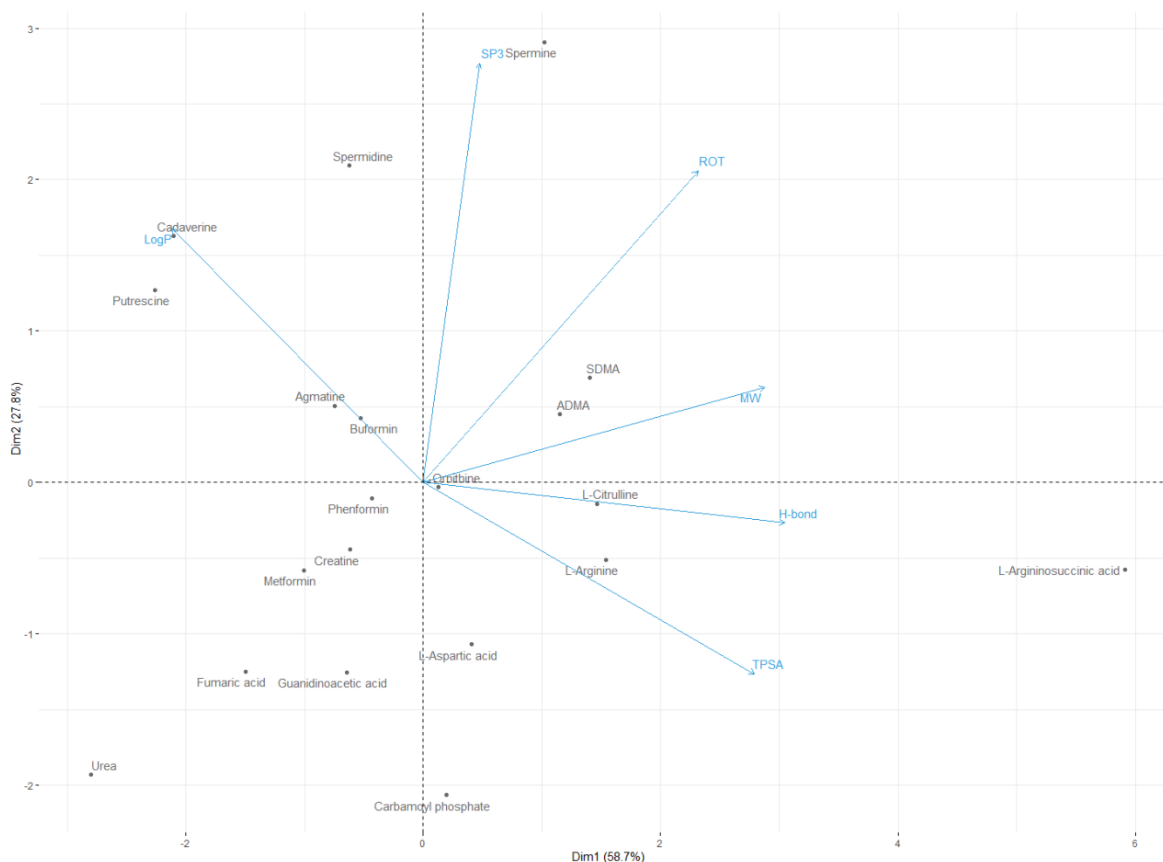


Figura 39. Biplot del análisis de componentes principales de las propiedades fisicoquímicas predichas de los metabolitos candidatos no ionizados.

Los análisis de componentes principales de las figuras 39 y 40 se representaron en forma de biplot, una representación gráfica de carácter multivariable. En el caso de la figura 39, el análisis de componentes principales demostró una relación a nivel fisicoquímico de las tres biguanidas con creatina, agmatina y L-ornitina. Estos resultados coinciden con lo obtenido en la comparación estructural a nivel 2D y 3D de las biguanidas, donde también se identificaron similitudes estructurales altas o moderadas con creatina, agmatina y L-ornitina. No obstante, a nivel estructural, la fenformina no demostró similitudes moderadas o altas, aunque a nivel fisicoquímico si demostró similitud con algunos metabolitos candidatos. Sin embargo, los resultados presentados hasta aquí se obtuvieron

en modalidad no ionizada, es posible que la ionización altere las similitudes fisicoquímicas.

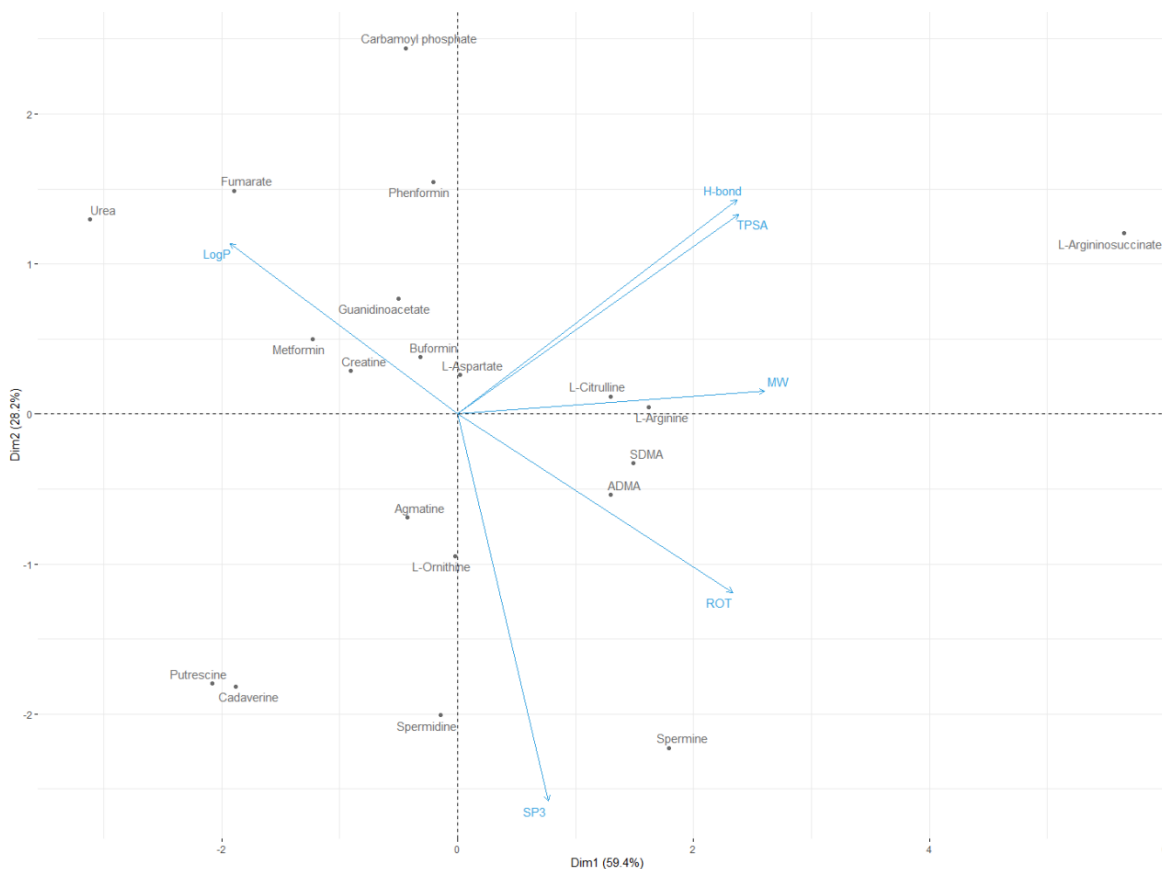


Figura 40. Biplot del análisis de componentes principales de las propiedades fisicoquímicas predichas de los metabolitos candidatos ionizados.

Cuando el análisis de componentes principales se llevó a cabo en modalidad ionizada, como se muestra en la figura 40, los resultados demostraron que se mantenía la cercanía, a nivel fisicoquímico, entre metformina y buformina con creatina. No obstante, la cercanía de ambas biguanidas con agmatina y L-ornitina disminuyó, mientras que la cercanía con L-aspartato y guanidinoacetato aumentó. Además, las posibles cercanías fisicoquímicas que se observaron para

la fenformina en modalidad no ionizada disminuyeron al pasar a la modalidad ionizada.

Para obtener una nueva interpretación de los datos en ambas modalidades, se decidió utilizar otra herramienta de machine learning con el objetivo de evaluar si las cercanías, a nivel fisicoquímico, obtenidas mediante análisis de componentes principales eran reproducidas nuevamente. Se decidió utilizar un agrupamiento jerárquico empleando la distancia euclidiana y el método de Ward para generar los agrupamientos. De manera previa a la comparación fisicoquímica entre biguanidas y los metabolitos candidatos, se generaron dos agrupamientos jerárquicos únicamente incluyendo a estos últimos, en ambas modalidades, para validar si el algoritmo de machine learning era capaz de establecer agrupaciones adecuadas entre metabolitos que pertenecen a una misma vía metabólica, y de los que se esperaba que contengan un perfil fisicoquímico similar. En las figuras 41 y 42 se muestran los agrupamientos jerárquicos los metabolitos candidatos elaborados con base en los perfiles fisicoquímicos.

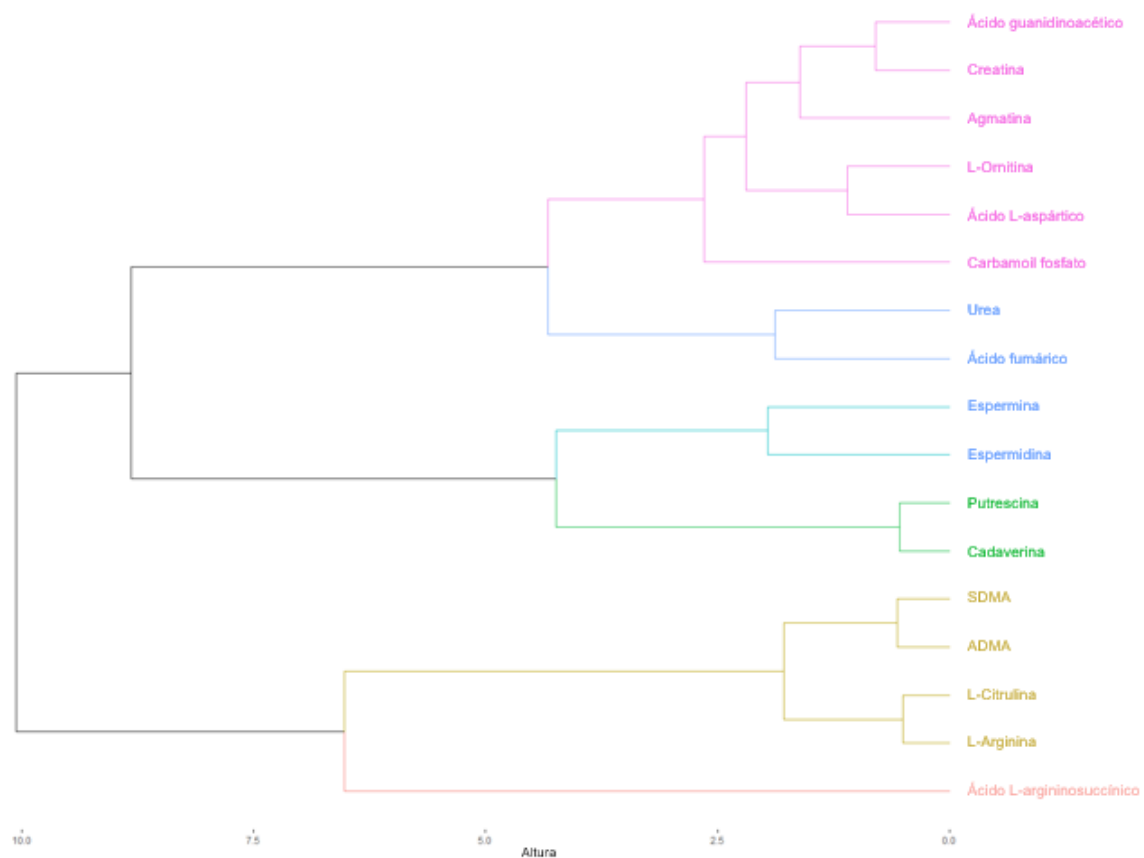


Figura 41. Dendrograma de los agrupamientos jerárquicos de los metabolitos candidatos no ionizados con base en los resultados de la predicción de propiedades fisicoquímicas.

Como se observó en la figura 41, el agrupamiento jerárquico fue capaz de establecer relaciones fisicoquímicas entre los distintos metabolitos candidatos. En la modalidad no ionizada se generaron 6 agrupamientos. De manera correcta, el algoritmo agrupó a las poliaminas en dos agrupamientos: poliaminas de bajo peso molecular que incluía a la putrescina y cadaverina; y poliaminas de alto peso molecular que incluía a la espermidina y espermina. Además, la L-citrulina y la L-arginina que difieren ligeramente en la cadena lateral por la presencia de un grupo carbamoilamino y guanidino, respectivamente, así como el ADMA y el SDMA, que son los derivados dimetilados de la L-arginina, fueron agrupados

juntos de manera correcta. El ácido L-argininosuccínico se mantuvo en solitario como un agrupamiento debido a que, a nivel fisicoquímico, es muy diferente del resto de metabolitos candidatos. La L-ornitina, la creatina, el ácido guanidinoacético, el ácido L-aspartico, la agmatina y el carbamoil fosfato se agruparon, formando el agrupamiento más grande. Cabe destacar que las relaciones fisicoquímicas mostradas en dicho agrupamiento tienen sentido biológico, por ejemplo, la creatina y el ácido guanidinoacético fueron agrupados correctamente, ambos metabolitos de la biosíntesis de creatina; el ácido aspártico y la L-ornitina fueron agrupados correctamente, ambos metabolitos del ciclo de la urea. Al subagrupamiento de la creatina y el ácido guanidinoacético posteriormente se le sumó la agmatina, luego se le sumó el subagrupamiento del ácido aspártico y la L-ornitina, y finalmente se les sumó el carbamoil fosfato. Finalmente, la urea y el ácido fumárico se agruparon en otro agrupamiento, aun cuando en características estructurales difieren mucho, tanto el análisis de componentes principales y el agrupamiento jerárquico predicen una cercanía a nivel fisicoquímico. Esto se pudo explicar a través del análisis de componentes principales para la modalidad neutra, que describió que el componente principal 1 se vio afectado principalmente por la capacidad de formar puentes de hidrógeno (número de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno), el peso molecular y el TPSA, en ese orden. Por otro lado, el componente principal 2 se vio afectado principalmente por la fracción Csp^3 , el número de enlaces rotacionales y el log P. Dado que el agrupamiento jerárquico toma en cuenta los dos componentes principales para establecer las relaciones, la urea y el ácido fumárico se debieron

haber agrupado juntos al tener mayor similitud en los parámetros que más contribuían a los componentes principales.

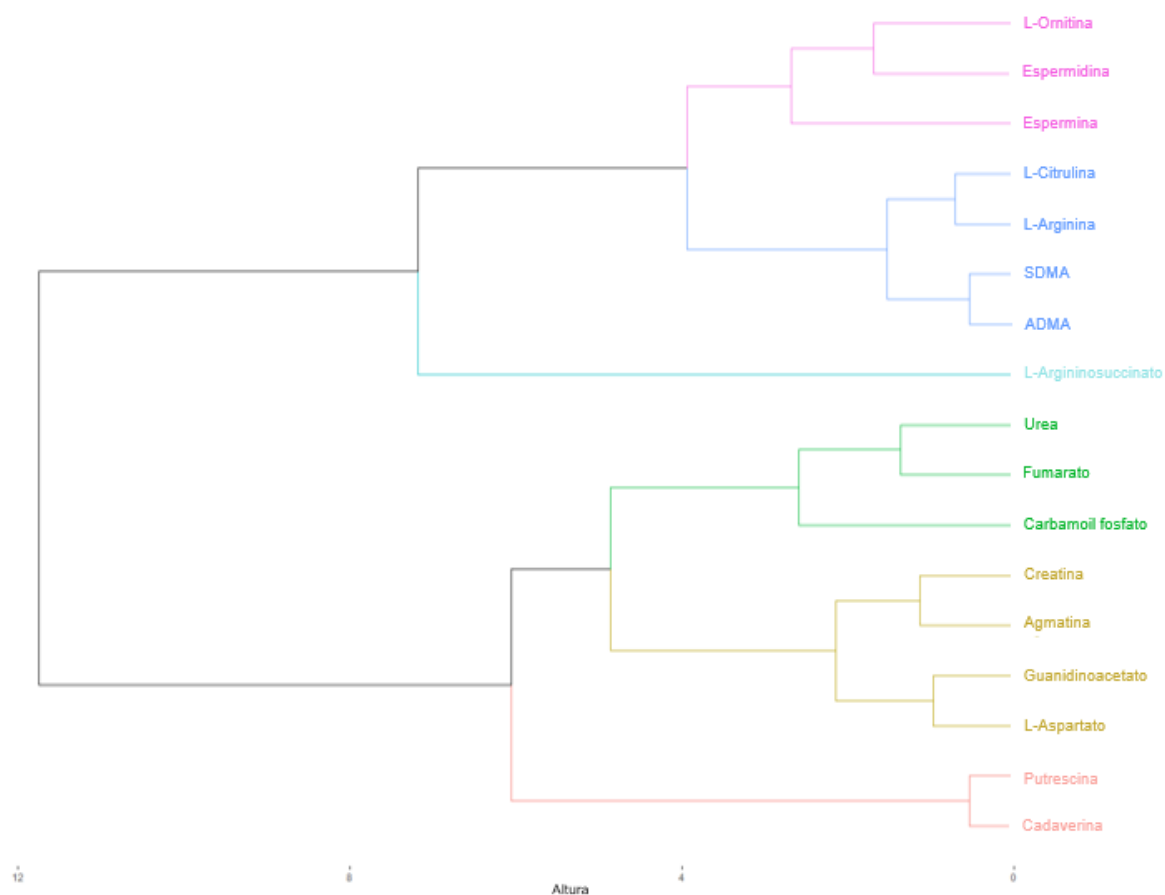


Figura 42. Dendrograma de los agrupamientos jerárquicos de los metabolitos candidatos ionizados (pH 7.4) con base en los resultados de la predicción de propiedades fisicoquímicas.

Cuando el agrupamiento jerárquico se llevó a cabo en la modalidad ionizada, el algoritmo aún fue capaz de establecer relaciones fisicoquímicas coherentes a la relación metabólica que guardan los metabolitos. En efecto, la L-ornitina, la espermidina y la espermina fueron agrupadas, representando a las poliaminas de alto peso molecular y al precursor de estas. La putrescina y la cadaverina se volvieron a agrupar, representando a las poliaminas de bajo peso molecular. El L-argininosuccinato se volvió a mantener en solitario como un agrupamiento. De

la misma manera, el agrupamiento entre L-arginina, L-citrulina, ADMA y SDMA que se observó en la modalidad no ionizada se mantuvo. La urea, el fumarato y el carbamoil fosfato se agruparon, posiblemente por las mismas razones planteadas en la modalidad no ionizada. Finalmente, la creatina, la agmatina, el guanidinoacetato y el L-aspartato se agruparon, representando metabolitos de la biosíntesis de creatina, el ciclo de la urea, y el metabolismo de poliaminas.

Luego de validar el agrupamiento jerárquico únicamente empleando los metabolitos candidatos para ambas modalidades, se procedió a hacer las comparaciones fisicoquímicas biguanidas vs metabolitos, aunque estas se llevaron a cabo de manera individual, es decir, metformina vs metabolitos, buformina vs metabolitos y fenformina vs metabolitos. En las figuras 43, 44, y 45 se muestran los dendrogramas de los agrupamientos entre los metabolitos candidatos y la metformina, buformina o fenformina, respectivamente, en la modalidad no ionizada. En las figuras 46, 47 y 48 se muestran los dendrogramas de los agrupamientos entre los metabolitos candidatos y la metformina, buformina o fenformina, respectivamente, en la modalidad ionizada.

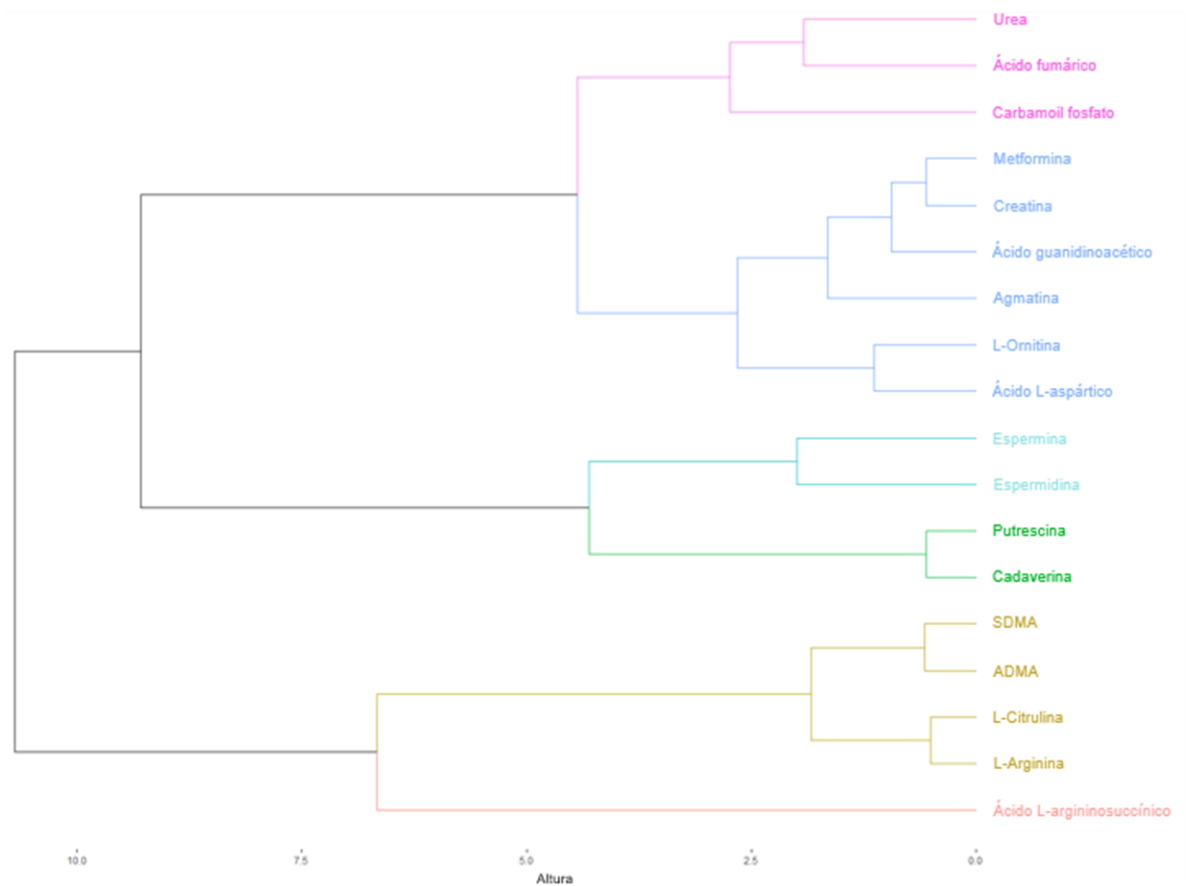


Figura 43. Dendrograma de los agrupamientos jerárquicos de los metabolitos candidatos y metformina con base en los resultados de la predicción de propiedades fisicoquímicas en modalidad no ionizada.

Como se puede observar en la figura 43, cuando se introdujo la metformina al agrupamiento jerárquico esta fue agrupada con creatina en primer lugar. Este subgrupo posteriormente se agrupó con el ácido guanidinoacético, y este nuevo subgrupo a su vez se agrupó con agmatina. Finalmente, a este subgrupo se les sumó el subgrupo formado por L-ornitina y ácido L-aspártico. Podemos observar que, para este agrupamiento, la altura (distancia euclidiana) más baja se obtiene entre metformina y creatina, indicando una mayor similitud fisicoquímica. La altura aumenta ligeramente al sumarse el ácido guanidinoacético y la agmatina,

pero aumenta aún más al sumarse la L-ornitina y el ácido L-aspártico, reflejando que cada vez existe una menor similitud fisicoquímica hacia estos metabolitos.

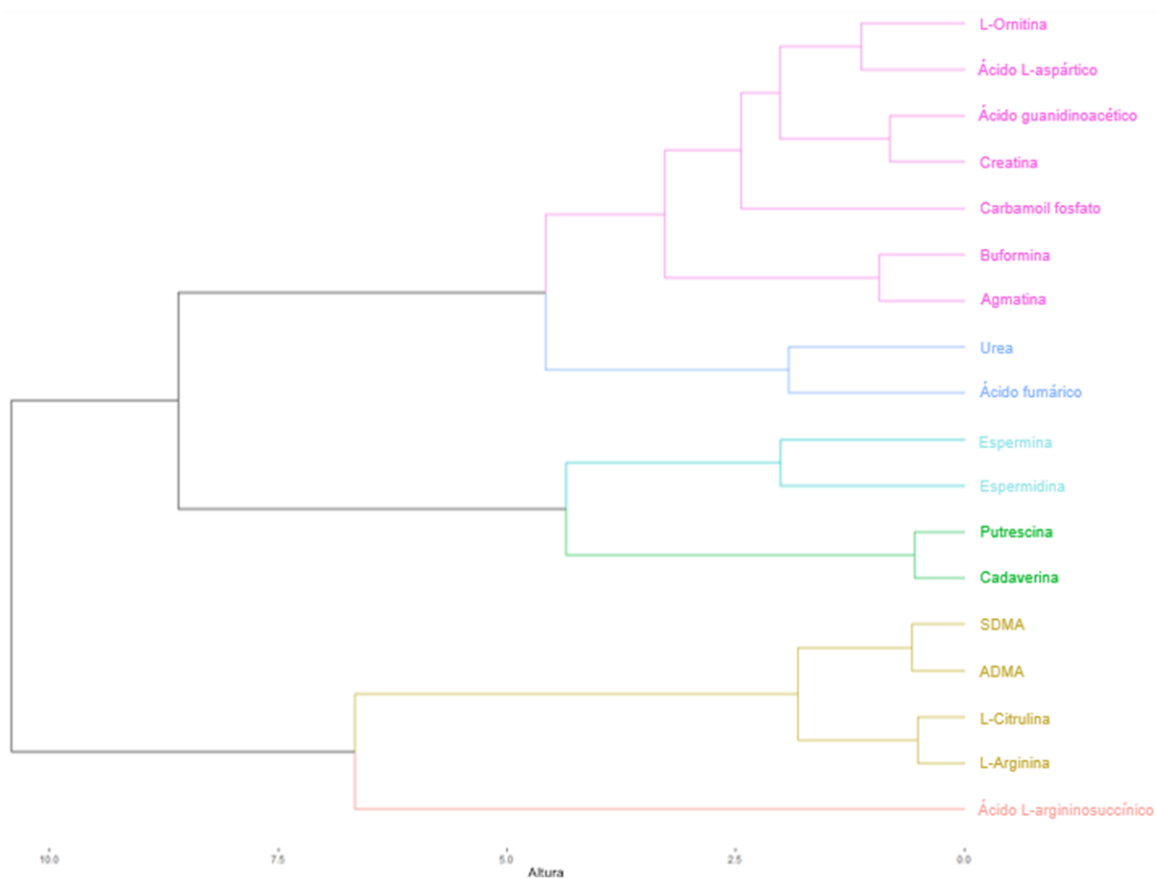


Figura 44. Dendrograma de los agrupamientos jerárquicos de los metabolitos candidatos y buformina con base en los resultados de la predicción de propiedades fisicoquímicas en modalidad no ionizada.

En el caso de la buformina, la figura 44 demostró que la menor distancia euclidiana para la buformina se dio al agruparse con la agmatina. Cuando este subagrupamiento se agrupó con el subagrupamiento compuesto por carbamoil fosfato, creatina, ácido guanidinoacético, ácido L-aspártico, y L-ornitina, la distancia euclidiana aumentó, indicando una menor similitud fisicoquímica con estos metabolitos.

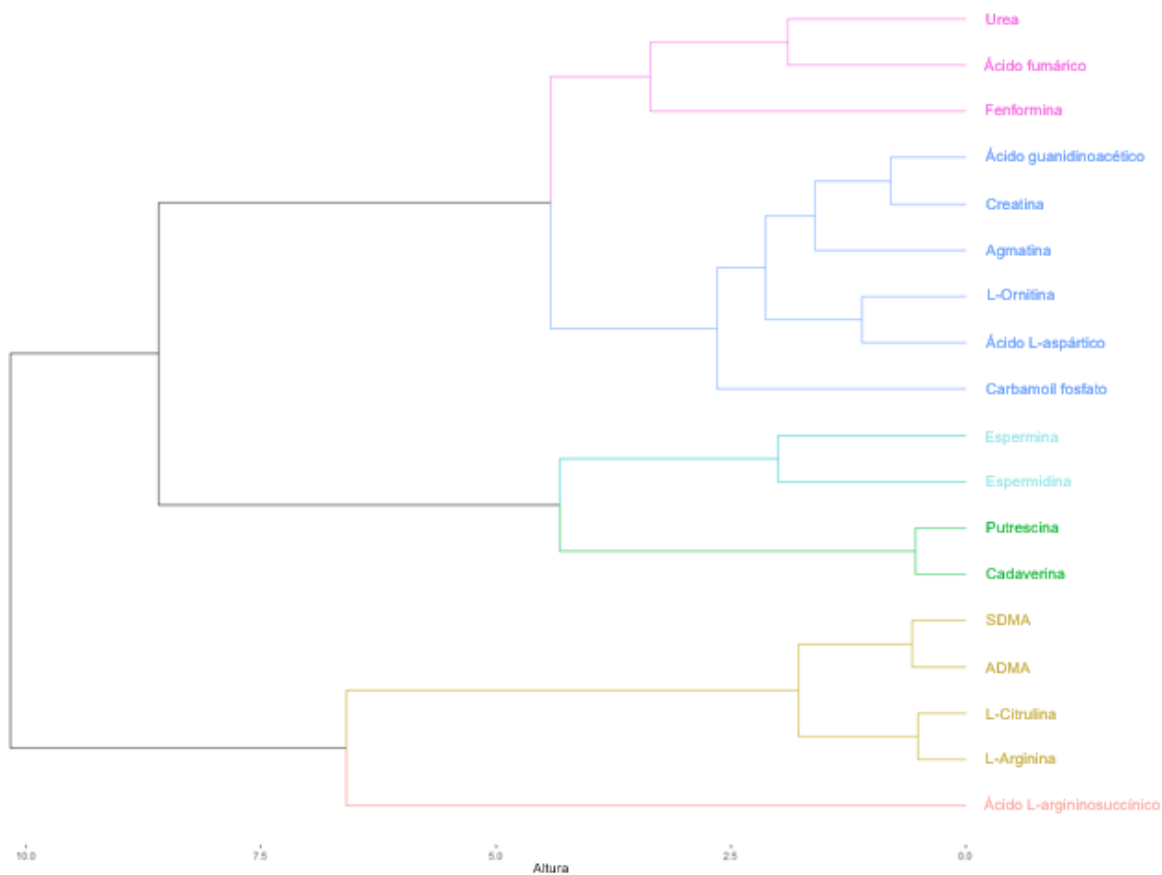


Figura 45. Dendrograma de los agrupamientos jerárquicos de los metabolitos candidatos y fenformina con base en los resultados de la predicción de propiedades fisicoquímicas en modalidad no ionizada.

Para la última biguanida, la fenformina, la figura 45 mostró que esta fue agrupada con ácido fumárico y urea. Además, esta relación muestra una elevada distancia euclidiana, indicando que a pesar de que fue agrupada de esta manera, posiblemente aun así posee una baja similitud fisicoquímica hacia estos metabolitos.

Con base en lo observado en las figuras 43, 44 y 45, podemos observar que, al menos para la modalidad no ionizada, las similitudes fisicoquímicas observadas para la metformina y la buformina concordaron con algunas de las similitudes estructurales observadas previamente. Por ejemplo, para la metformina, la

similitud fisicoquímica y estructural concordaron para el ácido L-aspártico, la creatina, el ácido guanidinoacético, la agmatina, y la L-ornitina. Para la buformina, la similitud fisicoquímica y estructural concordaron para la creatina, el ácido guanidinoacético, la L-ornitina, el ácido L-aspártico y, especialmente, la agmatina. De la misma manera, como se observó en la comparación estructural, la fenformina fue incapaz de establecer similitudes fisicoquímicas con distancias euclidianas bajas. Estos resultados de la modalidad no ionizada sugieren que, dado que a nivel estructural y fisicoquímico se han mantenido las similitudes entre las biguanidas y algunos metabolitos, es posible la interferencia de sus dianas biológicas. No obstante, hay que analizar la similitud fisicoquímica considerando la modalidad ionizada, dado que a pH fisiológico de 7.4, la mayoría de las moléculas se encuentran ionizadas.

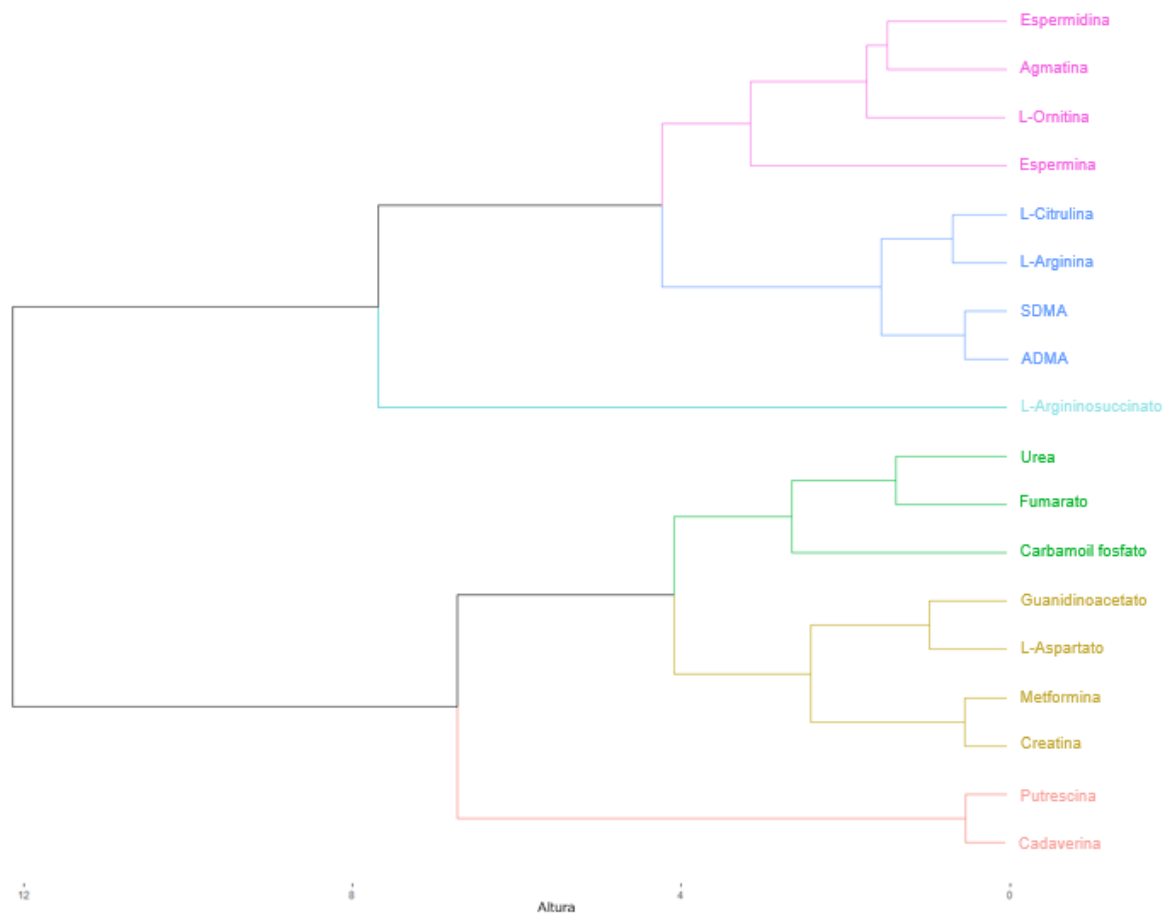


Figura 46. Dendrograma de los agrupamientos jerárquicos de la metformina y los metabolitos candidatos con base en los resultados de la predicción de propiedades fisicoquímicas en modalidad ionizada (pH 7.4).

Al pasar a la modalidad ionizada, la figura 46 mostró que la metformina fue agrupada con creatina con una baja distancia euclidiana, y con guanidinoacetato, y L-aspartato con una distancia euclidiana ligeramente elevada. Hay que destacar que se mantuvieron algunas de las relaciones fisicoquímicas observadas para la metformina en la modalidad no ionizadas, incluyendo aquellas establecidas con L-aspartato, guanidinoacetato, y creatina en sus formas neutras.

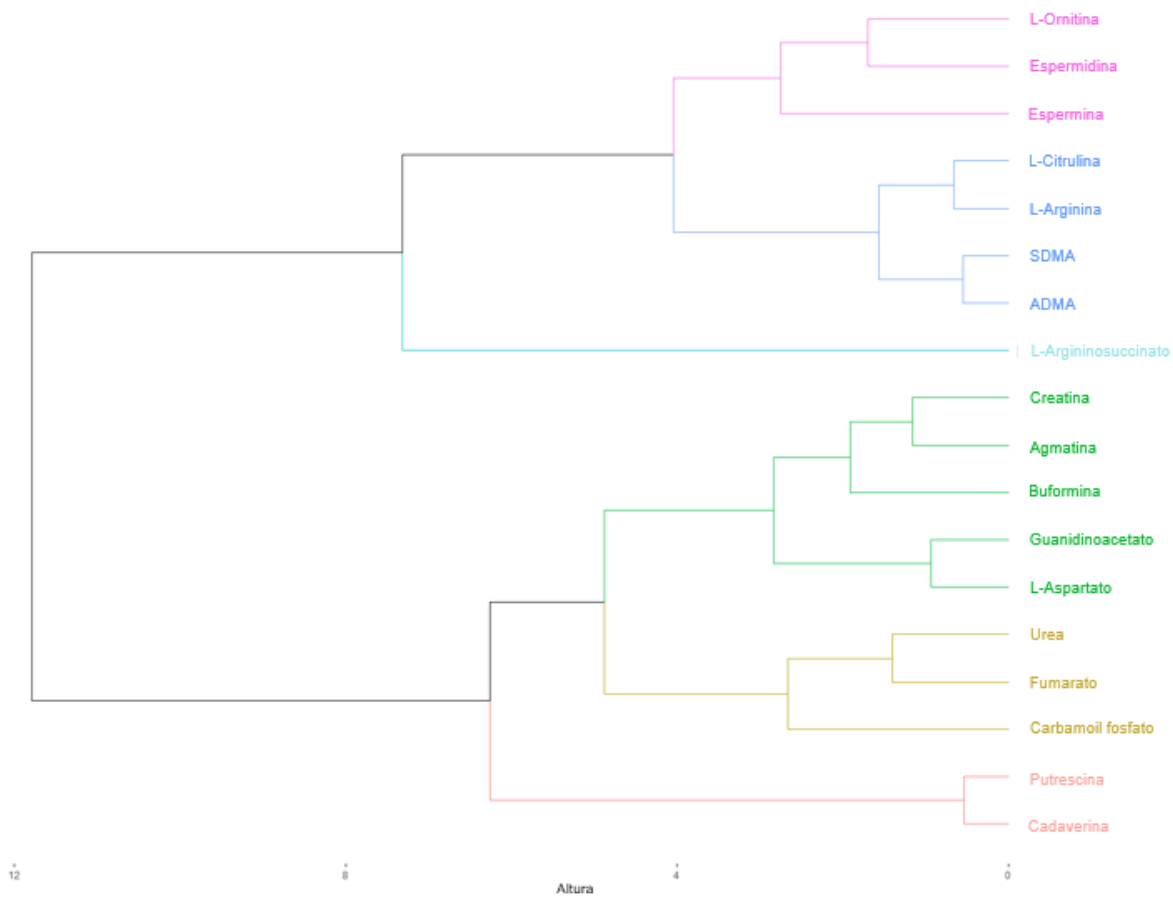


Figura 47. Dendrograma de los agrupamientos jerárquicos de la buformina y los metabolitos candidatos con base en los resultados de la predicción de propiedades fisicoquímicas en modalidad ionizada (pH 7.4).

De la misma manera, la figura 47 mostró que la buformina se agrupó con un subagrupamiento de agmatina y creatina, y a este nuevo subagrupamiento se les sumó guanidinoacetato y L-aspartato. De nuevo, los resultados obtenidos para la buformina en modalidad ionizada concordaron con lo obtenido en modalidad no ionizada, incluyendo aquellas similitudes fisicoquímicas con creatina, guanidinoacetato, L-aspartato y, especialmente, agmatina, en sus formas neutras.

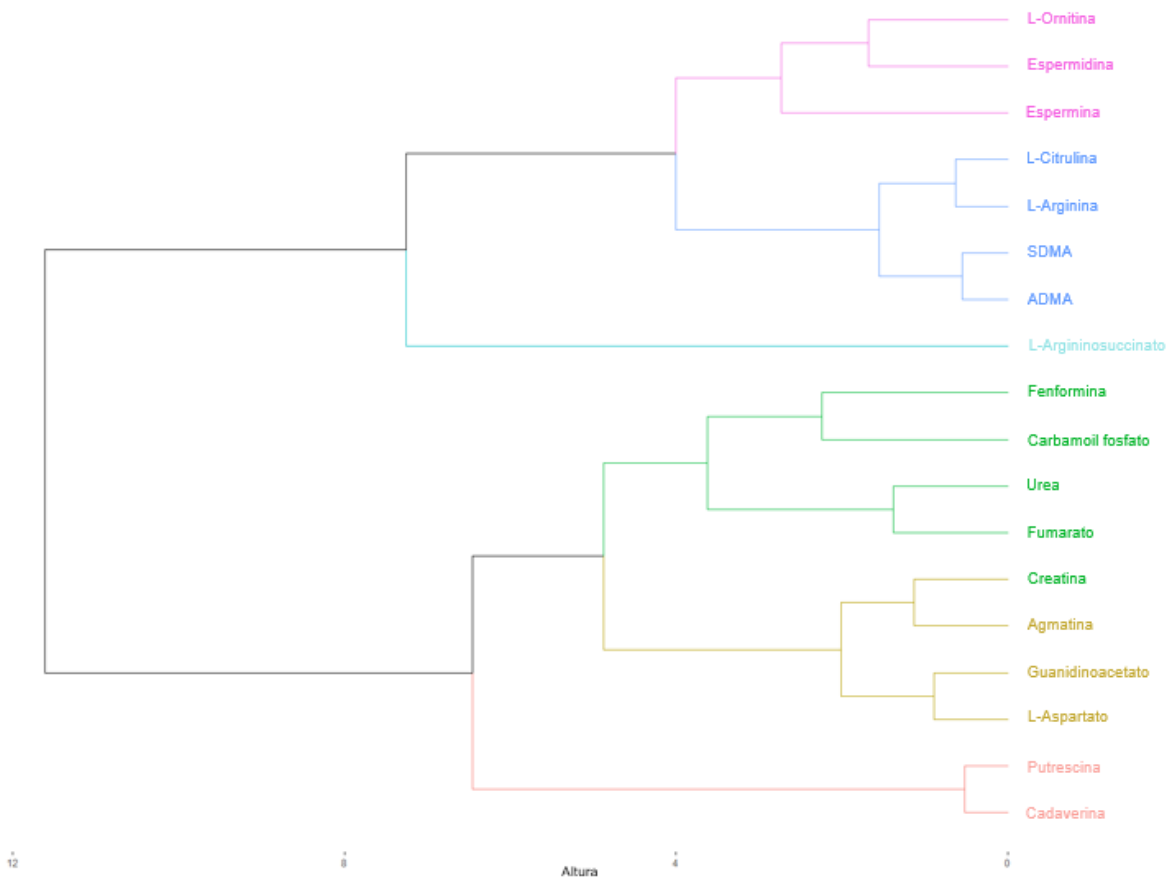


Figura 48. Dendrograma de los agrupamientos jerárquicos de la fenformina y los metabolitos candidatos con base en los resultados de la predicción de propiedades fisicoquímicas en modalidad ionizada (pH 7.4).

Por último, de acuerdo con la figura 48, la fenformina se agrupó con carbamoil fosfato, y a este subgrupo se le sumó el subgrupo compuesto por urea y fumarato. Como se observó para la modalidad no ionizada, la fenformina volvió a establecer similitud con fumarato y urea. Además, las distancias euclidianas de las similitudes observadas fueron relativamente altas, sugiriendo una baja o moderada similitud fisicoquímica.

En conjunto, las comparaciones estructurales y fisicoquímicas realizadas sugirieron que, como nuestro modelo predice, la metformina y la buformina podrían llegar a ser biológicamente equivalentes a creatina, guanidinoacetato,

agmatina, entre otros metabolitos. Por tal motivo, y para ganar evidencia de este supuesto, se decidieron implementar herramientas bioinformáticas para evaluar si la similitud estructural y fisicoquímica observada entre las biguanidas y algunos metabolitos se puede traducir en una afinidad y modos de unión comparables en sus dianas biológicas correspondientes. Como primera herramienta bioinformática, decidimos emplear la herramienta SwissTargetPrediction, que realiza una predicción basada en la estructura de las posibles dianas a las que se pudiera unir un determinado ligando. Si nuestro modelo fuera cierto, deberíamos observar la predicción de dianas cuyos ligandos fueron aquellos que mostraron similitud estructural o fisicoquímica con las biguanidas. Al introducir a las biguanidas a la plataforma del SwissTargetPrediction, esta nos devolvió los resultados que se muestran en la tabla 32.

Tabla 32. Dianas biológicas predichas para las biguanidas empleando la herramienta SwissTargetPrediction.

Nombre	Dianas predichas
Buformina	Anhidrasa carbónica II, anhidrasa carbónica I, anhidrasa carbónica XII, anhidrasa carbónica IX, óxido nítrico sintasa neural, óxido nítrico sintasa endotelial, anhidrasa carbónica III, anhidrasa carbónica VI, anhidrasa carbónica VII, anhidrasa carbónica XIV, anhidrasa carbónica V, anhidrasa carbónica IV, anhidrasa carbónica XIII, y óxido nítrico sintasa inducible
Fenformina	Óxido nítrico sintasa endotelial, óxido nítrico sintasa inducible, y óxido nítrico neural
Metformina	Óxido nítrico sintasa endotelial, óxido nítrico sintasa inducible, óxido nítrico neural, anhidrasa carbónica II, anhidrasa carbónica I, y anhidrasa carbónica IX

Como se esperaba de nuestro modelo, la predicción de las posibles dianas biológicas de las biguanidas en la herramienta SwissTargetPrediction devolvió como resultados a las tres isoformas de la óxido nítrico sintasa y diversas isoformas de la anhidrasa carbónica. Estos resultados fueron favorables para nuestro modelo porque se ha reportado la unión de L-arginina, L-citrulina, ADMA, SDMA, y agmatina a la óxido nítrico sintasa. Además, se ha reportado la unión de diferentes poliaminas a las isoformas de la anhidrasa carbónica. Este hallazgo sugirió que la unión de biguanidas a dianas biológicas al poseer características de sus metabolitos correspondientes podría ser posible.

Para aportar más evidencia al modelo, se prosiguió a realizar un acoplamiento molecular entre las biguanidas y diversas dianas biológicas cuyos sustratos o productos fuesen parte de los metabolitos candidatos incluidos en nuestra base de datos. La metodología detallada para la realización del acoplamiento se describe en la sección de materiales y métodos. Las dianas biológicas que se emplearon en el acoplamiento molecular, con sus respectivos códigos PDB, se muestran en la tabla 33. Asimismo, las coordenadas de la grid box usadas en el acoplamiento molecular para las distintas dianas biológicas se muestran en la tabla 34.

Tabla 33. Dianas biológicas seleccionadas para el acoplamiento molecular.

Target	PDB code
Arginasa 1 (ARG1)	6Q92
Arginasa 2 (ARG2)	6Q37
L-Ornitina transcarbamilasa (OTC)	1C9Y
L-Argininosuccinato sintasa (ASS)	2NZ2
Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)	3E7G
Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)	4D1O

Óxido nítrico sintasa neural (nNOS)	4D1N
Proteína arginina metiltransferasa 1 (PRMT1)	6NT2
Proteína arginina metiltransferasa 4 (PRMT4)	5DWQ
Dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1 (DDAH1)	3I2E
L-Ornitina descarboxilasa (ODC)	7S3G
Creatina cinasa cerebral (CKB)	3B6R
Creatina cinasa ubicua (CKU)	1QK1
Creatina cinasa mitocondrial (CKM)	1I0E
Guanidinoacetato metiltransferasa (GAMT)	3ORH
L-Arginina:L-Glicina amidinotransferasa (AGAT)	2JDW
Sensor citosólico de arginina para mTORC1 (CASTOR1)	5I2C
Miembro 9 de la familia 38 de acarreadores de solutos (SLC38A9)	6C08
Diamino oxidasa (DAO)	3HIG
Espermina sintasa (SPMS)	3C6K
Espermidina sintasa (SPDS)	2O06

Tabla 34. Parámetros de la grid box empleados en el acoplamiento molecular entre las biguanidas y las dianas seleccionadas.

Diana biológica	Tamaño de la grid box			Coordenadas de la grid box		
	X	Y	Z	X	Y	Z
ARG1	38	40	30	2.08	22.624	-11.323
ARG2	34	34	34	35.198	89.007	68.774
OTC	30	20	20	3.923	2.994	-22.584
ASS	30	38	30	3.147	37.218	18.577
iNOS	24	26	38	56.623	20.285	79.908
eNOS	40	40	40	18.814	243.469	24.373
nNOS	36	34	36	230.156	28.582	11.324
PRMT1	40	40	40	-4.725	36.708	-14.904
PRMT4	40	40	40	-16.476	21.323	13.604
DDAH1	40	40	40	24.179	-5.728	45.845
ODC	40	40	40	9.372	-3.213	60.512
CKU	48	34	44	49.427	17.144	104.641
CKM	58	44	54	1.013	15.828	91.566
GAMT	40	48	40	64.371	62.13	14.016
AGAT	44	44	44	47.049	65.583	13.552
CASTOR1	40	40	40	48.822	81.527	80.321
SLC38A9	28	28	28	-54.894	35.9	70.782
DAO	46	42	44	-32.828	-11.041	73.498
SPMS	20	32	20	6.611	67.642	0.787
SPDS	20	32	32	14.314	26.303	10.686

Durante los acoplamientos moleculares entre las biguanidas y las dianas biológicas, así como sus correspondientes ligandos, se recolectaron las energías de unión (kcal/mol) y las conformaciones (o modos) de unión entre el ligando evaluado y la diana. En la figura 49 se muestran los resultados que se obtuvieron de los acoplamientos moleculares a manera de esquema para representar las vías metabólicas de las que forman parte dichas dianas biológicas. Se incluyen los valores de energía de unión de las biguanidas, los sustratos y los productos reportados para cada diana correspondiente.

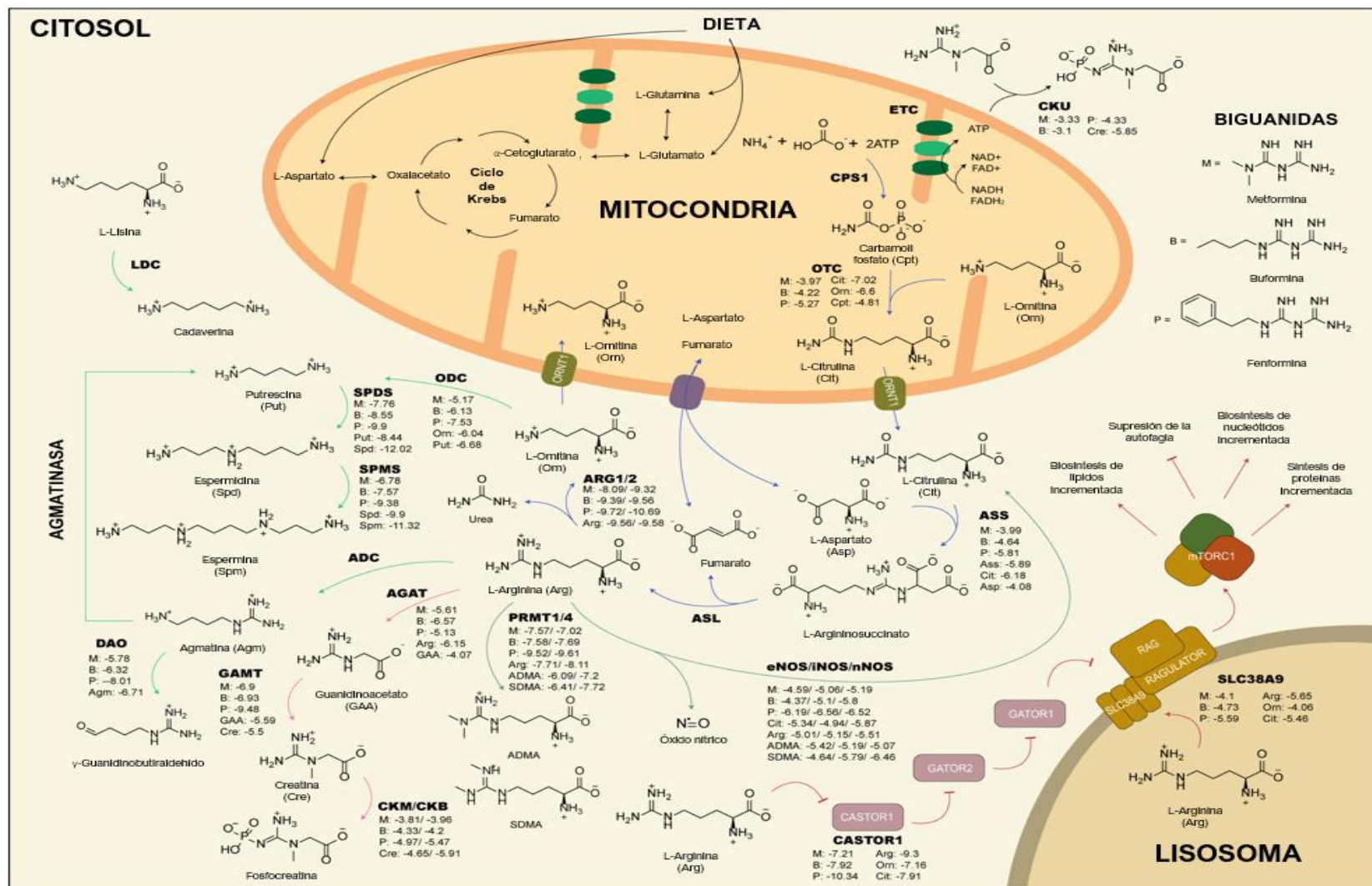


Figura 49. Energías de afinidad (kcal/mol) de los acoplamientos moleculares entre las biguanidas y las dianas biológicas seleccionadas.

Los resultados mostrados en la figura 42 demostraron que la afinidad, en términos de la energía de unión, que las biguanidas exhibieron en las dianas evaluadas era comparable a la de los sustratos o productos endógenos. Para algunas dianas, la energía de unión de las biguanidas incluso superaba a la de los sustratos o productos endógenos. Los ejemplos más notables fueron CASTOR1 donde las energías de unión de L-arginina, L-citrulina, L-ornitina, metformina, buformina, y fenformina fueron -9.3 kcal/mol, -7.91 kcal/mol, -7.16 kcal/mol, -7.21 kcal/mol, -7.92 kcal/mol, y -10.34 kcal/mol, respectivamente; la ARG1 donde las energías de unión obtenidas para L-arginina, metformina, buformina y fenformina fueron -9.56 kcal/mol, -8.09 kcal/mol, -9.39 kcal/mol, y -9.72 kcal/mol, respectivamente; y la ARG2 donde las energías de unión para L-arginina, metformina, buformina y fenformina fueron -9.58 kcal/mol, -9.32 kcal/mol, -9.56 kcal/mol, y -10.69 kcal/mol, respectivamente. Hay que destacar que, contrario a lo que se observó para las comparaciones estructurales y fisicoquímicas, la fenformina demostró ser la biguanida con mayor afinidad a las dianas biológicas evaluadas. El orden de afinidad que se seguía usualmente fue metformina, buformina y fenformina. De hecho, la potencia reportada para los efectos farmacológicos de las biguanidas sigue el mismo orden.

Para indagar más acerca de la unión entre las biguanidas y las dianas biológicas evaluadas se llevó a cabo un modelado molecular de las diferentes conformaciones (o modos de unión). El modelado molecular se llevó a cabo empleando el software UCSF Chimera X como se describió en la metodología. A continuación, en la figura

por puente de hidrógeno con aminoácidos en común del sitio activo. El mismo resultado se observó en la CKB, para la creatina y las biguanidas.

Todos los resultados recabados y generados anteriormente demostraron que la metformina, y las otras biguanidas, podrían ejercer su mecanismo de acción a través del antagonismo de las dianas de los metabolitos relacionados a L-arginina. En efecto estos resultados concuerdan con algunas observaciones obtenidas en los resultados experimentales del presente proyecto. Por ejemplo, se observó que el tratamiento con metformina fue capaz de disminuir la expresión de genes implicados en la biosíntesis de L-arginina, el metabolismo del óxido nítrico, entre otros.

Además de concordar con nuestros resultados, el modelo propuesto concuerda con la evidencia reportada por otros grupos de investigación.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y REFERENCIAS

6.1 Conclusiones

Con todos los resultados descritos en el presente proyecto se pueden formular algunas conclusiones con respecto a la hipótesis y los objetivos planteados. A continuación, se describirán las conclusiones de manera breve en forma de lista y de manera secuencial por objetivos:

- Con respecto a los objetivos del establecimiento y validación de un modelo de senescencia, se logró el desarrollo de un modelo de senescencia inducida por exposición a MMC en la línea celular de fibroblastos IMR90 con una metodología eficiente y reproducible. Este modelo se validó con dos pruebas consideradas el estándar de oro en la identificación de senescencia: la actividad de la β -galactosidasa y la sobreexpresión de los marcadores de senescencia, *CDKN1A* y *CDKN2A*.
- Se demostró que la metformina, a una concentración de 100 μ M, revirtió en gran medida la sobreexpresión de marcadores de senescencia en el modelo de células IMR90 expuestas a MMC, demostrando que, a concentraciones alcanzables con dosis clínicas, la metformina fue capaz de ejercer un posible

efecto senomórfico, pues inducía una disminución significativa en la expresión de los marcadores de senescencia *CDKN1A* y *CDKN2A*.

- A nivel transcripcional, la metformina indujo cambios notables en las células senescentes de nuestro modelo induciendo cambios en vías metabólicas esenciales para estas, asimismo disminuyendo la expresión de genes asociados al funcionamiento del lisosoma y las vías relacionadas al cáncer, entre otras características.
- A nivel metabólico, el tratamiento con metformina indujo cambios significativos en la composición del secretoma de los fibroblastos senescentes, afectando principalmente a la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada como L-valina, L-leucina y L-isoleucina.
- A nivel proteómico, no se pudo demostrar los efectos del tratamiento con metformina sobre las células senescentes de nuestro modelo, debido a los problemas relacionados con las muestras o la metodología.
- Se demostró que el tratamiento con el secretoma de los fibroblastos senescentes tratados con metformina indujo una disminución en la expresión de genes implicados en procesos moleculares asociados a una mayor malignidad como, por ejemplo, la evasión de la apoptosis, invasión y metástasis, angiogénesis, proliferación, etc. Todo esto comparado con las células MCF-7 que fueron tratadas con el secretoma de los fibroblastos senescentes.
- El modelo computacional de nuestra propuesta de un posible mecanismo de acción de la metformina sugirió que esta (o las biguanidas en general) podrían estar interfiriendo con el metabolismo de distintos metabolitos relacionados

estructuralmente a la L-arginina, incluyendo creatina, agmatina, entre otros. Por consiguiente, los posibles blancos biológicos que pudieran explicar el mecanismo de acción de la metformina serían aquellos cuyos sustratos o productos fueran dichas moléculas. Este mecanismo está en concordancia con los datos observados a nivel transcripcional pues se observaron cambios significativos en vías metabólicas relacionadas a L-arginina, poliaminas, agmatina, entre otras sustancias.

En resumidas cuentas, se puede decir que se acepta la hipótesis del presente proyecto pues, en efecto, la metformina fue capaz de alterar el transcriptoma de las células senescentes, y como resultado de esto, alterar su metaboloma (y posiblemente su proteoma debido a que los cambios en las concentraciones de metabolitos se deben a cambios enzimáticos). De manera consecuente, los secretomas de los fibroblastos senescentes tratados con metformina indujeron una disminución en los genes asociados a rasgos malignos de las células MCF-7 cuando se compararon con el grupo de células MCF-7 tratadas con el secretoma de fibroblastos senescentes.

6.2 Perspectivas

Se debería continuar con el estudio de los efectos de la metformina sobre las células senescentes pues ha demostrado ser un potencial agente senomórfico aun a concentraciones alcanzables con dosis clínicas. Además, debido a que la senescencia está asociada con el desarrollo de prácticamente cualquier

enfermedad crónica y el envejecimiento, elucidar y establecer los mecanismos y los beneficios de la metformina sobre estos modelos abre la posibilidad ampliar su uso como agente profiláctico para el envejecimiento y las enfermedades crónicas. La ventaja que tiene la metformina comparada con nuevas moléculas que se estén diseñando para funcionar como senolíticos o senomórficos, es que su perfil de seguridad está bien establecido, es un fármaco fácil de adquirir y cuyo reposicionamiento sería más rápido y sencillo que el de un fármaco nuevo que tenga que atravesar todas las fases preclínicas y clínicas para aprobar su uso.

Hay que agregar que, en el futuro se debería ahondar de nuevo la parte la proteómica debido a los problemas que se tuvieron en el presente proyecto. Así como cambiar las técnicas utilizadas en la metabolómica, debido a que la resonancia magnética nuclear es menos sensible a la detección y cuantificación de metabolitos que otras técnicas como la espectrometría de masas. De manera similar, se podría estudiar el transcriptoma de las células senescentes tratadas con metformina usando secuenciación de ARN, para medir otro tipo de ARNs diferentes a los mensajeros, incluyendo a los miARNs, ARN no codificantes largos, entre otros.

6.3 Referencias

1. Wang, Z. Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling. *Cells* **10**, 3327 (2021).
2. Nelson, D. M. *et al.* Coupling of DNA Synthesis and Histone Synthesis in S Phase Independent of Cyclin/cdk2 Activity. *Mol Cell Biol* **22**, 7459–7472 (2002).
3. Weinert, T. A. & Hartwell, L. H. The RAD9 Gene Controls the Cell Cycle Response to DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (1979)* **241**, 317–322 (1988).
4. Marescal, O. & Cheeseman, I. M. Cellular Mechanisms and Regulation of Quiescence. *Dev Cell* **55**, 259–271 (2020).
5. Wee, P. & Wang, Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)* **9**, 52 (2017).
6. Ray, S. *et al.* A Review on Cell Cycle Checkpoints in Relation to Cancer. *The Journal of Medical Sciences* **5**, 88–95 (2020).
7. Awasthi, P., Foiani, M. & Kumar, A. ATM and ATR signaling at a glance. *J Cell Sci* **129**, 1285–1285 (2016).
8. Patil, M., Pabla, N. & Dong, Z. Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70**, 4009–4021 (2013).
9. Henley, S. A. & Dick, F. A. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell Div* **7**, 10 (2012).
10. Kasthuber, E. R. & Lowe, S. W. Putting p53 in Context. *Cell* **170**, 1062–1078 (2017).
11. Buttitta, L. A. & Edgar, B. A. Mechanisms controlling cell cycle exit upon terminal differentiation. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 697–704 (2007).
12. Marescal, O. & Cheeseman, I. M. Cellular Mechanisms and Regulation of Quiescence. *Dev Cell* **55**, 259–271 (2020).
13. He, S. & Sharpless, N. E. Senescence in Health and Disease. *Cell* **169**, 1000–1011 (2017).
14. Yun, M. H. Cellular senescence in tissue repair: every cloud has a silver lining. *Int J Dev Biol* **62**, 591–604 (2018).

15. Srinivas, N., Rachakonda, S. & Kumar, R. Telomeres and Telomere Length: A General Overview. *Cancers (Basel)* **12**, 558 (2020).
16. Hernandez-Segura, A., Brandenburg, S. & Demaria, M. Induction and Validation of Cellular Senescence in Primary Human Cells. *Journal of Visualized Experiments* (2018) doi:10.3791/57782.
17. Reisz, J. A., Bansal, N., Qian, J., Zhao, W. & Furdai, C. M. Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules—Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection. *Antioxid Redox Signal* **21**, 260–292 (2014).
18. Beukers, R., Eker, A. P. M. & Lohman, P. H. M. 50 years thymine dimer. *DNA Repair (Amst)* **7**, 530–543 (2008).
19. McKenna, E., Traganos, F., Zhao, H. & Darzynkiewicz, Z. Persistent DNA damage caused by low levels of mitomycin C induces irreversible cell senescence. *Cell Cycle* **11**, 3132–3140 (2012).
20. Sliwiska, M. A. *et al.* Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells. *Mech Ageing Dev* **130**, 24–32 (2009).
21. Leeansyah, E. *et al.* Inhibition of Telomerase Activity by Human Immunodeficiency Virus (HIV) Nucleos(t)ide Reverse Transcriptase Inhibitors: A Potential Factor Contributing to HIV-Associated Accelerated Aging. *J Infect Dis* **207**, 1157–1165 (2013).
22. Leontieva, O. V. & Blagosklonny, M. V. DNA damaging agents and p53 do not cause senescence in quiescent cells, while consecutive re-activation of mTOR is associated with conversion to senescence. *Ageing* **2**, 924–935 (2010).
23. Jeon, S.-M. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med* **48**, e245–e245 (2016).
24. Ovadya, Y. *et al.* Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging. *Nat Commun* **9**, 5435 (2018).
25. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The Hallmarks of Aging. *Cell* **153**, 1194–1217 (2013).
26. Powers, R. W., Kaeberlein, M., Caldwell, S. D., Kennedy, B. K. & Fields, S. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev* **20**, 174–184 (2006).
27. Hansen, M. *et al.* Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Ageing Cell* **6**, 95–110 (2007).
28. Kapahi, P. *et al.* Regulation of Lifespan in *Drosophila* by Modulation of Genes in the TOR Signaling Pathway. *Current Biology* **14**, 885–890 (2004).

29. Robert, L. & Fulop, T. Longevity and Its Regulation: Centenarians and Beyond. in 198–211 (2014). doi:10.1159/000358907.
30. Vitale, G., Pellegrino, G., Vallery, M. & Hofland, L. J. ROLE of IGF-1 System in the Modulation of Longevity: Controversies and New Insights From a Centenarians' Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)* **10**, (2019).
31. Cho, K. A. *et al.* Morphological Adjustment of Senescent Cells by Modulating Caveolin-1 Status. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 42270–42278 (2004).
32. Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 9363–9367 (1995).
33. Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960–976 (2017).
34. van Deursen, J. M. The role of senescent cells in ageing. *Nature* **509**, 439–446 (2014).
35. Tonnessen-Murray, C. A. *et al.* Chemotherapy-induced senescent cancer cells engulf other cells to enhance their survival. *Journal of Cell Biology* **218**, 3827–3844 (2019).
36. Yang, N. & Sen, P. The senescent cell epigenome. *Aging* **10**, 3590–3609 (2018).
37. Salminen, A., Kauppinen, A. & Kaarniranta, K. Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Signal* **24**, 835–845 (2012).
38. James, E. L. *et al.* Senescent Human Fibroblasts Show Increased Glycolysis and Redox Homeostasis with Extracellular Metabolomes That Overlap with Those of Irreparable DNA Damage, Aging, and Disease. *J Proteome Res* **14**, 1854–1871 (2015).
39. Kennedy, B. K. *et al.* Geroscience: Linking Aging to Chronic Disease. *Cell* **159**, 709–713 (2014).
40. Samarakoon, S. M. S., Ravishankar, B. & Chandola, H. Effect of dietary, social, and lifestyle determinants of accelerated aging and its common clinical presentation: A survey study. *AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda)* **32**, 315 (2011).
41. Aguayo-Mazzucato, C. *et al.* Acceleration of β Cell Aging Determines Diabetes and Senolysis Improves Disease Outcomes. *Cell Metab* **30**, 129-142.e4 (2019).

42. Singh, T. & Newman, A. B. Inflammatory markers in population studies of aging. *Ageing Res Rev* **10**, 319–329 (2011).
43. Rana, J. S., Khan, S. S., Lloyd-Jones, D. M. & Sidney, S. Changes in Mortality in Top 10 Causes of Death from 2011 to 2018. *J Gen Intern Med* **36**, 2517–2518 (2021).
44. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
45. Ferlay, J. *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer* **149**, 778–789 (2021).
46. Loponte, S., Lovisa, S., Deem, A. K., Carugo, A. & Viale, A. The Many Facets of Tumor Heterogeneity: Is Metabolism Lagging Behind? *Cancers (Basel)* **11**, 1574 (2019).
47. Wang, M. *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer* **8**, 761–773 (2017).
48. Zhu, X. *et al.* Energy metabolism in cancer stem cells. *World J Stem Cells* **12**, 448–461 (2020).
49. Moharil, R., Dive, A., Khandekar, S. & Bodhade, A. Cancer stem cells: An insight. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* **21**, 463 (2017).
50. Ortiz-Montero, P., Londoño-Vallejo, A. & Vernet, J.-P. Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cell Communication and Signaling* **15**, 17 (2017).
51. Saoudaoui, S. *et al.* mTOR as a senescence manipulation target: A forked road. in 335–363 (2021). doi:10.1016/bs.acr.2021.02.002.
52. Boucher, J., Kleinridders, A. & Kahn, C. R. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a009191–a009191 (2014).
53. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **5**, 99–118 (2010).
54. Terlecki-Zaniewicz, L. *et al.* Small extracellular vesicles and their miRNA cargo are anti-apoptotic members of the senescence-associated secretory phenotype. *Ageing* **10**, 1103–1132 (2018).
55. Faget, D. V., Ren, Q. & Stewart, S. A. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat Rev Cancer* **19**, 439–453 (2019).

56. Laberge, R.-M., Awad, P., Campisi, J. & Desprez, P.-Y. Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Senescent Fibroblasts. *Cancer Microenvironment* **5**, 39–44 (2012).
57. Jakhar, R. & Crasta, K. Exosomes as Emerging Pro-Tumorigenic Mediators of the Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Int J Mol Sci* **20**, 2547 (2019).
58. Kim, E.-C. & Kim, J.-R. Senotherapeutics: emerging strategy for healthy aging and age-related disease. *BMB Rep* **52**, 47–55 (2019).
59. Thompson, P. J. *et al.* Targeted Elimination of Senescent Beta Cells Prevents Type 1 Diabetes. *Cell Metab* **29**, 1045-1060.e10 (2019).
60. Zhou, D.-D. *et al.* Effects and Mechanisms of Resveratrol on Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev* **2021**, 1–15 (2021).
61. Luo, J., Si, H., Jia, Z. & Liu, D. Dietary Anti-Aging Polyphenols and Potential Mechanisms. *Antioxidants* **10**, 283 (2021).
62. Bailey, C. J. Metformin: historical overview. *Diabetologia* **60**, 1566–1576 (2017).
63. Foretz, M., Guigas, B. & Viollet, B. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* **15**, 569–589 (2019).
64. LaMoia, T. E. & Shulman, G. I. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. *Endocr Rev* **42**, 77–96 (2021).
65. Liang, X. & Giacomini, K. M. Transporters Involved in Metformin Pharmacokinetics and Treatment Response. *J Pharm Sci* **106**, 2245–2250 (2017).
66. DeCensi, A. *et al.* Metformin and Cancer Risk in Diabetic Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Prevention Research* **3**, 1451–1461 (2010).
67. Gandini, S. *et al.* Metformin and Cancer Risk and Mortality: A Systematic Review and Meta-analysis Taking into Account Biases and Confounders. *Cancer Prevention Research* **7**, 867–885 (2014).
68. Saini, N. & Yang, X. Metformin as an anti-cancer agent: actions and mechanisms targeting cancer stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **50**, 133–143 (2018).
69. Cha, J.-H. *et al.* Metformin Promotes Antitumor Immunity via Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation of PD-L1. *Mol Cell* **71**, 606-620.e7 (2018).

70. Oliveras-Ferraros, C. *et al.* Metformin rescues cell surface major histocompatibility complex class I (MHC-I) deficiency caused by oncogenic transformation. *Cell Cycle* **11**, 865–870 (2012).
71. Hattori, Y., Suzuki, K., Hattori, S. & Kasai, K. Metformin Inhibits Cytokine-Induced Nuclear Factor κ B Activation Via AMP-Activated Protein Kinase Activation in Vascular Endothelial Cells. *Hypertension* **47**, 1183–1188 (2006).
72. Liu, J. *et al.* Association between antidiabetic agents use and leukocyte telomere shortening rates in patients with type 2 diabetes. *Aging* **11**, 741–755 (2019).
73. Soraya, H. *et al.* Anti-angiogenic Effects of Metformin, an AMPK Activator, on Human Umbilical Vein Endothelial Cells and on Granulation Tissue in Rat. *Iran J Basic Med Sci* **15**, 1202–9 (2012).
74. Kannarkatt, J., Alkharabsheh, O., Tokala, H. & Dimitrov, N. V. Metformin and Angiogenesis in Cancer - Revisited. *Oncology* **91**, 179–184 (2016).
75. LIANG, G. *et al.* Metformin upregulates E-cadherin and inhibits B16F10 cell motility, invasion and migration. *Oncol Lett* **10**, 1527–1532 (2015).
76. Esparza-López, J., Alvarado-Muñoz, J. F., Escobar-Arriaga, E., Ulloa-Aguirre, A. & de Jesús Ibarra-Sánchez, M. Metformin reverses mesenchymal phenotype of primary breast cancer cells through STAT3/NF- κ B pathways. *BMC Cancer* **19**, 728 (2019).
77. Lei, Y. *et al.* Metformin targets multiple signaling pathways in cancer. *Chin J Cancer* **36**, 17 (2017).
78. Sena, P. *et al.* Metformin Induces Apoptosis and Alters Cellular Responses to Oxidative Stress in Ht29 Colon Cancer Cells: Preliminary Findings. *Int J Mol Sci* **19**, 1478 (2018).
79. Bumgarner, R. Overview of DNA Microarrays: Types, Applications, and Their Future. *Curr Protoc Mol Biol* **101**, (2013).
80. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**, 57–63 (2009).
81. Olshina, M. A. & Sharon, M. Mass spectrometry: a technique of many faces. *Q Rev Biophys* **49**, e18 (2016).
82. Urban, P. L. Quantitative mass spectrometry: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **374**, 20150382 (2016).
83. Coskun, O. Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. *North Clin Istanb* (2016) doi:10.14744/nci.2016.32757.

84. Casella, G. *et al.* Transcriptome signature of cellular senescence. *Nucleic Acids Res* **47**, 7294–7305 (2019).
85. Marques, L., Johnson, A. A. & Stolzing, A. Doxorubicin generates senescent microglia that exhibit altered proteomes, higher levels of cytokine secretion, and a decreased ability to internalize amyloid β . *Exp Cell Res* **395**, 112203 (2020).
86. James, E. L., Lane, J. A. E., Michalek, R. D., Karoly, E. D. & Parkinson, E. K. Replicatively senescent human fibroblasts reveal a distinct intracellular metabolic profile with alterations in NAD⁺ and nicotinamide metabolism. *Sci Rep* **6**, 1–15 (2016).
87. Quijano, C. *et al.* Oncogene-induced senescence results in marked metabolic and bioenergetic alterations. *Cell Cycle* **11**, 1383–1392 (2012).
88. Sun, C. *et al.* Re-equilibration of imbalanced NAD metabolism ameliorates the impact of telomere dysfunction. *EMBO J* **39**, (2020).
89. Basisty, N. *et al.* A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biol* **18**, e3000599 (2020).
90. Nacarelli, T. *et al.* NAD + metabolism governs the proinflammatory senescence-associated secretome. *Nat Cell Biol* **21**, 397–407 (2019).
91. Moiseeva, O. *et al.* Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. *Aging Cell* **12**, 489–498 (2013).
92. Acar, M. B. *et al.* Proteomic and Biological Analysis of the Effects of Metformin Senomorphics on the Mesenchymal Stromal Cells. *Front Bioeng Biotechnol* **9**, (2021).
93. Georgopoulos, M., Vass, C., Vatanparast, Z., Wolfsberger, A. & Georgopoulos, A. Activity Of Dissolved Mitomycin C After Different Methods Of Long-term Storage. *J Glaucoma* **11**, 17–20 (2002).
94. Brauer, E. *et al.* Dissecting the influence of cellular senescence on cell mechanics and extracellular matrix formation in vitro. *Aging Cell* **22**, (2023).
95. Veloso, A. *et al.* Rate of elongation by RNA polymerase II is associated with specific gene features and epigenetic modifications. *Genome Res* **24**, 896–905 (2014).
96. Noren Hooten, N. & Evans, M. K. Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence. *Journal of Visualized Experiments* (2017) doi:10.3791/55533.

97. Gradishar, W. J. *et al.* NCCN Guidelines® Insights: Breast Cancer, Version 4.2023. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* **21**, 594–608 (2023).
98. IMR-90 - CCL-186 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/ccl-186>.
99. Yosef, R. *et al.* p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling. *EMBO J* **36**, 2280–2295 (2017).
100. Stein, G. H. & Dulić, V. Molecular Mechanisms for the Senescent Cell Cycle Arrest. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* **3**, 14–18 (1998).
101. Hoare, M. *et al.* NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nat Cell Biol* **18**, 979–992 (2016).
102. Zhang, X., Wu, X., Tang, W. & Luo, Y. Loss of p16Ink4a Function Rescues Cellular Senescence Induced by Telomere Dysfunction. *Int J Mol Sci* **13**, 5866–5877 (2012).
103. Buj, R., Leon, K. E., Anguelov, M. A. & Aird, K. M. Suppression of p16 alleviates the senescence-associated secretory phenotype. *Aging* **13**, 3290–3312 (2021).
104. Mongiardi, M. P., Pellegrini, M., Pallini, R., Levi, A. & Falchetti, M. L. Cancer Response to Therapy-Induced Senescence: A Matter of Dose and Timing. *Cancers (Basel)* **13**, 484 (2021).
105. Molnar, Z., Millward, A. B., Tse, W. & Demaine, A. G. p21^{WAF1/CIP1} Expression is Differentially Regulated by Metformin and Rapamycin. *Int J Chronic Dis* **2014**, 1–17 (2014).
106. Yan, S. *et al.* Metformin regulates chondrocyte senescence and proliferation through microRNA-34a/SIRT1 pathway in osteoarthritis. *J Orthop Surg Res* **18**, 198 (2023).
107. Li, Z. *et al.* Metformin Ameliorates Senescence of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and Attenuates Osteoarthritis Progression via the AMPK-Dependent Autophagy Pathway. *Oxid Med Cell Longev* **2022**, 1–17 (2022).
108. Bernard, M. *et al.* Autophagy drives fibroblast senescence through MTORC2 regulation. *Autophagy* **16**, 2004–2016 (2020).
109. Sasaki, M., Miyakoshi, M., Sato, Y. & Nakanuma, Y. Autophagy mediates the process of cellular senescence characterizing bile duct damages in primary biliary cirrhosis. *Laboratory Investigation* **90**, 835–843 (2010).

110. Yu, Z. *et al.* Cathepsin S is a novel target for age-related dry eye. *Exp Eye Res* **214**, 108895 (2022).
111. Pun, F. W. *et al.* Hallmarks of aging-based dual-purpose disease and age-associated targets predicted using PandaOmics AI-powered discovery engine. *Aging* **14**, 2475–2506 (2022).
112. Torres-Hernandez, A. *et al.* Targeting SYK signaling in myeloid cells protects against liver fibrosis and hepatocarcinogenesis. *Oncogene* **38**, 4512–4526 (2019).
113. Simone, C. *et al.* p38 pathway targets SWI-SNF chromatin-remodeling complex to muscle-specific loci. *Nat Genet* **36**, 738–743 (2004).
114. Wang, W., Pan, K., Chen, Y., Huang, C. & Zhang, X. The acetylation of transcription factor HBP1 by p300/CBP enhances p16INK4A expression. *Nucleic Acids Res* **40**, 981–995 (2012).
115. Xu, Y., Li, N., Xiang, R. & Sun, P. Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence. *Trends Biochem Sci* **39**, 268–276 (2014).
116. Martin, N. & Bernard, D. Calcium signaling and cellular senescence. *Cell Calcium* **70**, 16–23 (2018).
117. Wu, X. *et al.* Opposing roles for calcineurin and ATF3 in squamous skin cancer. *Nature* **465**, 368–372 (2010).
118. Menendez, J. A. & Alarcón, T. Senescence-Inflammatory Regulation of Reparative Cellular Reprogramming in Aging and Cancer. *Front Cell Dev Biol* **5**, (2017).
119. Méndez-López, L. F. Revisiting Epithelial Carcinogenesis. *Int J Mol Sci* **23**, 7437 (2022).
120. Seo, Y. *et al.* Enhanced glycogenesis is involved in cellular senescence via GSK3/GS modulation. *Aging Cell* **7**, 894–907 (2008).
121. Zhan, J. *et al.* AMPK/TSC2/mTOR pathway regulates replicative senescence of human vascular smooth muscle cells. *Exp Ther Med* (2018) doi:10.3892/etm.2018.6767.
122. Romero, A. *et al.* The angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis protects from endothelial cell senescence via klotho and Nrf2 activation. *Aging Cell* **18**, (2019).
123. Yi, H. *et al.* Overexpression of Rho-Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 2 Is Correlated with Clinical Progression and Poor Prognosis in Breast Cancer. *Medical Science Monitor* **24**, 4776–4781 (2018).

124. Park, T. Crk and CrkL as Therapeutic Targets for Cancer Treatment. *Cells* **10**, 739 (2021).
125. Lv, Q. *et al.* FGFR1 Is Associated With Tamoxifen Resistance and Poor Prognosis of ER-Positive Breast Cancers by Suppressing ER Protein Expression. *Technol Cancer Res Treat* **20**, 153303382110049 (2021).