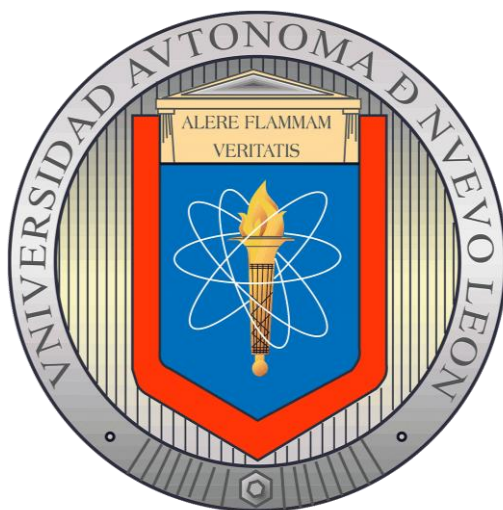


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



GENERACIÓN DE CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS
PRODUCTORAS DE INSULINA A PARTIR DE CÉLULAS MADRE
PLURIPOTENTES INDUCIDAS PROVENIENTES DE UNA LÍNEA
CELULAR DE FIBROBLASTOS HUMANOS.

Por:

M.C. JOSÉ LUIS GONZÁLEZ LLERENA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA

San Nicolás de los Garza, N.L., a junio del 2025

GENERACIÓN DE CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS PRODUCTORAS DE INSULINA A PARTIR DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS PROVENIENTES DE UNA LÍNEA CELULAR DE FIBROBLASTOS HUMANOS.

Aprobación de la Tesis:



Dr. Isaías Balderas Rentería
Presidente



Dr. Omar González Santiago
Secretario



Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera
Vocal



Dra. Patricia González Barranco
Vocal



Dr. Luis Fernando Méndez López
Vocal



DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS
Sub-Directora de Posgrado

GENERACIÓN DE CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS PRODUCTORAS DE INSULINA A PARTIR DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS PROVENIENTES DE UNA LÍNEA CELULAR DE FIBROBLASTOS HUMANOS.

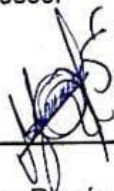
Revisión de la Tesis:



Dr. Isaias Balderas Rentería
Asesor



Dr. Luis Fernando Méndez López
Co-Asesor



Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera
Comité tutorial



Dra. Patricia González Barranco
Comité tutorial



Dr. Omar González Santiago
Comité tutorial



DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS
Sub-Directora de Posgrado

Resumen

José Luis González Llerena

Universidad Autónoma de Nuevo León

Candidato al grado de Doctor en

Facultad de Ciencias Químicas

Ciencias con Orientación en Farmacia

Título del proyecto: “GENERACIÓN DE CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS PRODUCTORAS DE INSULINA A PARTIR DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS PROVENIENTES DE UNA LÍNEA CELULAR DE FIBROBLASTOS HUMANOS. “

Número de páginas: 161

Fecha de graduación: 2025

Objetivos y métodos: El presente estudio tuvo como objetivo evaluar si el fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP), obtenido de fibroblastos humanos IMR-90 tratados con mitomicina C, es capaz de inducir plasticidad celular en fibroblastos diferenciados. También se planteó que la cordicepina, un nucleósido bioactivo, podría potenciar este efecto, respaldado por estudios donde ella y otras moléculas pequeñas, como el ácido valproico, aumentaron hasta cuatro veces la eficiencia en la generación de iPSC. Para ello, se indujo senescencia en células IMR-90 con mitomicina C y se recolectó el SASP. Posteriormente, fibroblastos no senescentes fueron expuestos durante 24 días al SASP, y entre los días 24 y 28, tratados con o sin cordicepina (20 μ M). Durante el proceso se evaluaron parámetros morfológicos y moleculares mediante tinción de β -galactosidasa, RT-qPCR y análisis de imágenes.

Los resultados mostraron que la exposición prolongada al SASP indujo características asociadas a la reprogramación parcial, como el incremento en la expresión de los factores de pluripotencia *KLF4* y *SOX2* ($p < 0.05$). La expresión elevada de *IL6* y *CDKN1A* confirmó el estado senescente de las células productoras del SASP. Además, se observó que la cordicepina contribuyó a disminuir marcadores asociados a senescencia, lo cual podría facilitar un entorno más favorable para la adquisición de plasticidad celular.

A continuación, las células fueron sometidas a un protocolo de diferenciación dirigido al linaje β -pancreático durante 12 días. Se confirmó un aumento significativo en la expresión de *NEUROG3* y *MAFB*, genes clave en la diferenciación endocrina pancreática. Finalmente, se realizaron estudios *in silico* para explorar los posibles mecanismos moleculares involucrados en el efecto de la cordicepina. El análisis reveló afinidades de unión elevadas entre la cordicepina y dianas intracelulares como la enzima adenilato ciclasa (energía libre de unión entre -8.1 y -10.3

kcal/mol), sugiriendo una modulación de la señalización por AMPc como vía potencialmente implicada.

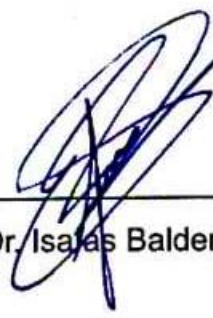
Contribuciones y conclusiones: En conjunto, los hallazgos apoyan la hipótesis de que el SASP puede inducir un estado de plasticidad celular en fibroblastos diferenciados. Además, se muestra que estas células pueden ser orientadas hacia un linaje funcionalmente relevante como el β -pancreático, lo cual representa una estrategia prometedora de reprogramación celular no genética con aplicaciones en medicina regenerativa y terapias contra la diabetes.

Nota del autor

Parte del contenido presentado en esta tesis ha sido previamente publicado en una revista científica internacional arbitrada. En particular, algunos de los resultados teóricos, modelos moleculares y análisis bioinformáticos incluidos en los capítulos correspondientes derivan del artículo:

Gonzalez-Llerena, J.L., Espinosa-Rodriguez, B.A., Treviño-Almaguer, D., Mendez-Lopez, L.F., Carranza-Rosales, P., Gonzalez-Barranco, P., Guzman-Delgado, N.E., Romo-Mancillas, A., & Balderas-Renteria, I. (2024). *Cordycepin Triphosphate as a Potential Modulator of Cellular Plasticity in Cancer via cAMP-Dependent Pathways: An In Silico Approach. International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), 5692. <https://doi.org/10.3390/ijms25115692>

Esta publicación corresponde al trabajo doctoral del autor y su inclusión en esta tesis tiene como finalidad presentar de manera integrada los hallazgos derivados del enfoque computacional.



Asesor: Dr. Isaias Balderas Rentería



Candidato a Doctor: M.C. José Luis
González Llerena

Agradecimientos

Primero, deseo expresar mi profundo agradecimiento al Dios Trino, Padre, Hijo y Espíritu Santo, por su infinita bondad y gracia, manifestada de manera suprema en Jesucristo y su sacrificio en la cruz para redimir a la humanidad. Su misericordia es inmensa, y, como dice el libro de los Proverbios, "Porque el Señor da sabiduría, de su boca vienen el conocimiento y la inteligencia". Agradezco a Dios por permitirme comprender y explorar una parte de su creación, lo que me llena de asombro. Estoy especialmente agradecido por su Providencia al darme una familia que me apoya incondicionalmente en todos mis proyectos y ora por mí, lo cual es fundamental en mi vida. Agradezco a mi padre, José Luis González Morales, mi madre, Hortensia Llerena Elizondo, y mi hermana, Rocío González Llerena, por su constante apoyo. Asimismo, agradezco a mi novia, Daniela Treviño Almaguer, por su comprensión y ayuda incondicional en este proyecto y en mi vida. Extiendo mi gratitud al Dr. Isaías Balderas Rentería, mi asesor de tesis, por su confianza en este proyecto, su orientación constante y por brindarme la oportunidad de crecer en el ámbito docente. Agradezco también al Dr. Bryan Alejandro Espinosa Rodríguez por su apoyo invaluable durante la realización de este trabajo. Mi gratitud también va dirigida a mis compañeros de laboratorio, siempre dispuestos a ayudarme. Agradezco a la Dra. Pilar Carranza Rosales por permitirnos el uso de su laboratorio en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS. Finalmente, agradezco a la Facultad de Ciencias Químicas por la oportunidad de llevar a cabo este proyecto y por el invaluable aprendizaje recibido de sus queridos y respetados maestros.

Tabla de contenido

Resumen.....	i
Agradecimientos.....	ii
Tabla de contenido.....	iii
Nomenclatura.....	vi
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	xii
Capítulo I.....	1
Introducción	1
1.1. Diabetes mellitus	1
1.1.1. Estadísticas.....	2
1.2. Fisiopatología de la diabetes mellitus.....	3
1.2.1. Fisiopatología de la DMT1	4
1.2.2. Fisiopatología de la DMT2	5
1.3. Tratamiento actual para DMT1 y DMT2	6
1.3.1. Medicina regenerativa: terapia con células madre	9
1.3.2. Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)	10
1.4. Senescencia celular, reprogramación y plasticidad celular	12
1.5. Mecanismos moleculares y consecuencias funcionales de la senescencia celular en contextos patológicos	13
1.6. Cambios en la expresión génica durante la senescencia.....	14
1.7. Plasticidad celular	17
1.8. Cordicepina	19
1.9. Diferenciación hacia células β -pancreáticas a partir de células pluripotentes.....	21
1.10. Repercusiones de la modulación de la señalización mediada por nucleótidos cíclicos en la plasticidad celular.	22
1.11. Comparación de los efectos de nucleótidos cíclicos en reprogramación y diferenciación celular.....	23
1.12. Implicaciones de la señalización de nucleótidos cíclicos en procesos de diferenciación/desdiferenciación y senescencia celular.	26
Capítulo II	29
2. Antecedentes	29

2.1. Obtención de iPSC	29
2.2. Obtención de células β -pancreáticas a partir de iPSC	31
2.3. Papel del SASP en la reprogramación celular	35
2.4. Cordicepina como modulador en la reprogramación celular y mantenimiento de la pluripotencia.....	38
Capítulo III	40
3. Hipótesis y objetivos	40
3.1. Aportación científica	40
3.2. Hipótesis	41
3.3. Objetivo general	41
3.4. Objetivos específicos	42
Capítulo IV.....	44
4. Materiales y metodología.....	44
4.1. Materiales y Reactivos	44
4.1.1. Materiales.....	44
4.1.2. Reactivos	45
4.2. Equipos	47
4.3. Laboratorios	48
4.4. Metodología general.....	48
4.5. Cultivo de las células IMR-90	51
4.5.1. Descongelación de las células	51
4.5.2. Cambios de medio	52
4.5.3. Subcultivos de células.....	52
4.6. Inducción de senescencia en la línea celular IMR-90 y recolección de SASP.....	53
4.6.1. Confirmación del establecimiento de senescencia.....	55
4.7. Análisis de la expresión de los genes de pluripotencia, senescencia y células similares a β - pancreática	57
4.7.1. Diseño de primers para marcadores de pluripotencia	57
4.7.2. Extracción de ARN	58
4.7.3. RT-PCR.....	59

4.7.4. qPCR.....	60
4.8. Obtención de células desdiferenciadas.....	63
4.9. Diferenciación de células desdiferenciadas a células β -pancreáticas.....	65
4.9.1. Caracterización de células β por qPCR y morfológica	68
4.9.2. Análisis estadístico	69
4.10. Propuesta de mecanismo de acción molecular de la cordicepina en procesos de desdiferenciación/diferenciación celular: metodología computacional.	70
4.10.1. Análisis comparativo de la estructura de la cordicepina y sus análogos frente a compuestos derivados de purinas.....	71
4.10.2. Análisis fisicoquímico comparativo entre la cordicepina, sus análogos y los compuestos derivados de purinas	72
4.10.3. Identificación de posibles blancos moleculares basada en las propiedades estructurales de la cordicepina y sus compuestos análogos	73
4.10.4. Estudio comparativo de afinidad y mecanismos de interacción de la cordicepina y sus derivados frente a blancos moleculares de metabolitos endógenos	74
4.10.5. Simulaciones de dinámica molecular	75
4.10.6. Metadinámica bien temperada	75
4.11. Gestión y disposición de residuos	77
Capítulo V	78
5. Resultados y discusión	78
5.1. Inducción experimental de senescencia celular en fibroblastos humanos IMR-90	78
5.2. Recolección de SASP	80
5.3. Resultados del proceso de desdiferenciación o reprogramación celular.	81
5.4. Resultados del proceso de diferenciación	96
5.5. Resultados del análisis <i>in silico</i>	103
5.5.1. Resultados del análisis <i>in silico</i> del posible mecanismo de acción de la cordicepina en procesos de diferenciación/desdiferenciación y senescencia celular.....	103
5.5.2. Evaluación de la similitud 2D y 3D para evaluar la similitud estructural de la cordicepina con metabolitos endógenos.	105

5.5.3. Comparación fisicoquímica de la cordicepina y sus derivados frente a los derivados de purinas.	108
5.5.4. Predicción de blancos moleculares según las características estructurales de la cordicepina y sus derivados.	111
5.5.5. Análisis comparativo de la afinidad y modos de unión de la cordicepina y sus derivados con blancos endógenos.	112
5.5.6. Evaluación de la afinidad de la cordicepina y sus derivados por enzimas que utilizan ATP como sustrato.	114
5.5.7. Dinámica molecular.	120
5.5.8. Relajación de complejos mediante simulaciones de dinámica molecular.	122
5.5.9. Simulaciones de metadinámica bien temperada.	129
5.5.10. Propuesta del mecanismo de acción de la cordicepina mediada por nucleótidos cíclicos y su relación con la plasticidad celular.	136
Capítulo VI.	143
6. Conclusiones.	143
Capítulo VII.	145
7. Perspectivas.	145
Capítulo VIII.	147
8. Referencias.	147

NOMENCLATURA

3'-dIMP	Monofosfato de 3'-desoxiinosina
3'-dINO	3'-desoxiinosina
3'-dSAM	3'-desoxi-S-adenosilmetionina
A1R	Receptor de adenosina 1
A2AR	Receptor de adenosina 2 A
A2BR	Receptor de adenosina 2 B
ADA	Adenosina desaminasa
ADK	Adenosina quinasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADO	Adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ANOVA	Análisis de variancia
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CDKN1A (p21)	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A. (Inhibidor 1A de la Quinasa Dependiente de Ciclinas)
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
COR	Cordicepina
COR-DP	Cordicepina difosfato
COR-MP	Cordicepina monofosfato
COR-TP	Cordicepina trifosfato
CT	Color Tanimoto
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Medio de cultivo celular)
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DNMT1	ADN metiltransferasa 1
DNMT3A	ADN metiltransferasa 3 alfa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (agente quelante)
ENPP3	Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 3
GDP	Difosfato de guanosina
GMP	Monofosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
IDP	Difosfato de inosina
IL6	Interleucina 6 (marcador de inflamación y senescencia)
IMP	Monofosfato de inosina
INO	Inosina
iPSC	Células madre pluripotentes inducidas

ITP	Trifosfato de inosina
KLF4	Kruppel-like factor 4 (factor de pluripotencia)
MAFB	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B. Homólogo B del oncogén maf aviar de fibrosarcoma musculoaponeurótico
MAT	Metionina adenosil transferasa
MMC	Mitomicina C
NEUROD1	Factor de transcripción neuronal diferenciado 1
NEUROG3	Neurogenina 3 (factor clave en la diferenciación de células β - pancreáticas)
NT5C2	5'-nucleotidasa II citosólica
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos (Phosphate-buffered saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PNP	Purina nucleósido fosforilasa
qPCR	PCR en tiempo real (cuantificación de expresión génica)
RT-PCR	PCR con transcripción reversa
RT-qPCR	PCR cuantitativa de transcripción inversa en tiempo real
sAC	Adenilato ciclasa soluble
SAM	S-adenosilmetionina
SASP	Fenotipo secretor asociado a senescencia
SFB	Suero fetal bovino
SOX2	SRX-Box Transcription Factor 2 (factor de pluripotencia)
ST	Shape Tanimoto
SYBR Green	Tinte fluorescente utilizado en qPCR
TBE	Tris/Borato/EDTA (solución tampón utilizada en electroforesis de ácidos nucleicos)
TC	Coefficiente de Tanimoto
tmAC	Adenilato ciclasa transmembrana
X-Gal	Sustrato cromogónico para detección de β -galactosidasa

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I: Introducción

Figura 1. Mecanismo catalítico de la AC. El ion magnesio se coordina con los fosfatos β y γ del ATP para facilitar la reacción. El grupo hidroxilo en la posición 3' lleva a cabo un ataque nucleofílico intramolecular sobre el fosfato alfa ($P\alpha$), lo que da lugar a la formación de un heterociclo dentro de la estructura de la ribosa. Este heterociclo incluye el grupo fosfato enlazado a través de un átomo de oxígeno al carbono 5' y otro átomo de oxígeno al carbono 3' (A). Además, la reacción genera una molécula de pirofosfato y un ion hidrógeno (B).....18

CAPITULO IV: Materiales y metodología

Figura 2. Metodología general de la obtención de células similares a β - pancreáticas a partir de fibroblastos IMR-90 utilizando SASP para la inducción de desdiferenciación.....50

Figura 3. Metodología de inducción de senescencia y recolección de SASP55

Figura 4. Proceso de adición de SASP a fibroblastos IMR-90 para obtener células desdiferenciadas.....63

Figura 5. Diagrama cronológico de la metodología general para la obtención de células desdiferenciadas mediante exposición a SASP, se obtuvieron transcritos de ARN de los días 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28.....64

Figura 6. Diagrama cronológico del proceso de diferenciación hacia células similares a β -pancreáticas dividido en 6 fases.....66

Figura 7. Diagrama de la metodología in silico para la propuesta del mecanismo de acción de la cordicepina en procesos de plasticidad celular.....76

CAPITULO V: Resultados y discusión

Figura 8. Inducción de senescencia en células IMR-90. Cambio morfológico observado.....79

Figura 9. Ensayo de la β -galactosidasa después de la inducción de senescencia en células IMR-90. Tinción observada a 10x.....80

Figura 10. Geles de electroforesis al 2% en buffer TBE 1X de las muestras de ARN en los diferentes días, iniciando con el día 0 como CT y hasta el día 28.....81

Figura 11. Expresión relativa del marcador de senescencia IL6 en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP (SASP) en periodos de 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 días de incubación. Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns).....	83
Figura 12. Expresión relativa del marcador de senescencia CDKN1A en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP (SASP) en periodos de 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 días de incubación. Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns).....	84
Figura 13. Expresión relativa del marcador de pluripotencia KLF4 en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP (SASP) en periodos de 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 días de incubación. Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns).....	85
Figura 14. Expresión relativa del marcador de pluripotencia SOX2 en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP (SASP) en periodos de 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 días de incubación. Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns).....	86
Figura 15. Expresión relativa de los marcadores de senescencia (IL6 y CDKN1A) y de pluripotencia (KLF4 y SOX2) en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP (SASP) en periodos de 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 días de incubación.....	87
Figura 16. Morfología de los fibroblastos IMR-90 sin tratamiento.	88
Figura 17. Morfología de los fibroblastos IMR-90 después de 24 días expuestas a SASP.....	89
Figura 18. Expresión relativa del marcador de senescencia IL6 en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP al 25% (SASP), cordicepina a 20 μ M (COR) y un grupo con ambos (SASP + COR) en un periodo de incubación de 4 días (del día 24 al 28). Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns).....	90
Figura 19. Expresión relativa del marcador de senescencia CDKN1A en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP al 25% (SASP), cordicepina a 20 μ M (COR) y un grupo con ambos (SASP + COR) en un periodo de incubación de 4 días (del día 24 al 28). Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns).....	91
Figura 20. Expresión relativa del marcador de pluripotencia KLF4 en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP al 25% (SASP), cordicepina a 20 μ M (COR) y un grupo con ambos (SASP + COR) en un periodo de incubación de 4 días (del día 24 al 28). Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns).....	92

Figura 21. Expresión relativa del marcador de pluripotencia SOX2 en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP al 25% (SASP), cordicepina a 20 μ M (COR) y un grupo con ambos (SASP + COR) en un periodo de incubación de 4 días (del día 24 al 28). Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns).....	93
Figura 22. Expresión relativa del marcador de células similares a β -pancreática MAFB en los fibroblastos IMR-90 desdiferenciados de 24 días (CT) y diferenciados (β -PANC) con un periodo de incubación de 4 días. Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns).....	97
Figura 23. Expresión relativa del marcador de células similares a β -pancreática NEUROG3 en los fibroblastos IMR-90 diferenciados por 4 días (4) y por 8 días (8). Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns).....	98
Figura 24. Expresión relativa del marcador de células similares a β -pancreática MAFB en los fibroblastos IMR-90 diferenciados por 4 días (4) y por 12 días (12). Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns).....	99
Figura 25. Apariencia de células en un posible proceso de diferenciación hacia un fenotipo similar a β -pancreáticas a partir de células desdiferenciadas con 24 días expuestas a SASP.....	100
Figura 26. Agrupamiento jerárquico (HC por sus siglas en inglés) entre COR-TP y los metabolitos incluidos en la base de datos agrupados en ocho clústeres.....	111
Figura 27. Puntuaciones de acoplamiento (kcal/mol) de diferentes dianas con COR y derivados comparados con afinidades de metabolitos endógenos.....	114
Figura 28. Modos de enlace de COR, 3'-dINO y ADO con diferentes objetivos como ADK (sitio 1), ADA, A ₂ AR y A ₂ BR.....	117
Figura 29. Modos de unión de ATP y COR-TP con diferentes objetivos como CD39, ENPP3 y sAC, así como ADP y COR-DP con CD39.....	118
Figura 30. Variación del RMSD de los carbonos α en los complejos proteína-ligando en comparación con la proteína en estado libre.....	123
Figura 31. Variación del RMSD de los átomos del ligando en relación con la proteína.....	124
Figura 32. Variación del RMSD de los átomos del ligando con respecto a su posición original.....	125
Figura 33. Resumen de las interacciones del ligando con ADCY05. (A) Interacciones COR-TP; (B) Interacciones de ATP. (C) Residuos de aminoácidos con los que interactúa el COR-TP; (D) residuos de aminoácidos con los que interactúa el ATP. El verde representa los enlaces de hidrógeno; el morado representa las	

interacciones hidrofóbicas; el rosa representa las interacciones iónicas; y el azul representa las interacciones mediadas por el agua.....127

Figura 34. Resumen de las interacciones entre los ligandos y ADCY10. (A) Interacciones de COR-TP; (B) interacciones de ATP. (C) Residuos de aminoácidos con los que interactúa COR-TP; (D) residuos de aminoácidos con los que interactúa ATP. Las interacciones de hidrógeno se representan en verde, las interacciones hidrofóbicas en morado, las interacciones iónicas en rosa y las interacciones mediadas por agua en azul.....128

Figura 35. Perfil de energía libre obtenido mediante metadinámica, utilizando como variable colectiva la distancia entre los centros de masa del ligando y el sitio catalítico.....130

LISTA DE TABLAS

CAPITULO I: Introducción

Tabla 1. Comparación de las funciones de nucleótidos cíclicos en la reprogramación celular y en la diferenciación hacia linajes celulares específicos, destacando los mecanismos moleculares involucrados. Los símbolos ↑ y ↓ indican un aumento o disminución, respectivamente, en la expresión de genes o en la actividad de procesos celulares. Siglas: AMPc, monofosfato de adenosina cíclico; GMPc, monofosfato de guanosina cíclico; PKA, proteína quinasa A; EPAC, proteína de intercambio activada por cAMP; CREB, proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP; NO, óxido nítrico; GC, guanilil ciclase; PKG, proteína quinasa G; HDAC, desacetilasa de histonas.....23

CAPITULO IV: Materiales y metodología

Tabla 2. Secuencias nucleotídicas de los pares de primers utilizados en los diferentes procesos del proyecto para la cuantificación de expresión relativa.....62

CAPITULO V: Resultados y discusión

Tabla 3. Comparación estructural en 2D y 3D para evaluar la similitud estructural entre la cordicepina y sus derivados en relación con nucleósidos y nucleótidos endógenos.....105

Tabla 4. Modelos obtenidos por modelización de homología y control de calidad.....121

Tabla 5. Energía libre de unión (kcal/mol) de los complejos ligando–adenilato ciclase.....131

Capítulo I

Introducción

1.1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica ocasionada por niveles de glucosa no controlados debido a la falta de acción de la hormona insulina. Es bien conocido que esta patología puede culminar en la muerte y en numerosas complicaciones en la salud de los pacientes. Actualmente presenta una alta prevalencia a nivel mundial, particularmente en las naciones desarrolladas¹. Existen diversos tipos de diabetes, entre los que podemos mencionar los más prevalentes: la diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) y la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). La DMT1 surge de una deficiencia absoluta en la producción de insulina debido a la destrucción autoinmune de las células β del páncreas, mientras que la DMT2 es causada por el fenómeno patológico de la resistencia a la insulina, que inicialmente afecta su acción y, con el tiempo, también compromete su producción^{2,3}. Durante las décadas anteriores se han realizado grandes esfuerzos por encontrar estrategias de tratamiento que puedan controlar eficazmente este trastorno sin éxito y los tratamientos actuales no pueden rectificar ni regular de manera óptima todas las perturbaciones de este trastorno metabólico, resultando en una pérdida

significativa de vidas y recursos financieros⁴. La DM ha sido abordada en esta investigación con un enfoque centrado en la medicina regenerativa. El interés principal se ha puesto en comprender cómo ciertas moléculas con actividad biológica, como la cordicepina y el conjunto de factores que liberan las células senescentes, conocido como fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP por sus siglas en inglés), son capaces de influir en el grado de plasticidad fenotípica que tienen las células para modificar su identidad. Para lograr esto, se ha considerado el estudio de vías de señalización intracelular que dependen de la acción de nucleótidos cíclicos como la adenosina monofosfato cíclico (AMPc), los cuales participan en la regulación de procesos fundamentales durante la desdiferenciación y la adquisición de estados celulares más primitivos. Estos aspectos serán abordados con mayor detalle en las secciones siguientes, donde se exploran tanto los mecanismos específicos como la evidencia experimental que respalda su implicación en la plasticidad celular.

1.1.1. Estadísticas

A nivel mundial, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente 422 millones de individuos padecían DM2 en el año 2020 y se sabe que esta es responsable de más de 1.5 millones de muertes anuales⁵. La prevalencia de la DM ha aumentado progresivamente en todo el mundo, particularmente en regiones desarrolladas como Europa Occidental y América del Norte⁶. La tasa de incidencia se distribuye uniformemente entre los géneros y

generalmente alcanza su punto máximo alrededor de los 55 años. Para 2030, se proyecta que la tasa de prevalencia global de la DMT2 aumentará a 7079 individuos por cada 100,000⁶. La prevalencia de la DM en México persiste a un nivel notablemente alto, atribuible a los hábitos dietéticos subóptimos de la población, como el consumo de dietas abundantes en productos ultraprocesados, junto con una deficiencia en la actividad física⁷. En 2020, hubo 151,019 muertes documentadas debido a complicaciones asociadas con esta enfermedad y de igual manera que las estadísticas globales, se anticipa un aumento en la prevalencia de esta patología en los próximos años⁸.

En los últimos años, los datos sobre la DMT1 han mostrado un panorama preocupante, especialmente al observar cómo han ido cambiando las cifras de nuevos casos, la frecuencia con que aparece, su mortalidad y lo que se espera para el futuro. Tanto la OMS como la Federación Internacional de Diabetes han señalado un aumento constante en el número de personas afectadas por esta enfermedad. Algunos estudios recientes confirman que la incidencia de DMT1 ha ido en aumento, sobre todo en adolescentes y jóvenes adultos⁹.

1.2. Fisiopatología de la diabetes mellitus

La DM es una enfermedad metabólica que involucra diferentes alteraciones en el organismo y puede dividirse en varios tipos. No obstante, en esta investigación únicamente se tomaron en cuenta la diabetes tipo 1 y la tipo 2. A continuación, se

revisan de forma resumida los procesos fisiopatológicos que están detrás de estas dos formas de la enfermedad.

1.2.1. Fisiopatología de la DMT1

La DMT1 es una enfermedad autoinmunitaria crónica que se caracteriza por la destrucción progresiva y selectiva de las células β del páncreas, responsables de la producción de insulina. Dos haplotipos de la clase 2 del Antígeno Leucocitario Humano (HLA por sus siglas en inglés), HLA-DR y HLA-DQ, están vinculados con aproximadamente el 50% de la heredabilidad de la enfermedad y se encuentran predominantemente en individuos de ascendencia europea^{10,11}. Aunque todavía no se entienden del todo los mecanismos que explican cómo influyen estos haplotipos en el riesgo de desarrollar DMT1, se ha reconocido que el origen de la enfermedad está relacionado con una serie de interacciones, las cuales involucran tanto a las células β del páncreas, como a distintos componentes del sistema inmunológico, incluyendo tanto la inmunidad innata como la adaptativa¹¹. Estudios de asociación del genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés), han identificado más de sesenta *loci* del HLA distintos asociados con el riesgo de DMT1¹². Estas variantes influyen principalmente en las vías del sistema inmunológico relacionadas con el desarrollo de la enfermedad, abarcando la expresión del gen de la insulina en el timo, la regulación de la activación de las células T y las respuestas a los desafíos virales¹².

1.2.2. Fisiopatología de la DMT2

La DMT2 es una patología que se desarrolla a lo largo del tiempo. Dos fenómenos principales son los responsables de la aparición de DMT2: la resistencia a la insulina y la disfunción de las células β -pancreáticas^{13,14}. La resistencia a la insulina es un fenómeno en el cual la insulina presenta una incapacidad para realizar su función, lo que conlleva a una mayor carga para las células β -pancreáticas, culminando gradualmente a una disfunción de estas mismas¹⁵. Ambos procesos ocurren temprano en la patogénesis y contribuyen a la progresión y aparición de la enfermedad¹⁶.

La evidencia más reciente sugiere que la disfunción de las células β -pancreáticas en la DMT2 puede deberse a una red de interacciones más compleja entre el medio ambiente y varias vías de señalización involucradas en la biología de las células β -pancreáticas¹⁶. Es bien conocido que un estado nutricional excesivo, como el que se ve en la obesidad, resulta en hiperglucemia e hiperlipidemia, lo que promueve la resistencia a la insulina y la inflamación crónica. Bajo estas condiciones, las células β -pancreáticas están sometidas a presiones tóxicas, incluyendo inflamación, estrés inflamatorio, estrés del retículo endoplasmático, estrés oxidativo, entre algunos otros procesos, lo que lleva a una pérdida de la integridad de los islotes pancreáticos¹⁷.

Los ácidos grasos libres excesivos y la hiperglucemia inducen la disfunción de las células β -pancreáticas al provocar estrés en el retículo endoplasmático a

través de la activación de las vías de respuesta apoptóticas de proteínas desplegadas (UPR por sus siglas en inglés), culminando en la muerte celular y una reducción en su población¹⁸. La lipotoxicidad y la glucotoxicidad en la obesidad inducen este estrés metabólico y oxidativo que conduce al daño de las células β -pancreáticas¹⁹. Además, los niveles elevados sostenidos de glucosa aumentan la síntesis de polipéptidos de islotes amiloides (IAAP por sus siglas en inglés) en las células β -pancreáticas, acumulando insulina mal plegada e IAAP, aumentando así la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). Estos efectos interrumpen la movilización fisiológica de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático y favorecen señales pro-apoptóticas, y la liberación de interleucina IL-1 β , aumentando la inflamación local²⁰.

1.3. Tratamiento actual para DMT1 y DMT2

El tratamiento predominante para la DMT1 implica la administración de insulina exógena²¹. Aunque esta estrategia puede regular eficazmente los niveles de glucosa en sangre, persisten complicaciones, incluyendo episodios de hipoglucemia, así como complicaciones a largo plazo tales como la micro y macroangiopatía que conducen a patologías cardiovasculares, insuficiencia renal y neuropatías²². Un intento alternativo para tratar esta patología es el trasplante de islotes pancreáticos de cadáveres humanos con el objetivo de reemplazar las células β -pancreáticas destruidas en los pacientes²³. Este procedimiento resulta en un mejor control glucémico, permite a los pacientes ser independientes de la insulina

durante períodos prolongados, y mejora su calidad de vida²³. Sin embargo, a pesar de la promesa de este enfoque presenta desafíos como la escasez de donantes en relación con el gran número de pacientes diabéticos y la necesidad de inmunosupresión crónica para prevenir el rechazo de tejidos, lo que hace necesaria una fuente alternativa de células²⁴. Además, el número de células β -pancreáticas que se pueden obtener de un solo páncreas de un donante cadavérico es mínimo e insuficiente para restaurar los niveles apropiados de glucosa en sangre²⁵. Esto demuestra la necesidad de fuentes alternativas de células β -pancreáticas para tratar el creciente número de pacientes diabéticos. Por lo anterior, diversos enfoques que buscan restaurar la insulina endógena han sido propuestos, tal es el caso de la medicina regenerativa, utilizando células madre, la cual abordamos a en secciones posteriores²⁶.

En el caso de la DMT2, el tratamiento que se utiliza actualmente consiste, en la mayoría de los casos, en una serie de pasos que se van ajustando conforme progresa la enfermedad o según cómo responda el paciente. Lo primero que se indica casi siempre es modificar los hábitos de vida, especialmente en lo que respecta a la dieta, el ejercicio y el peso corporal. Se ha visto que cuando una persona con DMT2 logra bajar entre un 5% y un 10% de su peso inicial y realiza actividad física regular, como caminar o trotar unos 150 minutos a la semana, suele mejorar notablemente tanto la sensibilidad a la insulina como los niveles de glucosa en sangre²⁷.

En los casos donde con eso no basta para mantener la glucosa bajo control, entonces se empieza con medicamentos. El fármaco que se suele usar como primera opción es la metformina, porque además de ser efectiva y segura, también es económica y ha mostrado proteger al corazón en ciertos pacientes. Si la metformina sola no es suficiente, se agregan otros medicamentos, y eso va a depender de qué otras enfermedades presenten los pacientes y del riesgo que tengan de sufrir hipoglucemia²⁸.

Entre los medicamentos que se pueden combinar están los inhibidores de SGLT2, como la empagliflozina, los cuales se utilizan principalmente cuando los paciente presentan complicaciones cardíacas o renales. Por otro lado, tenemos a los agonistas de GLP-1, como la semaglutida y liraglutida, que además de ayudar a controlar la glucosa, también favorecen la pérdida de peso. Estos efectos favorables han hecho que la popularidad de los agonistas de GLP-1 aumente en los últimos años y recientemente se han reportado altas tasas de efectividad en pacientes con DMT2 así como en pacientes obesos²⁹. Otros medicamentos como las sulfonilureas o los inhibidores de DPP-4 también se utilizan, aunque las primeras se han dejado un poco de lado por el riesgo de hipoglucemia. En los adultos mayores, por ejemplo, los DPP-4 suelen ser más recomendados por su perfil más seguro³⁰.

Cuando la enfermedad ya está más avanzada o si la hemoglobina glucosilada se mantiene alta durante mucho tiempo, se puede recurrir a la insulina, empezando con la basal y, si es necesario, combinándola con otros medicamentos o aplicando varias dosis al día según la respuesta de cada paciente³¹.

Cuando la enfermedad ya está más avanzada o si la hemoglobina glucosilada se mantiene alta durante mucho tiempo, se puede recurrir a la insulina, empezando con la basal y, si es necesario, combinándola con otros medicamentos o aplicando varias dosis al día según la respuesta de cada paciente³¹.

1.3.1. Medicina regenerativa: terapia con células madre

La terapia con células madre ha surgido como una estrategia prometedora en el tratamiento de diversas condiciones médicas, especialmente en el manejo de la DM. Dentro de las células madre pluripotentes humanas (hPSC), podemos encontrar a las células madre embrionarias humanas (hESC por sus siglas en inglés) y a las células madre pluripotentes inducidas (iPSC por sus siglas en inglés), entre otras³². Este tipo de células se consideran fuentes alternativas deseables de células β -pancreáticas debido a su capacidad para diferenciarse en linajes celulares somáticos centrales^{33,34}. Hasta la fecha, el éxito en la generación de células similares a las células β -pancreáticas a partir de células madre pluripotentes humanas (hPSC por sus siglas en inglés) proviene de estrategias que imitan el desarrollo natural del páncreas en el embrión³⁵. Numerosos investigadores han adoptado este enfoque, sometiendo las células a varios factores de crecimiento y moléculas que inducen o inhiben vías de señalización específicas con el objetivo de modificar los fenotipos celulares³⁶.

1.3.2. Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)

Las células madre pluripotentes inducidas, también (iPSC por sus siglas en inglés), son un tipo especial de célula madre que no se encuentra de manera natural, sino que se obtiene a partir de células adultas ya diferenciadas, como las de la piel o del tejido conectivo. Los primeros intentos exitosos de generación iPSC, se lograron utilizando lentivirus que expresan los conocidos factores de Yamanaka, Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4, en fibroblastos de ratón³⁷.

En este enfoque se trabajó con un conjunto de genes que estaban relacionados con el mantenimiento del estado pluripotente, los cuales ya se sabía que se encontraban activos en células madre embrionarias. Al principio se eligieron veinticuatro genes que parecían estar implicados en esa capacidad de las células para mantenerse sin diferenciar, y luego se probaron distintas combinaciones de esos genes en células somáticas. Lo anterior con el objetivo de ver si esas combinaciones podían lograr que las células adquirieran propiedades similares a las de una célula madre, como, por ejemplo, una capacidad proliferativa sostenida sin perder sus características o que fueran capaces de especializarse en diferentes tipos celulares³⁷.

Además de identificar cuáles de esas combinaciones funcionaban mejor, este tipo de experimento también permitió demostrar que, bajo ciertas condiciones, es posible revertir el fenotipo de una célula, lo cual indica que su identidad no es completamente fija. Esto representó un cambio muy importante en la forma de

entender cómo se regula la identidad celular y cómo podría manipularse con fines terapéuticos o experimentales.

Hasta la fecha, también se han generado iPSC a partir de otras células somáticas, como las células mononucleares de sangre periférica³⁸. La generación de iPSC se ha realizado a través de diversas metodologías que varían en cómo se induce la pluripotencia. Estas pueden clasificarse en dos categorías: métodos integrantes y no integrantes³⁹. Sin embargo, el uso de los métodos integrantes no es deseable en la práctica clínica debido al riesgo de inducción de mutaciones y la posibilidad de iniciación de neoplasias malignas⁴⁰. Por otro lado, y lamentablemente, los métodos no integrantes, aunque representan una opción más segura no han mostrado resultados favorables en cuanto a la eficiencia para inducir pluripotencia, con tasas que van desde apenas el 0.1% en células sanguíneas hasta cerca del 1% en fibroblastos⁴¹. No obstante, a medida que se comprende más sobre la biología detrás de la pluripotencia y las células madre, ha sido factible proponer diversas estrategias para mejorar la eficiencia de la generación de iPSC, lo cual se describe brevemente en los siguientes párrafos.

En línea con lo anterior, se ha informado que los procesos inflamatorios pueden llevar a una modificación de la condensación de la cromatina a través de la alteración de varias proteínas de remodelación de la cromatina, como DOT1L (*Disruptor of Telomeric Silencing 1-Like*) la cual es una metiltransferasa que cataliza la metilación de la lisina 79 de la histona H3 (H3K79), una modificación epigenética clave en la regulación de la expresión génica y la estructura de la cromatina,

facilitando la reprogramación nuclear con los factores de Yamanaka^{42,43}. También, se ha informado de la sustitución del factor c-Myc por IL-6, una citocina proinflamatoria, en la generación de iPSC, mejorando el proceso⁴⁴. Además, la estimulación de los receptores TLR-4 por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) puede inducir cambios en la plasticidad celular a través de modificaciones epigenéticas⁴⁵. De manera similar, algunas sustancias de bajo peso molecular, como la cordicepina y el ácido valproico, han aumentado la eficiencia de la generación de iPSC hasta cuatro veces en comparación con el control en el caso de la cordicepina^{46,47}. También se ha sugerido que el SASP podría tener un papel útil en la generación de estas células, ya que contiene una mezcla particular de compuestos como citocinas inflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento y distintos metabolitos.⁴⁸

1.4. Senescencia celular, reprogramación y plasticidad celular

La senescencia celular, junto con la reprogramación y la plasticidad, forman un conjunto de procesos que están muy relacionados entre sí. La manera en que se influyen mutuamente juega un papel clave en el equilibrio de los tejidos y también tiene implicaciones importantes en varias enfermedades⁴⁸. Analizar con detalle cómo la senescencia interactúa con los procesos moleculares que participan en la desdiferenciación y la reprogramación celular ha permitido entender con mayor claridad el papel complejo que desempeña en la forma en que se define y mantiene la identidad de una célula. A través de este enfoque, se han podido reconocer

funciones que pueden actuar como una barrera, pero también otras que contribuyen a facilitar estos cambios celulares, como se describirá en las siguientes secciones⁴⁹.

1.5. Mecanismos moleculares y consecuencias funcionales de la senescencia celular en contextos patológicos

La senescencia celular puede definirse como un proceso dinámico y complejo que resulta en la detención permanente del ciclo celular⁵⁰. Este fenómeno puede ser activado por diversas señales de estrés, entre las que se incluyen factores ambientales, daño al ADN, señales inducidas por oncogenes y ciertos tratamientos anticancerígenos⁴⁸. Cuando las células reciben estas señales, se activa una serie de rutas moleculares que al final llevan a que el ciclo celular se detenga. Esta respuesta actúa como una especie de mecanismo de protección que impide que las células sigan dividiéndose si presentan daño en su material genético o si tienen el riesgo de convertirse en células malignas. Aunque esta función es útil para mantener la estabilidad del organismo, también puede traer consecuencias negativas. Con el tiempo, este mismo mecanismo puede contribuir al deterioro de los tejidos y estar involucrado en el desarrollo de enfermedades crónicas, además de acelerar procesos relacionados con el envejecimiento⁵¹.

Una vez que se establece la senescencia, las células no solo detienen su proliferación, sino que también adquieren características fenotípicas específicas, como el establecimiento de la secreción de una serie de factores inflamatorios y

proteolíticos, vesículas, microRNAs, y otras moléculas denominadas SASP⁵². Este programa de varios pasos no es estático, sino que puede evolucionar con el tiempo, con las células senescentes desarrollando diferentes perfiles de SASP según las condiciones del microambiente y la naturaleza del estímulo que induce la senescencia⁵².

La senescencia celular, al limitar la proliferación de células dañadas, opera como un mecanismo crucial de supresión tumoral⁵³. No obstante, la acumulación progresiva de células senescentes, acompañada de su característico fenotipo secretor proinflamatorio, puede desencadenar efectos adversos a largo plazo⁵⁴. Entre estos, destacan su contribución a la inflamación crónica, el deterioro funcional de los tejidos asociado al envejecimiento y la facilitación de la plasticidad celular en contextos tumorales⁵⁵.

1.6. Cambios en la expresión génica durante la senescencia

Una vez establecida la senescencia celular, las células experimentan transformaciones profundas en los patrones de metilación del ADN y en la organización de la cromatina⁵⁶. Estas modificaciones epigenéticas son determinantes para la regulación de genes clave involucrados en la detención del ciclo celular y en la respuesta al daño genómico. Entre los cambios más destacados se encuentra la pérdida de heterocromatina, un fenómeno que favorece la desregulación génica y acelera el proceso de envejecimiento celular⁵⁶.

Se sabe que el SASP está modulado por estas alteraciones epigenéticas, por ejemplo, las modificaciones en las histonas y la reestructuración de la cromatina permiten que las células senescentes adopten un perfil proinflamatorio característico, el cual no solo perpetúa la inflamación crónica, sino que también desestabiliza la homeostasis⁵⁷.

Existe la hipótesis de que la plasticidad celular inducida por SASP, en conjunto con la activación sostenida de vías moleculares como el factor nuclear kappa B (NF- κ B), puede favorecer la desdiferenciación de fibroblastos hacia un estado primitivo, análogo al de las células madre⁵⁸. El SASP, secretado por células senescentes, establece un microambiente inflamatorio que activa mecanismos epigenéticos y transcripcionales, contribuyendo a la pérdida de la identidad celular en los fibroblastos y denotando su papel en la remodelación del entorno de los tejidos y la dinámica celular⁵⁹.

Además, los procesos que conducen a la reprogramación de células epiteliales envejecidas hacia fenotipos mesenquimales o características propias de células madre, como la activación de la vía NF- κ B y la respuesta al daño en el ADN (DDR, por sus siglas en inglés), parecen desempeñar un papel fundamental en el fenómeno de desdiferenciación celular^{60,61}. El papel del factor NF- κ B en los procesos de desdiferenciación también se extiende a las células β -pancreáticas, donde su activación inducida por la inflamación ha sido asociada con la pérdida de identidad funcional de estas células en la DMT2⁶². Se ha demostrado que las citocinas proinflamatorias, como la IL-1 β y el TNF α , las cuales activan la vía de

señalización de NF- κ B, podrían contribuir a la desdiferenciación y al deterioro de la identidad y función de las células β -pancreáticas⁶². Aunque en el estudio se observó que bloquear la vía de NF- κ B no fue suficiente para recuperar por completo la expresión de los genes característicos de las células β -pancreáticas, los resultados destacan que esta ruta juega un papel central en los procesos que llevan a la pérdida de identidad celular.

La interacción entre factores epigenéticos y señales microambientales resulta crucial en la regulación de la plasticidad celular y la desdiferenciación⁶³. Elementos como p16, un regulador clave de la senescencia, y JMJD3, una enzima desmetilasa de histonas, desempeñan roles complementarios en la remodelación de la cromatina^{64,65}. Mientras p16 actúa como un inhibidor del ciclo celular, su supresión, en conjunto con la actividad de JMJD3, puede facilitar la transición de las células hacia estados menos diferenciados, destacando la importancia de los mecanismos epigenéticos en la reprogramación de la identidad celular⁶⁴. Este proceso no solamente promueve que las células adopten un estado menos especializado, sino que también se ha propuesto que aquellas que son expuestas al SASP podrían adquirir propiedades asociadas a la multipotencia e incluso a la pluripotencia. Algo parecido ya se ha observado en células epiteliales que han sido sometidas a condiciones similares^{60,62}.

De este modo, la interacción entre las vías moleculares activadas por el SASP y las modificaciones epigenéticas evidencian el potencial del microambiente

inflamatorio para inducir estados de alta plasticidad celular, lo cual hablamos brevemente a continuación.

1.7. Plasticidad celular

Definiendo la plasticidad celular podemos decir que se refiere a la habilidad dinámica de las células para modificar su fenotipo y tipo celular en respuesta a señales específicas provenientes de su microambiente, tales como hormonas, nutrientes o estímulos provenientes de la matriz extracelular⁶⁶. Entre los mensajeros moleculares más destacados que regulan la plasticidad celular (entre muchos otros) se encuentra el AMPc. El AMPc actúa como un mediador clave en la transducción de señales extracelulares que inducen cambios en la expresión génica, reorganización del citoesqueleto y remodelación epigenética, todos ellos procesos estrechamente vinculados con la plasticidad celular. Este es formado a partir del ATP mediante la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC)⁶⁷, tal como se muestra en la Figura 1. La activación de esta enzima ocurre principalmente a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y proteínas Gαs. La AC utiliza el grupo hidroxilo en la posición 3' de la ribosa del ATP para formar el nucleótido cíclico⁶⁸.

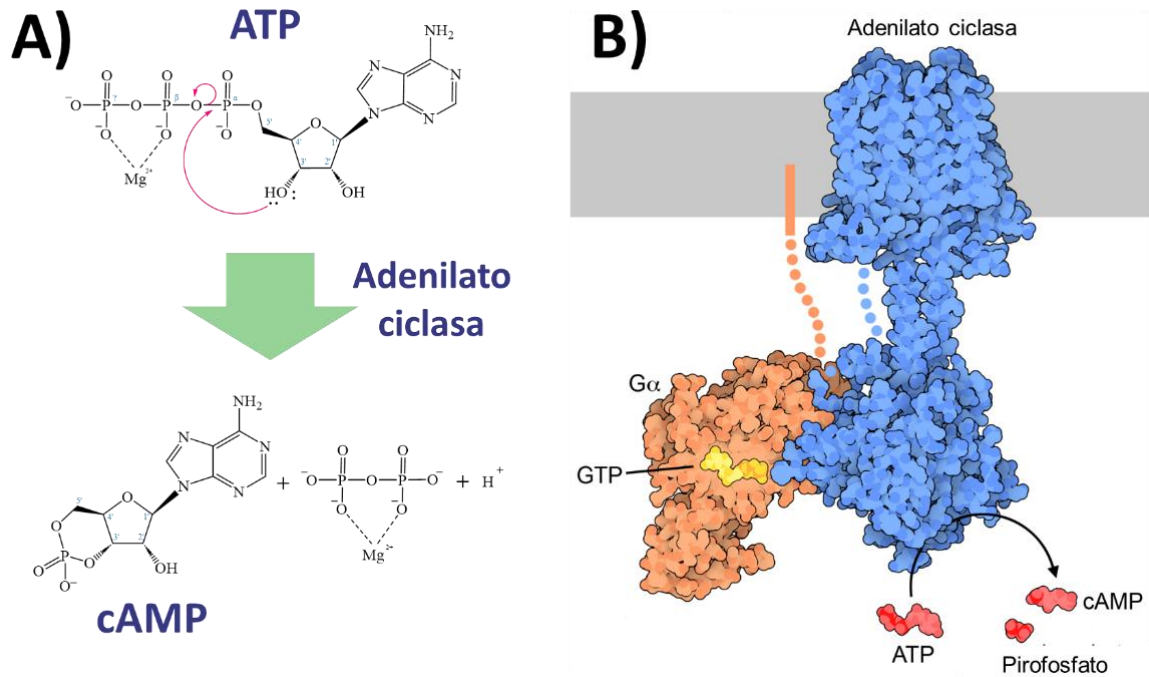


Figura 1. Mecanismo catalítico de la AC. El ion magnesio se coordina con los fosfatos β y γ del ATP para facilitar la reacción. El grupo hidroxilo en la posición 3' lleva a cabo un ataque nucleofílico intramolecular sobre el fosfato alfa ($P\alpha$), lo que da lugar a la formación de un heterociclo dentro de la estructura de la ribosa. Este heterociclo incluye el grupo fosfato enlazado a través de un átomo de oxígeno al carbono 5' y otro átomo de oxígeno al carbono 3' (A). Además, la reacción genera una molécula de pirofosfato y un ion hidrógeno (B). *Fuente: Elaboración propia.*

A partir de lo anterior, se puede comprender que el AMPc desempeña un papel fundamental en la regulación de la plasticidad celular, actuando como un mensajero intracelular que integra señales del entorno y traduce estímulos externos en respuestas funcionales complejas. En este sentido, resulta especialmente

relevante explorar compuestos bioactivos capaces de modular esta vía de señalización y otras rutas relacionadas con la adaptación celular. Uno de estos compuestos es la cordicepina, un análogo de nucleósido que ha sido objeto de un creciente interés por parte de la comunidad científica debido a su capacidad para interferir en procesos biológicos clave como se describe a continuación.

1.8. Cordicepina

La cordicepina, identificada también como 3'-desoxiadenosina, es un nucleósido natural extraído del hongo *Cordyceps militaris*⁶⁹. Este compuesto bioactivo se distingue por su notable diversidad de propiedades biológicas, que incluyen efectos antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos⁷⁰. Su capacidad para modular múltiples vías la ha posicionado como una molécula con un significativo potencial terapéutico en el manejo de enfermedades asociadas al estrés oxidativo, la inflamación crónica y la proliferación celular desregulada⁷⁰.

Entre los mecanismos principales mediante los cuales la cordicepina ejerce efectos sobre las células madre, destaca su habilidad para regular vías de señalización críticas en el mantenimiento de la pluripotencia celular. Estudios recientes han evidenciado que este compuesto puede incrementar la expresión de SIRT1, una sirtuína fundamental en la regulación de procesos como la pluripotencia y la diferenciación celular⁷¹. La activación de SIRT1 por la cordicepina promueve el estado indiferenciado de las células madre mesenquimales humanas (MSCs, por

sus siglas en inglés), fortaleciendo tanto su capacidad de autorrenovación como su potencial de diferenciación hacia diversas líneas celulares⁷¹. Este descubrimiento resalta la relevancia de este compuesto, dado que sugiere un posible uso de la cordicepina para preservar las propiedades funcionales esenciales de las células madre, lo que podría tener implicaciones en aplicaciones terapéuticas.

En otros reportes se ha evidenciado que la cordicepina ejerce una regulación significativa sobre la expresión de factores de transcripción esenciales para la pluripotencia, como OCT4, SOX2 y NANOG, los cuales desempeñan un papel central en la preservación de la capacidad de autorrenovación de las células madre pluripotentes y en la prevención de su diferenciación prematura⁴⁷.

Es necesario señalar que los efectos de la cordicepina dependen de manera crítica de su concentración. Mientras que dosis bajas o moderadas han demostrado promover la proliferación celular y apoyar la preservación de la pluripotencia, concentraciones más elevadas pueden inducir citotoxicidad, comprometiendo así la viabilidad celular^{72,73}.

Come se ha observado hasta ahorita, la cordicepina ha demostrado tener un efecto importante en el fortalecimiento del estado pluripotente de las células madre, ayudando a que conserven mejor sus características fundamentales, como la capacidad de autorrenovación y la expresión de factores clave. Su uso puede favorecer que las células permanezcan en un estado más estable y eficiente de pluripotencia. Esta condición más sólida (en pluripotencia) podría facilitar la posterior diferenciación de estas células hacia distintos linajes celulares,

dependiendo de las señales que reciban en etapas posteriores. En este estudio, lo que se pretende es utilizar la cordicepina para que las células madre inducidas alcancen un estado pluripotente más estable o eficiente y, como se plantea en la hipótesis, si esto se logra, podría facilitar que esas mismas células luego se transformen en células β -pancreáticas capaces de cumplir funciones como la producción de insulina.

1.9. Diferenciación hacia células β -pancreáticas a partir de células pluripotentes

En los últimos años se han publicado una cantidad grande de protocolos de diferenciación para generar células que secretan insulina y que son sensibles a la glucosa derivadas de células madre pluripotentes⁷⁴. Las células obtenidas exhiben características estructurales y de expresión génica similares a las células β -pancreáticas y poseen la capacidad de responder a la estimulación de la glucosa en modelos *in vitro* e *in vivo*⁷⁵.

La diferenciación de células madre hacia células β -pancreáticas funcionales se ha establecido como una de las áreas más relevantes en la investigación orientada al desarrollo de terapias innovadoras para la diabetes mellitus⁷⁶. La posibilidad de generar células β -pancreáticas plenamente funcionales a partir de células madre pluripotentes, ya sean células madre embrionarias (ESC por sus

siglas en inglés) iPSC, constituye una estrategia revolucionaria en el ámbito de las terapias de reemplazo celular.

Hoy en día, gran parte de las investigaciones están dirigidas a perfeccionar los pasos que se siguen durante la diferenciación y a entender con más claridad los procesos moleculares que controlan cómo estas células alcanzan un estado funcional. Entre los aspectos más importantes que se están analizando están algunos factores de transcripción específicos y ciertas vías de señalización, los cuales parecen jugar un papel muy relevante en el desarrollo de células con potencial clínico⁷⁷.

1.10. Repercusiones de la modulación de la señalización mediada por nucleótidos cíclicos en la plasticidad celular.

Uno de los aspectos fundamentales en los procesos de reprogramación celular es la plasticidad, es decir, la capacidad de las células para modificar su identidad y responder a señales específicas del entorno. Esta propiedad resulta esencial tanto para inducir un estado pluripotente desde células somáticas como para guiar la diferenciación hacia linajes definidos. En este contexto, los nucleótidos cíclicos, particularmente el AMPc y el monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), han cobrado creciente relevancia debido a su papel como segundos mensajeros intracelulares capaces de modular rutas de señalización clave.

Evidencias sugieren que la modulación de estas rutas puede incrementar la eficiencia de conversión a un estado pluripotente o, alternativamente, dirigir la diferenciación celular según las condiciones del microambiente^{78–80}.

En el siguiente apartado, se expone un resumen comparativo que aborda cómo diferentes nucleótidos cíclicos pueden intervenir en procesos como la reprogramación hacia células madre pluripotentes inducidas, la desdiferenciación y también la diferenciación celular.

1.11. Comparación de los efectos de nucleótidos cíclicos en reprogramación y diferenciación celular

La Tabla 1 resume los efectos principales de diferentes nucleótidos cíclicos en la reprogramación celular y en la diferenciación hacia linajes específicos, detallando las rutas de señalización implicadas y sus aplicaciones en medicina regenerativa.

Tabla 1. Comparación de las funciones de nucleótidos cíclicos en la reprogramación celular y en la diferenciación hacia linajes celulares específicos, destacando los mecanismos moleculares involucrados. Los símbolos ↑ y ↓ indican un aumento o disminución, respectivamente, en la expresión de genes o en la actividad de procesos celulares. Siglas: AMPc, monofosfato de adenosina cíclico; GMPc, monofosfato de guanosina cíclico; PKA, proteína quinasa A; EPAC, proteína de intercambio activada por cAMP; CREB, proteína de unión al elemento de respuesta

a cAMP; NO, óxido nítrico; GC, guanilil ciclasa; PKG, proteína quinasa G; HDAC, desacetilasa de histonas.

Nucleótido cíclico	Efectos en la reprogramación (iPSC y desdiferenciación)	Efectos en la diferenciación celular	Mecanismos moleculares y vías de señalización	Aplicaciones en medicina regenerativa	Referencias.
AMPc	↑ Favorece la generación de iPSC al mejorar la eficiencia. ↑ Facilita la transición mesenquimal a epitelial (MET). ↑ Puede sustituir parcialmente factores como OCT4 en protocolos de reprogramación. ↓ Barreras	↑ Favorece la diferenciación neuronal desde progenitores. ↑ Induce maduración hepática en células derivadas de iPSC, especialmente en modelos 3D. ↑ Promueve la	- Activación de PKA y EPAC (Rap1). - Regulación de CREB vía PKA/Ca²⁺. - Inducción de EMT mediante EPAC/Rap1. -	- Generación química de iPSC (como forskolina). - Maduración funcional de tejidos en terapias celulares (neuronas, hepatocitos) . -	81,82

	proliferativas como la senescencia.	diferenciación osteogénica y muscular.	Modificación epigenética vía CREB.	Regeneración muscular, ósea y neural con estrategias basadas en AMPc.	
GMPC (cGMP)	↔ Rol limitado en reprogramación, ya que niveles elevados pueden restringir la pluripotencia.	↑ Promueve la diferenciación cardíaca a partir de células progenitoras. ↑ Favorece la diferenciación neuronal en células madre neurales. ↑ Induce diferenciación mieloide en progenitores	- Activación de la vía NO-GC-PKG. - Regulación de factores clave para cardiogénesis y neurogénesis - Influencia epigenética mediante HDACs.	- Aplicaciones en regeneración cardiovascular (uso de sildenafil y donadores de NO). - Neuroregeneración en lesiones neuronales. -	83,84

		hematopoyéticos.		Estimulación de angiogénesis y cicatrización vía PKG.	
--	--	------------------	--	---	--

1.12. Implicaciones de la señalización de nucleótidos cíclicos en procesos de diferenciación/desdiferenciación y senescencia celular.

Varios de los protocolos actuales que se usan para inducir la diferenciación celular incluyen la presencia de nucleótidos cíclicos con el objetivo de facilitar que las células maduren hacia tipos concretos⁸⁵. En el caso de las neuronas, se ha observado que al agregar dibutiril-AMPc en las fases finales del cultivo, se consigue que las células expresen características funcionales más marcadas, sobre todo si se trata de neuronas dopaminérgicas, ya que se activan genes que están directamente involucrados en su funcionamiento⁸⁶.

Cuando lo que se busca es obtener células de Schwann a partir de células madre pluripotentes, ha resultado útil utilizar compuestos como la forskolina, que incrementan los niveles de AMPc. Este tratamiento ha permitido inducir la expresión de genes característicos tanto de la cresta neural como de los relacionados con la producción de mielina. Por otro lado, si se busca dirigir la diferenciación hacia

hepatocitos desde iPSC, se ha visto que combinar sistemas tridimensionales con activadores de AMPc ayuda a generar un perfil más parecido al del hígado maduro, posiblemente por la imitación de señales hormonales como las que provoca el glucagón o la adrenalina⁸⁶.

Los hallazgos antes comentados han permitido comprender con más claridad cómo se controla el destino de una célula. Pero además de eso, lo que también abre la oportunidad para desarrollar formas alternativas que permitan obtener células madre funcionales. Es de destacar que estas estrategias podrían evitar el uso de técnicas genéticas complicadas, lo cual representa una ventaja importante si se piensa en llevar estos avances a aplicaciones clínicas más seguras. Esta propuesta de investigación tiene como objetivo encontrar una forma más segura y efectiva de generar células madre y su posterior diferenciación hacia células β -pancreáticas para aplicación en patologías como la DMT1, donde todavía no se ha logrado restaurar del todo la función de las células que producen insulina. Con esta estrategia, se busca abrir nuevas oportunidades para tratar enfermedades crónicas que aún no tienen una solución definitiva.

No obstante, es importante señalar que, aunque el título de este trabajo refleja la intención inicial de obtener células β -pancreáticas a partir de células madre pluripotentes inducidas derivadas de fibroblastos humanos, los resultados experimentales no permitieron confirmar de manera concluyente la inducción del estado pluripotente ni el establecimiento completo del fenotipo similar a células β -pancreáticas, sino solo procesos parciales. Por esta razón, el enfoque final de este

estudio se centró en evaluar el impacto del fenotipo secretor asociado a senescencia y de la cordicepina sobre marcadores de pluripotencia y senescencia celular de fibroblastos humanos, como una etapa preliminar hacia la reprogramación celular y posterior diferenciación hacia células β -pancreáticas mediante la evaluación de marcadores y cambios morfológicos. Esta desviación entre el objetivo original y los resultados obtenidos se considera parte inherente del proceso científico, y los hallazgos alcanzados siguen ofreciendo información valiosa para el diseño de futuras estrategias de reprogramación celular más eficientes y seguras.

Capítulo II

2. Antecedentes

2.1. Obtención de iPSC

Desde que en 2006 Shinya Yamanaka dio a conocer que era posible inducir pluripotencia en fibroblastos de ratón, el área de la reprogramación celular ha vivido avances técnicos bastante importantes. En ese primer trabajo, se utilizó un conjunto de factores de transcripción conocidos como “factores de Yamanaka” (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc), los cuales fueron introducidos a través de vectores retrovirales que se integraban al ADN de la célula huésped³⁷. Si bien este método mostró buena eficiencia, se detectaron riesgos asociados a la inserción aleatoria del ADN viral en el genoma, lo que podía provocar alteraciones como mutaciones, silenciamiento de los genes añadidos e incluso favorecer el desarrollo de tumores.

En el año 2008, se reportó que el equipo de Okita consiguió generar células iPSC utilizando fibroblastos de ratón como punto de partida, pero sin recurrir a vectores virales para introducir los factores de reprogramación⁸⁷. En su lugar, lo que hicieron fue emplear una estrategia basada en varias rondas de transfección usando plásmidos. Uno de esos plásmidos llevaba las secuencias de ADN complementario que codificaban para Oct3/4, SOX2 y KLF4, mientras que el otro contenía el gen

para c-MYC. Gracias a este método, se evitó la integración permanente de los genes en el genoma del huésped, lo que representó un paso importante hacia técnicas de reprogramación más seguras

A partir de estos esfuerzos por minimizar los riesgos asociados a la integración genómica, también comenzaron a explorarse otras alternativas que buscaban mantener la expresión de los mismos factores, pero con modificaciones adicionales que mejoraran la eficiencia o facilitaran el control del proceso. Por ejemplo, se crearon vectores lentivirales que transportaban todos los genes juntos en una sola secuencia, y también se implementaron estrategias que permitían eliminar los genes insertados una vez terminada la reprogramación, ya fuera con sistemas como Cre/loxP o con promotores que respondían a tetraciclina⁸⁸. Otra técnica que empezó a utilizarse fue la de los elementos móviles como piggyBac, los cuales ofrecían una forma de integrar y luego remover los genes sin dejar restos permanentes, aunque con ciertos riesgos relacionados con el daño al ADN de la célula⁸⁹.

En años posteriores, se pusieron a prueba otros métodos que no implicaban la integración del material genético, lo que mejoró notablemente la seguridad. Un ejemplo temprano fue el uso de vectores adenovirales, los cuales no se insertaban en el genoma, aunque su eficiencia para inducir pluripotencia era muy baja⁹⁰. Tiempo después, uno de los avances más destacados fue el uso del virus Sendai, un virus de ARN que replica solo en el citoplasma, lo que evita la modificación del ADN de la célula y además mostró buenos resultados en la generación de iPSCs⁴¹.

También se han implementado técnicas libres de virus. Por ejemplo, el uso de los vectores episomales han sido una alternativa útil, ya que permiten introducir los genes necesarios sin integrarse al genoma y pueden ser eliminados tras algunas divisiones celulares⁹¹. Otro enfoque más reciente y sofisticado es el uso de ARN mensajero modificado, que permite expresar temporalmente los factores de reprogramación sin alterar el ADN, y con una eficiencia considerable, aunque requiere aplicar los ARNm varias veces durante varios días para que funcione correctamente⁹².

Un momento importante en la evolución de estos métodos fue cuando se logró la reprogramación celular solo usando compuestos químicos. Esto se consiguió por primera vez en 2013 con células de ratón, empleando una combinación específica de siete moléculas pequeñas que actuaban sobre la epigenética y sobre vías de señalización relevantes para la pluripotencia⁹³. Años más tarde, casi diez, esa estrategia pudo aplicarse con éxito en células humanas. En 2022, se publicó que era posible inducir iPSCs humanas utilizando un protocolo secuencial con activadores de Wnt, inhibidores de TGF- β y otras moléculas que ayudaban a desbloquear barreras celulares como la ruta de JNK⁹⁴.

2.2. Obtención de células β -pancreáticas a partir de iPSC

La obtención de células β -pancreáticas a partir de células madre suele realizarse a través de protocolos por etapas, los cuales buscan imitar las fases del

desarrollo del páncreas durante el periodo embrionario, pero llevadas a cabo en condiciones de laboratorio. Para lograr esto, se hace uso de una secuencia cuidadosamente controlada de factores de crecimiento y señales específicas que se añaden en momentos determinados. Así, las células madre pluripotentes van pasando por distintos estados, como el endodermo, los progenitores pancreáticos o los progenitores endocrinos, hasta llegar a un tipo celular que comparte características funcionales con las células β -pancreática que se encuentran normalmente en el organismo⁹⁵.

Durante este proceso, se comprueba que las células efectivamente avanzan hacia los estados deseados, verificando la presencia de ciertos marcadores moleculares que se sabe aparecen en condiciones naturales. Por ejemplo, se espera ver que en los progenitores pancreáticos se localicen al mismo tiempo los factores PDX1 y NKX6-1 dentro del núcleo, mientras que en los progenitores endocrinos se observa una expresión de NEUROG3 que aparece por un periodo corto y después desaparece⁹⁶. Durante este proceso, se comprueba que las células efectivamente avanzan hacia los estados deseados, verificando la presencia de ciertos marcadores moleculares que se sabe aparecen en condiciones naturales. Por ejemplo, se espera ver que en los progenitores pancreáticos se localicen al mismo tiempo los factores PDX1 y NKX6-1 dentro del núcleo, mientras que en los progenitores endocrinos se observa una expresión de NEUROG3 que aparece por un periodo corto y después desaparece⁹⁶.

Uno de los esquemas más utilizados como guía en esta área es el propuesto por Hogrebe y colaboradores en 2021⁷⁷. En su protocolo, que abarca seis etapas bien definidas, se detallan los pasos para ir transformando a las células pluripotentes en células funcionales parecidas β -pancreáticas.

En la primera etapa, se induce la formación de endodermo definitivo. Para lograrlo, se exponen las células madre a señales potentes de la vía Activina/Nodal, como Activina A, en combinación con la activación de la vía WNT. En este paso se suele emplear un inhibidor de GSK3 β llamado CHIR99021. Después de unos dos o tres días, más del 90% de las células expresan genes típicos del endodermo, incluyendo FOXA2 y SOX17⁷⁷.

La segunda etapa consiste en dirigir ese endodermo hacia una región específica del intestino primitivo, que es donde luego se origina el páncreas. Esto se consigue en un periodo breve, de uno o dos días, mediante la adición de factores como FGF7, también conocido como KGF. A la vez, se incorporan inhibidores de señales que no se desean, como aquellas de las vías BMP y Hedgehog⁷⁷.

En las etapas tres y cuatro se especifican los progenitores pancreáticos. Este proceso tarda alrededor de cinco o seis días. Primero se usa ácido retinoico para inducir la expresión de PDX1, un marcador característico de los progenitores del páncreas. Aproximadamente a los dos días de esta fase, más del 80% de las células presentan PDX1. Posteriormente, se reduce el ácido retinoico y se prolonga la exposición a otros factores durante unos cuatro días más, permitiendo que una parte de las células que ya eran PDX1 positivas también comiencen a expresar NKX6-1.

Así se consolidan como progenitores bipotenciales, capaces de generar tanto células endocrinas como exocrinas. Se espera que al menos entre un 40 y 50% de las células expresen simultáneamente PDX1 y NKX6-1, ya que estas son las que luego darán origen a las células β -pancreáticas maduras. Si este porcentaje es más bajo, podría ser señal de que la diferenciación no ha sido óptima. Para lograr este perfil, se emplea una combinación precisa de moléculas como FGF7, ácido retinoico, un activador de PKC (TPPB), un inhibidor de hedgehog (SANT1) y un inhibidor de BMP (LDN193189)⁷⁷.

Después, en la quinta etapa, se busca inducir el linaje endocrino. Esta parte suele durar entre seis y siete días. En condiciones normales del desarrollo, esto sucede cuando las células del páncreas comienzan a expresar de manera transitoria el factor NGN3, después de que se inhibe la señal de Notch en el entorno celular. Para imitar esta situación en el laboratorio, los protocolos usan compuestos que bloquean la γ -secretasa, como el compuesto XXI, lo cual impide que la vía Notch esté activa y permite así que se exprese NGN3. También se añaden inhibidores de ALK5, hormona tiroidea T3 y se mantienen bajos niveles de SANT1 y ácido retinoico⁷⁷. En muchos casos, durante esta etapa se reorganizan las células en estructuras tridimensionales, lo que facilita que se diferencien en tipos celulares del sistema endocrino como células alfa, beta o delta. Se ha observado que esta configuración 3D puede ser importante para activar correctamente las señales necesarias.

Finalmente, la etapa seis está dedicada a la maduración de las células endocrinas hacia un fenotipo funcional de célula β -pancreática. Esta fase suele durar una o dos semanas. Aquí ya no se agregan nuevas señales de diferenciación, sino que se cultivan las células en medios ricos en nutrientes y moléculas que apoyan la funcionalidad, como la nicotinamida o factores tróficos. Se acostumbra también agrupar las células en esferoides tridimensionales, conocidos como “pseudo-islotos”, para promover la organización parecida a los islotes pancreáticos reales⁷⁷.

Al concluir este proceso, se obtienen poblaciones celulares que producen insulina, presentan marcadores típicos de las células β -pancreáticas como INS, C-péptido, MAFA y NKX6-1, y responden a la presencia de glucosa con la liberación de insulina. Sin embargo, el nivel de madurez funcional puede variar dependiendo del protocolo que se haya seguido. En total, todo el procedimiento de diferenciación suele tomar entre cuatro y cinco semanas, más el tiempo adicional que se necesita al principio para expandir las células madre y al final para evaluar su funcionalidad.

2.3. Papel del SASP en la reprogramación celular

La senescencia y la reprogramación celular inducida hacia un estado pluripotente son procesos celulares opuestos, aunque guardan una relación cercana debido a que comparten varias rutas de señalización. Ambos estados implican cambios importantes tanto en la regulación del ciclo celular como en la

respuesta al estrés celular y en el epigenoma. Cuando se introducen los factores OSKM, formados por Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc, suele observarse una activación de vías supresoras como p53/p21^{CIP1} y Rb/p16^{INK4a}, las cuales actúan como freno frente a daños genéticos, pero también interfieren con la eficiencia de reprogramación. En muchas ocasiones, la expresión de estos genes lleva a que las células dejen de dividirse y adopten características de senescencia^{97,98}.

Se ha observado que, al bloquear estas rutas, ya sea mediante técnicas genéticas o con compuestos químicos, la reprogramación se vuelve más eficiente. Sin embargo, este tipo de intervención puede tener consecuencias no deseadas, como el aumento en el daño del ADN o la posibilidad de que las células se vuelvan más propensas a adquirir mutaciones que favorezcan una transformación maligna⁹⁹. A pesar de ello, también se reduce la producción del SASP, especialmente de proteínas como IL-6 e IL-8. Estas moléculas no solo mantienen el estado senescente en la misma célula, sino que también pueden favorecer la reprogramación en células cercanas, creando un ambiente que facilita el cambio de identidad celular^{49,100}.

Durante la reprogramación, también es indispensable reorganizar el epigenoma. Esto implica eliminar marcas represivas como H3K9me3 (trimetilación de la lisina 9 de la histona H3) y H3K27me3 (trimetilación de la lisina 27 de la histona H3), que bloquean la expresión de genes clave, y reemplazarlas por marcas activadoras como H3K4me3 (trimetilación de la lisina 4 de la histona H3). Algunos compuestos como la vitamina C han mostrado capacidad para acelerar este proceso

al estimular enzimas que remueven estas marcas, lo que mejora la eficiencia con la que se generan las iPSC¹⁰¹. También se ha encontrado que la metilación del ADN representa un obstáculo importante. Genes esenciales para la pluripotencia están silenciados en células diferenciadas debido a la metilación de sus promotores. Pero si se usan herramientas como la inhibición de DNMT1 o la activación de TETs, es posible revertir ese silenciamiento¹⁰².

Un hallazgo reciente es que incluso las células envejecidas o que ya han entrado en senescencia pueden volver a un estado pluripotente si se usan las condiciones adecuadas. En estos casos, se ha visto que se recupera la longitud de los telómeros y se restablece el funcionamiento mitocondrial, entre otros indicadores de juventud celular¹⁰³. A pesar de esto, cuando se eliminan por completo los mecanismos de control como p53, aunque se obtienen más iPSC, estas células pueden presentar daños genéticos importantes que podrían representar un problema en aplicaciones clínicas⁹⁹. Por último, se ha propuesto que incluso algunas células tumorales pueden ser reprogramadas para perder parte de su agresividad, ya que, al restablecer ciertos programas epigenéticos diferenciados, dejan de comportarse como células malignas¹⁰⁴.

2.4. Cordicepina como modulador en la reprogramación celular y mantenimiento de la pluripotencia.

La búsqueda de compuestos que mejoren la eficiencia y seguridad en la reprogramación celular ha llevado a explorar nuevas moléculas con propiedades bioactivas. Entre ellas, la cordicepina ha mostrado un efecto prometedor en la regulación de la pluripotencia y la plasticidad celular. Hay evidencia reciente que indica que la cordicepina puede estimular la expresión de genes clave para mantener la pluripotencia, como Nanog, Oct4 y Sox2. Este efecto se ha observado tanto en células madre embrionarias como en iPSC, y parece estar relacionado con la activación de una vía específica de señalización celular conocida como Jak2/Stat3⁴⁷. También se ha propuesto que esta molécula influye en el entorno celular al actuar sobre componentes de la matriz extracelular. Se ha llegado a comparar su acción con la del factor LIF (Factor inhibidor de Leucemia, por sus siglas en inglés), que es bien conocido por su papel en mantener la pluripotencia en células madre de ratón. Además, al parecer, la cordicepina también estimula la producción de ciertas citocinas de la familia de la interleucina 6, lo que podría contribuir a reforzar la misma vía de señalización mediante un tipo de retroalimentación que actúa entre células vecinas o incluso sobre la misma célula⁴⁷.

Algo parecido se ha visto en las células madre mesenquimales humanas. En estas, la cordicepina no solo ha ayudado a retrasar la aparición de características de senescencia, sino que también ha elevado los niveles de SIRT1, una enzima que participa en varios procesos celulares relacionados con la longevidad y la

estabilidad genética⁷¹. Esta enzima parece ser estimulada por la vía AMPK-SIRT1, y se ha observado que tiene un efecto sobre SOX2, ayudando a mantener su expresión mediante un mecanismo de desacetilación. Todo esto viene acompañado de otros efectos beneficiosos, como una mayor actividad telomerasa y una extensión en la longitud de los telómeros, lo cual contribuye a mantener la capacidad de las células para dividirse sin perder funcionalidad⁷¹.

Capítulo III

3. Hipótesis y objetivos

3.1. Aportación científica

La presente investigación aporta evidencia experimental sobre el efecto diferencial del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) y la cordicepina en la modulación de la desdiferenciación de fibroblastos humanos y su posible compromiso hacia linajes similares a β -pancreáticos. Los resultados indican que el SASP favorece la adquisición de características compatibles con un proceso de desdiferenciación, mientras que la cordicepina, en lugar de potenciar este efecto, inhibió o contrarrestó los cambios esperados bajo las condiciones evaluadas. Esta aportación contribuye al conocimiento actual sobre estrategias de reprogramación celular no genética, delimitando el potencial del microambiente senescente como modulador positivo de la identidad celular.

3.2. Hipótesis

La exposición al fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) y/o al tratamiento con cordicepina promoverá la reprogramación de fibroblastos humanos IMR-90 hacia un estado de desdiferenciación. Posteriormente, estas células mostrarán la capacidad de diferenciarse *in vitro* hacia un linaje similar al de células β -pancreáticas productoras de insulina.

3.3. Objetivo general

Inducir la reprogramación *in vitro* de fibroblastos humanos IMR-90 mediante la exposición al SASP y/o cordicepina, con el propósito de evaluar sus efectos individuales y sinérgicos sobre la expresión de marcadores asociados a la desdiferenciación celular y la adquisición de pluripotencia. Posteriormente, dirigir la diferenciación de las células reprogramadas hacia un fenotipo funcional similar al de células β -pancreáticas productoras de insulina, utilizando protocolos validados para la obtención de este linaje.

3.4. Objetivos específicos

- Inducir senescencia en la línea celular IMR-90 mediante tratamiento con mitomicina C para generar un fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP).
- Obtener el medio condicionado derivado de células senescentes (SASP) para su uso experimental en la inducción de reprogramación celular.
- Evaluar la capacidad del medio condicionado de senescencia y/o de cordicepina para inducir la expresión de marcadores de pluripotencia y senescencia.
- Cuantificar mediante PCR cuantitativa (qPCR) la expresión de genes asociados a senescencia (*IL6*, *CDKN1A*), pluripotencia (*KLF4*, *SOX2*) y diferenciación hacia células similares a β -pancreáticas (*NEUROG3*, *NEUROD1*, *MAFB*), como indicadores de los distintos estados celulares inducidos experimentalmente.
- Caracterizar morfológicamente las células reprogramadas.
- Inducir la diferenciación de las células reprogramadas hacia un fenotipo similar al de células β -pancreáticas productoras de insulina, siguiendo protocolos de diferenciación establecidos.
- Analizar, mediante herramientas computacionales, un posible mecanismo de acción de la cordicepina durante procesos de desdiferenciación/diferenciación, enfocándose en su potencial modulación

de vías de señalización mediadas por nucleótidos cíclicos y su impacto sobre la expresión génica relacionada con la senescencia y la pluripotencia.

Capítulo IV

4. Materiales y metodología

A continuación, se describen los materiales, equipos, sitios de trabajo y compuestos que se emplearon durante el proceso de generación de las células desdiferenciadas. También se detallan los elementos necesarios para su mantenimiento en cultivo y el procedimiento que se utilizó para promover su diferenciación hacia un tipo celular con características similares a las células β -pancreáticas productoras de insulina.

4.1. Materiales y Reactivos

4.1.1. Materiales

- Micropipetas de diversos rangos (0.5-10 μ L, 2-20 μ L, 20-200 μ L y 100-1000 μ L): Para la manipulación precisa de volúmenes pequeños y grandes durante la preparación de reactivos y muestras.
- Puntas de micropipetas (20 μ L, 200 μ L y 1000 μ L): Uso desechable para evitar contaminación cruzada en la manipulación de soluciones.

- Tubos Falcon de 15 mL: Utilizados para centrifugación y almacenamiento temporal de muestras y reactivos.
- Vasos de precipitados de 250 mL: Para preparación y manejo de soluciones y medios de cultivo.
- Gasas: Empleadas para la limpieza y desinfección de la campana de flujo laminar.
- Frascos de 25 cm²: Utilizadas para el crecimiento y diferenciación de las células.

4.1.2. Reactivos

- Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco™): Proporcionó los nutrientes esenciales para el cultivo de fibroblastos y iPSC.
- Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco™): Suplemento esencial para el crecimiento celular, añadido al medio DMEM en una concentración del 10%.
- Mitomicina C (Sigma-Aldrich®): Agente alquilante utilizado para inducir senescencia celular.
- Reactivo TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific): Utilizado para la extracción de ARN total, asegurando una adecuada conservación de los transcritos.
- Reactivo X-Gal (Sigma-Aldrich®): Sustrato para identificar células senescentes mediante tinción de β -galactosidasa.

- Cordicepina (Sigma-Aldrich®): Molécula bioactiva empleada para evaluar su impacto en la eficiencia de reprogramación celular.
- Solución de tripsina/EDTA al 0.05% (Gibco™): Utilizada para el subcultivo y separación de las células adherentes.
- Solución de amortiguador de fosfatos (PBS): Empleada para el lavado de las células y eliminación de detritos celulares.
- Vitamina C (Sigma-Aldrich®): Empleada en el proceso de diferenciación hacia células similares a β -pancreáticas fase 2, 3 y 4.
- Nicotinamida (Sigma-Aldrich®): Empleada en el proceso de diferenciación hacia células similares a β -pancreáticas fase 3 y 4.
- Vitamina A (Sigma-Aldrich®): Empleada en el proceso de diferenciación hacia células similares a β -pancreáticas fase 5.
- T3 (triyodotironina) (Sigma-Aldrich®): Empleada en el proceso de diferenciación hacia células similares a β -pancreáticas.
- **XXi (inhibidor de γ -secretasa)** (Sigma-Aldrich®): Empleado en el proceso de diferenciación hacia células similares a β -pancreáticas.
- Heparina (Sigma-Aldrich®): Empleada en el proceso de diferenciación hacia células similares a β -pancreáticas.
- Glucosa (Sigma-Aldrich®): Empleada en el proceso de diferenciación hacia células similares a β -pancreáticas.

4.2. Equipos

- Microscopio óptico: Permitió la observación morfológica de las células y la validación del estado de senescencia.
- Incubadora de CO₂ (Thermo Fisher Scientific): Proporcionó las condiciones necesarias (37 °C y 5% de CO₂) para el mantenimiento y crecimiento celular.
- Centrífuga refrigerada (Thermo Fisher Scientific): Utilizada para la separación de fases durante la extracción de ARN y para la sedimentación de células.
- Espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific): Para la cuantificación y evaluación de la pureza del ARN extraído.
- Campana de flujo laminar: Garantizó un ambiente estéril para la manipulación de las células y reactivos.
- Termociclador ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems): Utilizado para las reacciones de PCR convencional (punto final) y transcripción reversa.
- Sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems): Empleado para la cuantificación de la expresión génica mediante PCR en tiempo real (qPCR).
- Sistema de vacío: Facilitó la eliminación de medios de cultivo y soluciones de lavado.

4.3. Laboratorios

Los ensayos se llevaron a cabo principalmente en el Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL. Además, algunas etapas del trabajo experimental se realizaron en las instalaciones del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN), perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Asimismo, algunos ensayos computacionales complementarios fueron realizados en el Laboratorio de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en colaboración con el Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas.

4.4. Metodología general

La metodología general consta de cuatro etapas *in vitro* además de un estudio *in silico* plasmadas en la Figura 2 y enlistadas a continuación.

- 1) Inducción de senescencia
- 2) Recolección del SASP
- 3) Obtención de células desdiferenciadas expuestas al SASP
- 4) Diferenciación a células similares a β -pancreáticas
- 5) Descripción del posible mecanismo molecular de la cordicepina sobre la plasticidad con métodos *in silico*.

La extracción de ARN se realizó conforme a las instrucciones proporcionadas por el fabricante del reactivo TRIzol. Para la síntesis del ADN complementario (cDNA) y la cuantificación relativa de la expresión génica, se utilizó la metodología $\Delta\Delta C_t$ descrita por Livak y Schmittgen en 2001¹⁰⁵. Las reacciones se llevaron a cabo con SYBR Green como agente fluorescente, empleando el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems).

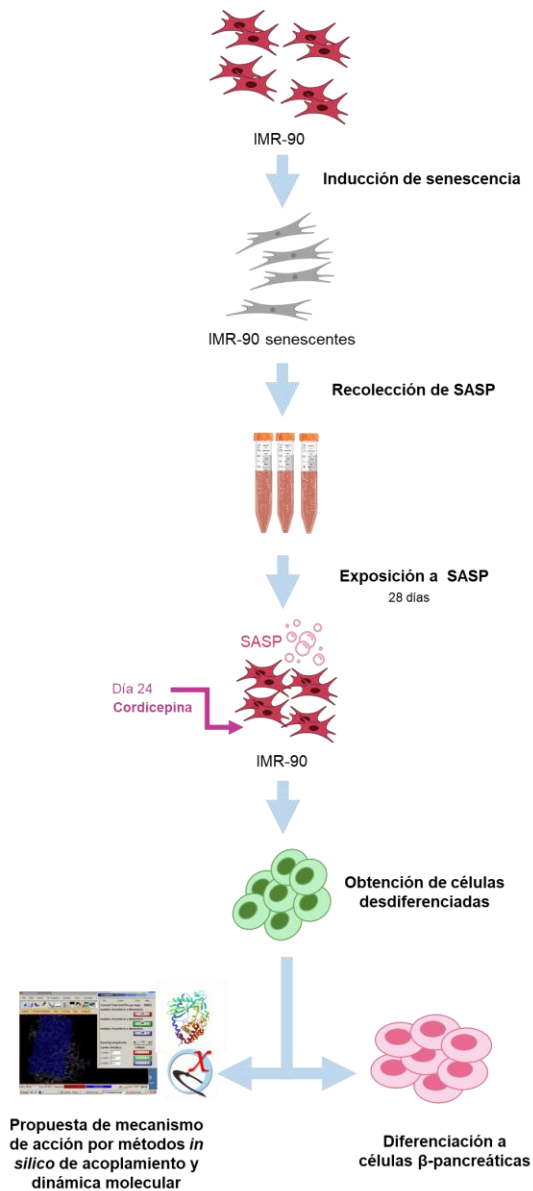


Figura 2. Metodología general de la obtención de células similares a β - pancreáticas a partir de fibroblastos IMR-90 utilizando SASP para la inducción de desdiferenciación. *Fuente: Elaboración propia.*

4.5. Cultivo de las células IMR-90

La línea celular que fue utilizada en el proceso de reprogramación fue la línea de fibroblastos embrionarios de pulmón IMR-90, las cuales fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%. A continuación, se muestra la metodología seguida para el proceso de cultivo de las células.

4.5.1. Descongelación de las células

Para iniciar con este proceso, se procedió a añadir 3 mL de medio DMEM, suplementado con suero fetal bovino al 10% en un frasco con células y una vez añadido, fue incubado por 15 minutos, a una temperatura de 37° C con un 5% de CO₂. Por otra parte, el vial con las células se descongeló por 2 minutos en un baño de agua a 37° C. Después de que los cristales desaparecieron, el vial con células fue removido del baño de agua hacia la campana de flujo laminar. El contenido del vial fue transferido a un tubo Falcon de 15 mL previamente llenado con 5 mL de DMEM con suero fetal bovino al 10%. El tubo con células se centrifugó a 1300 rpm por un tiempo total de 10 minutos y se procedió a descartar el sobrenadante cuyo contenido consiste en medio de cultivo y el crioprotector, que en este caso fue el glicerol. El pellet de células se resuspendió con 2 mL del nuevo medio y fue transferido al frasco de células incubado previamente. Se analizaron las células 24 horas después para observar la adherencia a la superficie y evaluación de un

posible subcultivo. El proceso descrito tiene como base las recomendaciones de la American Type Culture Collection (ATCC)¹⁰⁶.

4.5.2. Cambios de medio

Para realizar los cambios de medio de esta línea celular, se comenzó con la sanitización de la superficie de trabajo utilizando etanol al 70% y una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.1%. Todo esto se llevó a cabo en la campana de flujo laminar desinfectada previamente. Las herramientas que se utilizaron fueron micropipetas, pipetas Pasteur, puntas de 1000 μ L y un sistema de vacío para retirar el medio viejo. Después de esto, se añadieron 3 mL de solución de PBS para lavar el frasco y retirar detritos celulares junto con otros desechos. El PBS fue retirado con otra pipeta Pasteur y posterior a esto se añadieron 3 mL de medio DMEM suplementado. Por último, se incubaron de nuevo las células a 37° C con un 5% de CO₂.

4.5.3. Subcultivos de células

Se procedió a sanitizar con etanol al 70% el frasco con células y se llevó hacia la campana de flujo laminar desinfectada previamente. De manera similar al procedimiento de cambio de medio de cultivo, éste fue retirado con una pipeta Pasteur unida al sistema de vacío para después añadir 3 mL de PBS y lograr retirar los restos celulares y lavar el frasco. Posteriormente se procedió a retirar el PBS y

se añadieron 500 µl de una solución de tripsina/EDTA al 0.05% al frasco y se incubó por un lapso de 5 minutos a 37°C con un 5% de CO₂. Una vez finalizado el periodo de incubación, el frasco de células fue colocado de nuevo en la campana de flujo laminar y se le añadió 1 mL de medio de cultivo con el fin de inactivar a la tripsina/EDTA. Las células fueron resuspendidas para promover su separación total y fueron transferidas a un tubo Falcon de 15 mL, el cual fue centrifugado a 1300 rpm por un total de 10 minutos. Después de la centrifugación el sobrenadante fue descartado, y fueron añadidos 4 mL de medio de cultivo nuevo. Con el volumen resultante se resuspendieron las células y se tomó una alícuota de 20 µl para el conteo de células en la cámara de Neubauer. Según el cálculo del número de células en suspensión, se tomó el volumen correspondiente para hacer una dilución con el fin de obtener un volumen final de 3 mL y una densidad celular específica en un nuevo frasco de células. Por último, las células se incubaron en las condiciones estándar ya mencionadas para el cultivo celular.

4.6. Inducción de senescencia en la línea celular IMR-90 y recolección de SASP

Se emplearon fibroblastos humanos IMR-90 para la inducción de senescencia, los cuales fueron cultivados en frascos de 25 cm² a una densidad inicial de 360,000 células por frasco. Como medio de cultivo se utilizó DMEM suplementado con un 10% de SFB y un 1% de penicilina/estreptomicina, añadiendo un volumen total de 4 mL por frasco. Para inducir senescencia, a cada frasco se le añadió mitomicina C a una concentración final de 0.5 µg/mL. Este tratamiento se

mantuvo durante tres días bajo condiciones de incubación controladas (37 °C y 5% de CO₂), permitiendo que el compuesto actuara como agente alquilante, bloqueando la replicación del ADN y promoviendo el arresto irreversible del ciclo celular. Al tercer día, se retiró el medio inicial y las células fueron lavadas cuidadosamente dos veces con 4 mL de PBS para eliminar restos del compuesto y desechos metabólicos. Posteriormente, se añadió un nuevo medio DMEM suplementado con 10% de SFB (4 mL por frasco), esta vez sin mitomicina C, y se continuó la incubación bajo las mismas condiciones.

A los seis días desde el inicio del tratamiento, el medio suplementado con SFB fue reemplazado por medio DMEM sin suero fetal bovino con el propósito de eliminar los factores de crecimiento presentes en el suero y asegurar que el medio recolectado reflejara exclusivamente las secreciones asociadas al estado de senescencia. Después de 48 horas de incubación con medio sin suero, este fue cuidadosamente recolectado y considerado como medio condicionado de senescencia o como el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). Para garantizar la pureza del medio, este fue filtrado a través de membranas de 0.22 µm y almacenado a -20 °C hasta su uso en experimentos posteriores. La Figura 3 ilustra la metodología de inducción de senescencia y recolección de SASP.

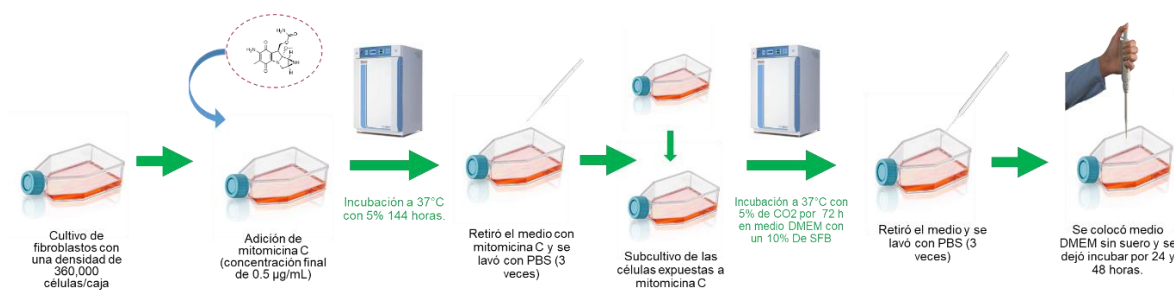


Figura 3. Metodología de inducción de senescencia y recolección de SASP. *Fuente: Elaboración propia.*

4.6.1. Confirmación del establecimiento de senescencia

La confirmación de la senescencia en las células IMR-90 se llevó a cabo usando principalmente el ensayo de la β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal, por sus siglas en inglés). Esta técnica se basa en detectar actividad enzimática específica cuando el medio se encuentra a un pH de 6.0, lo cual permite identificar a las células que han adquirido un fenotipo senescente. Para ello, primero se cultivaron las células, y después se fijaron utilizando formaldehído en concentraciones que iban del 2 al 4 %, dejando actuar el fijador durante unos cinco a diez minutos a temperatura ambiente. Luego se lavaron con PBS para retirar completamente cualquier residuo de ese fijador antes de continuar con la tinción.

Una vez fijadas, las células se incubaron en una solución con X-gal, un sustrato cromogénico preparado en buffer de citrato con pH 6.0, al que además se le añadieron sales de ferro y ferricianuro de potasio y cloruro de magnesio. Esta incubación se llevó a cabo a 37 °C por un periodo de entre 12 y 16 horas. Durante

ese tiempo, aquellas células que presentaban actividad β -galactosidasa desarrollaron un color azul muy característico, producto de la degradación del X-gal y la formación del cromóforo. La observación de la tinción azul se hizo usando microscopía óptica.

Además de la tinción, también se tomaron en cuenta ciertos cambios en la morfología de las células. Comparando con un grupo control no tratado, se notaron alteraciones como el aumento en el tamaño celular, una disposición desorganizada del citoesqueleto y una forma más extendida o aplanada, lo cual reforzó la evidencia de que las células habían entrado en un estado senescente.

Además de la técnica de tinción y la morfología observada en los campos 10x y 20x se realizó cuantificación de la expresión para los marcadores de senescencia *IL6* y *CDKN1A* mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR por sus siglas en inglés) con las mismas condiciones descritas en la sección 4.7. Los oligonucleótidos de estos genes fueron estandarizados previamente por el grupo de investigación y se compararon contra el gen de referencia *18S rRNA* (*housekeeping gene*). Estos marcadores también fueron utilizados más adelante en la metodología para evaluar el estado de senescencia en los procesos a evaluar.

4.7. Análisis de la expresión de los genes de pluripotencia, senescencia y células similares a β - pancreática

Se analizaron la expresión de los factores, *SOX2* y *KLF4* siendo estos algunos de los principales en la generación de pluripotencia, los marcadores de senescencia *IL6* y *CDKN1A*, así como la identificación de células similares a β - pancreáticas con los genes *NEUROG3* y *MAFB* en diferentes partes de la metodología general del proyecto. El gen constitutivo utilizado para normalizar fue el *18S rRNA*. Para realizar la cuantificación de la expresión se utilizó la técnica qPCR. Para esto fue necesario realizar la extracción de los transcritos de ARN mensajeros de las células de interés, lo cual se realizó con la ayuda del reactivo TRIzol siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó la generación del ADN complementario mediante el uso de la técnica de RT-PCR.

4.7.1. Diseño de primers para marcadores de pluripotencia

Para el diseño de primers de *KLF4* y *SOX2* se utilizaron diversas herramientas bioinformáticas como Primer-BLAST, OligoAnalyzer y UNAFold con el fin de realizar el mismo, de una manera más eficiente. En primer lugar, se buscó la secuencia del gen del cual se deseaba determinar su expresión a nivel de transcrito en la base de datos de genes del NCBI y posteriormente se procedió a utilizar Primer-BLAST para que arrojara distintas opciones de primers a los cuales se les iba seleccionando de una manera más específica al mover los parámetros que

otorga la interfaz de Primer-BLAST. Después de esto, se seleccionaron los mejores pares de primers de acuerdo con aquellos que contenían la cantidad óptima de GC que tenían una T_m ideal, que establecían menos interacción entre ellos y de igual manera con sus productos de amplificación. Esto último fue realizado con la ayuda del resto de las herramientas bioinformáticas OligoAnalyzer y UNAFold^{107,108}.

4.7.2. Extracción de ARN

La extracción de ARN total se realizó a partir de un cultivo de células expuestas a las condiciones experimentales mencionadas en la sección de métodos. En primer lugar, se sanitizó la campana de extracción y un frasco con células rociado con SDS al 1%. Posteriormente se retiró el medio contenido en el frasco con células utilizando una micropipeta. Después de esto, se añadieron 0.5 mL del reactivo TRIzol y se resuspendieron las células para promover la lisis y la liberación del ARN para su posterior incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, se procedió a añadir 0.1 mL de cloroformo, y se mezcló por inversión, la suspensión resultante fue incubada por 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Se llevó a la centrifugadora a 12, 000 x g por 15 minutos a 4°C. Se pudo observar la fase acuosa y la fase orgánica. La fase acuosa, la cual contendrá el ARN se transfirió a un tubo nuevo, evitando a toda costa no tocar la interfase para obtener una muestra pura de ARN. Como siguiente paso, se le añadieron 0.25 mL de isopropanol, se agitó el tubo y se incubó a temperatura de -20 °C durante toda la noche, después de esto, el tubo se centrifugó a 12, 000 x g por 15 minutos a 4°C,

se descartó el sobrenadante y se observó la aparición del pellet de ARN en el fondo del tubo. El pellet de ARN fue resuspendido de nuevo con una cantidad de 0.5 mL de etanol al 70%, después de esto, el tubo fue llevado al vórtex por 15 segundos para intentar barrer con compuestos no deseados, después, se centrifugó a 7500 x g a 4°C durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se dejó secar durante 5 minutos. Por último, se le añadieron 50 µl de agua libre de RNasas y se procedió a almacenar a una temperatura de -20°C. Para verificar la calidad y pureza del ARN obtenido se utilizó el equipo NanoDrop, y después, la técnica de electroforesis con gel de agarosa al 2% y buffer TBE al 1X.

4.7.3. RT-PCR

El paso siguiente, una vez obtenido el ARN, fue convertirlo en ADN mediante el uso de la transcriptasa reversa Superscript IV, generando una biblioteca de ADN complementarios (ADNc). Se emplearon a manera de primers para la reacción de retrotranscripción una mezcla 1:1 de oligo-d(T)20 y hexámeros aleatorios, para la retrotranscripción de todos los tipos de ARN, mientras que los oligo-d(T)20 fueron utilizados para los ARN mensajeros en específico. Para comenzar con la reacción de retrotranscripción se le añadieron 0.5 µl de oligo-d(T)20, 0.5 µl de hexámeros aleatorios, 1 µl de nucleótidos trifosfatados a una concentración de 10 mM, 10 µl de solución de ARN molde con una cantidad de entre 10 pg – 5 µg del ARN total y agua libre de RNasas hasta completar 13 µl, todo lo anterior fue añadido a un primer tubo de PCR que llamamos “Tubo #1”. Después de añadir los componentes, se realizó

una mezcla en vórtex y una posterior centrifugación. Como paso siguiente, el tubo se incubó por 5 minutos a 65°C, después se transfirió a un recipiente con hielo durante 1 minuto. En un segundo tubo, denominado “Tubo #2” de PCR, se adicionaron 4 µl del buffer SSIV 5x, 1 µl de la solución de ditionitrietol (DTT) a 100 mM, 1 µl de inhibidor de RNasas, y 1 µl de la solución con la enzima Superscript IV. Después de esto se transfirió el contenido del tubo # 2 hacia el tubo #1, el cual fue incubado por 10 minutos a 23°C, obteniendo un volumen final de 20 µl. Después de haber transcurrido el tiempo de incubación, se colocó el tubo en un termociclador con las siguientes condiciones: 1) incubación por 10 minutos a una temperatura de 55°C; 2) incubación por 10 minutos a 80% y 3) Adición de 1 µl de RNasa H e incubación por 20 minutos a 37°C para degradar el ARN de la muestra.

4.7.4. qPCR

Para finalizar, la cuantificación de la expresión génica de los distintos marcadores mediante qPCR se inició preparando las reacciones en tubos de PCR. Cada una de las reacciones contenía 5 µl de la mezcla maestra de SYBER green 2x, 1 µl de solución con el primer forward (3 mM), 1 µl de primer reverse (3 mM), de 0.5 a 3 µl de la solución de ADNc obtenida del procedimiento anterior dependiendo de la cantidad de ARN extraído previamente donde buscamos que queden 5 ng de ADNc por tubo, y agua grado molecular libre de nucleasas necesaria para completar un volumen de 10 µl. Primero, se incubaron los tubos por 2 minutos a 50 °C para activar la mezcla de reacción, posteriormente se incubaron para la

desnaturalización del ADNc molde a 95°C por 2 minutos. Finalmente, se realizaron 40 ciclos de alineación y extensión a 95°C por 15 segundos y 60°C por 30 segundos respectivamente.

La validación de cada par de primers para pluripotencia (*KLF4* y *SOX2*) fue realizada previamente por la construcción de una curva de calibración con 1, 5, 25, 125 y 625 ng de ADNc por tubo de reacción de la cual se obtuvieron la eficiencia de la qPCR. Por su parte, los oligonucleótidos de los marcadores de senescencia (*IL6* y *CDKN1A*) fueron estandarizados previamente por el grupo de investigación. Mientras que los primers utilizados para la identificación de células similares a β -pancreáticas (*NEUROG3* y *MAFB*) se obtuvieron de la literatura con condiciones previamente estandarizadas. Los primers utilizados en cada etapa de este proyecto se encuentran en la Tabla 2.

Después de cada qPCR, se obtuvieron las curvas de amplificación y los valores de Ct. Estos últimos valores se utilizaron para calcular la expresión relativa entre diversos grupos, según la parte de la metodología, para ello se empleó el método del $\Delta\Delta Ct$ por triplicado técnico. Este método consiste en la cuantificación relativa de la expresión génica (transcritos de ARN) comparando dos grupos de diferentes condiciones (un tratamiento respecto a un control establecido). Lo primero que se realiza es la normalización de los valores de Ct con el gen constitutivo (*18S rRNA*) restándole de cada valor de Ct de cada gen a evaluar ($Ct_{gen} - Ct_{18S}$) para obtener el ΔCt . Posteriormente, se obtiene el $\Delta\Delta Ct$ al restar el valor ΔCt del gen de interés perteneciente al grupo seleccionado como control del ΔCt

del gen de interés perteneciente al grupo seleccionado como tratamiento ($\Delta Ct_{\text{gen A tratamiento}} - \Delta Ct_{\text{gen A control}}$). Este valor de $\Delta\Delta Ct$ nos permite obtener la expresión relativa del gen en la condición tratada comparada con la no tratada o control con la fórmula de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabla 2. Secuencias nucleotídicas de los pares de primers utilizados en los diferentes procesos del proyecto para la cuantificación de expresión relativa.

Tipo de marcador	Gen	Sentido	Secuencia (5'→3')
Senescencia	<i>IL6</i>	Forward	CCGGGAACGAAAGAGAAGCT
		Reverse	GCGCTTGTGGAGAAGGAGTT
	<i>CDKN1A</i>	Forward	GACACCACTGGAGGGTGACT
		Reverse	CAGGTCCACATGGTCTTCCT
Pluripotencia	<i>KLF4</i>	Forward	CATCTCAAGGCACACCTGCG
		Reverse	ATTTCCATCCACAGCCGTCC
	<i>SOX2</i>	Forward	CGCCCCCAGCAGACTTCACA
		Reverse	CTCCTCTTTTGCACCCCTCCCATTT
Constitutivo	<i>18S rRNA</i>	Forward	CCCTATCAACTTTTCGATGGTAGTCG
		Reverse	CCAATGGATCCTCGTTAAAGGATTT
Células similares a β-pancreáticas	<i>NEUROG3</i>	Forward	CTTCGTCTTCCGAGGCTCT
		Reverse	CTATTCTTTTGCGCCGGTAG
		Reverse	GCCCCAGGGTTATGAGACTAT
	<i>MAFB</i>	Forward	CATAGAGAACGTGGCAGCAA

		Reverse	ATGCCCGGAACTTTTTCTTT
--	--	---------	----------------------

4.8. Obtención de células desdiferenciadas

Para la obtención de células desdiferenciadas, se empleó la línea celular IMR-90, cultivada en frascos de 25 cm² a una densidad inicial de 360,000 células por frasco. Estas células fueron sometidas a un protocolo de exposición a medio condicionado de senescencia durante un periodo de 28 días. Cada frasco recibió 500 µL de medio condicionado junto con 3.5 mL de medio sin suero, manteniendo un volumen final de 4 mL por frasco con 25% de SASP (Figura 4).

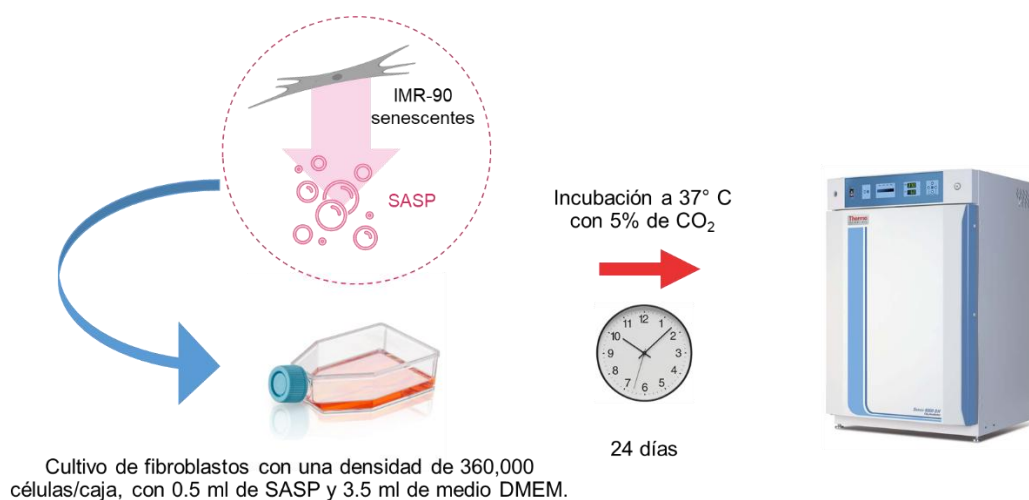


Figura 4. Proceso de adición de SASP a fibroblastos IMR-90 para obtener células desdiferenciadas. *Fuente: Elaboración propia.*

Los cambios de medio se realizaron cada 4 días para asegurar la renovación de los factores activos presentes en el medio condicionado y eliminar posibles desechos metabólicos (Figura 5). Durante este periodo, las células fueron monitoreadas regularmente para evaluar cambios morfológicos asociados con el proceso de desdiferenciación. Además, cada 4 días se realizó la extracción de ARN total utilizando un protocolo estandarizado en la sección 4.7.2. para preservar la calidad del material genético. Este ARN fue utilizado para cuantificar la expresión de marcadores clave de pluripotencia, como *SOX2* y *KLF4*, así como de marcadores de senescencia, incluyendo *IL6* y *CDKN1A*, mediante técnicas de RT-PCR y qPCR. La recolección periódica de ARN permitió realizar un seguimiento temporal de los cambios en la expresión génica asociados con la desdiferenciación celular.

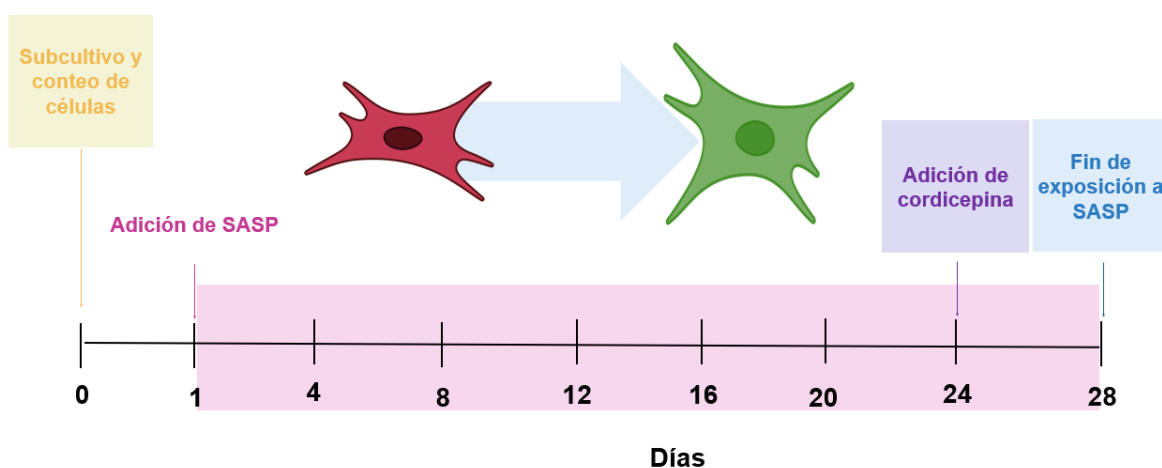


Figura 5. Diagrama cronológico de la metodología general para la obtención de células desdiferenciadas mediante exposición a SASP, se obtuvieron transcritos de ARN de los días 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28. *Fuente: Elaboración propia.*

Después de completar los primeros 24 días de tratamiento con el medio condicionado, se aplicó un nuevo tratamiento a las células que consistió en la combinación de cordicepina con ese mismo medio condicionado derivado de células senescentes. Esta fase adicional se mantuvo hasta el día 28 con la intención de observar si había algún efecto conjunto entre la cordicepina y los factores presentes en el medio sobre el proceso de desdiferenciación y el estado general de las células. Al finalizar ese periodo, se volvió a extraer el ARN de las células tratadas para poder analizar la expresión de los mismos genes que ya se habían evaluado anteriormente, entre ellos los relacionados con la pluripotencia, como *KLF4* y *SOX2*, así como los marcadores de senescencia *IL6* y *CDKN1A*. Con esta evaluación final, se buscó observar si hubo modificaciones en la expresión génica y si el tratamiento combinado generó algún efecto particular en la regulación de estos procesos.

4.9. Diferenciación de células desdiferenciadas a células β -pancreáticas

Las células que se eligieron para iniciar el protocolo de diferenciación fueron aquellas que, luego de haber sido tratadas durante 24 días con medio condicionado de senescencia, mostraron un aumento notable en la expresión de los genes *KLF4* y *SOX2*, como se muestra más adelante en la sección de resultados. La decisión de utilizar estas células en particular para comenzar el proceso de diferenciación se tomó porque fue en ese punto donde se observó la mayor activación de los marcadores que indican un estado celular más inmaduro.

Desde ese momento, se aplicó un protocolo de diferenciación (Figura 6) que tuvo una duración de 16 días y estuvo organizado en seis fases consecutivas. Para cada una de esas etapas se usaron diferentes combinaciones de factores que ayudaron a guiar poco a poco a las células hacia un destino similar al de las β -pancreáticas. El protocolo original fue adaptado a partir del publicado por Hogrebe y colaboradores en 2014⁷⁷, aunque en este trabajo se realizaron algunos ajustes, especialmente en la cantidad de factores usados y en el tiempo que se mantuvieron activos, con el propósito de mejorar el grado de maduración de las células dentro del sistema experimental. Este enfoque permitió mantener una continuidad entre el estado inducido por el SASP y la transición hacia un fenotipo más especializado.

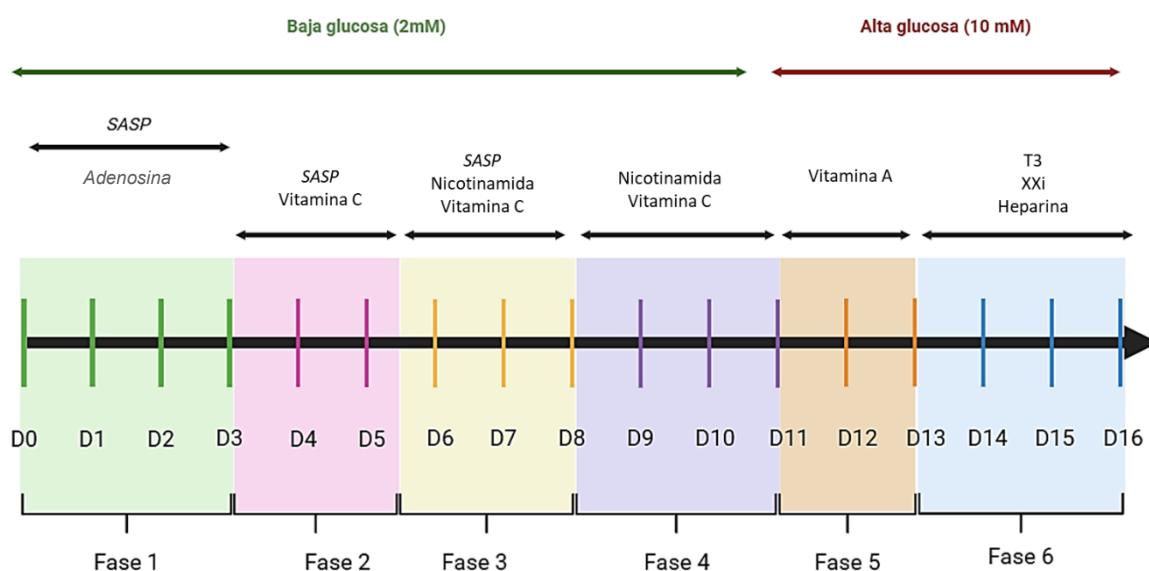


Figura 6. Diagrama cronológico del proceso de diferenciación hacia células similares a β -pancreáticas dividido en 6 fases. *Fuente: Elaboración propia.*

La primera fase abarcó del día 0 al día 3 del proceso. Durante esta fase se empleó SASP derivado de fibroblastos de la línea celular IMR-90 senescentes, esterilizado previamente por filtración (membrana de 0.22 μm) además de adenosina. Las células fueron sometidas a concentraciones bajas de glucosa (2 mM) para activar vías metabólicas asociadas con la diferenciación pancreática. El recambio de medio se realizó cada 96 horas, manteniendo condiciones estándar de incubación. Durante la fase 2 comprendida desde del día 3 al 5.5 se continuó el empleo del medio condicionado de senescencia, complementado con ácido ascórbico (vitamina C, 50 μM).

En la tercera fase comprendida desde el día 5.5 al 8, se incorporó nicotinamida (10 mM), precursor del NAD^+ con efectos promotores de maduración pancreática y protección frente al estrés oxidativo. Se mantuvo la suplementación con vitamina C y medio condicionado para reforzar el avance progresivo de la diferenciación. En la fase 4 comprendida del día 8 al 11 se mantuvo la suplementación con nicotinamida (10 mM) y vitamina C (50 μM) para favorecer la estabilización fenotípica. Durante la fase 5 (Día 11-13) se añadió un medio rico en glucosa (10 mM) para promover la diferenciación hacia células β funcionales, complementado con retinol (vitamina A, 2 μM), implicado en la activación de receptores específicos de ácido retinoico necesarios para la diferenciación endocrina pancreática.

Durante la fase 6 y final (día 13-16) se adicionaron factores clave como triyodotironina (T3, 50 nM), moduladora del metabolismo energético y diferenciación

endocrina; un inhibidor específico de la γ -secretasa (XXi) que bloquea la señalización Notch favoreciendo la diferenciación β -pancreática; y heparina (5 U/mL) como estabilizadora de factores de crecimiento. Este protocolo incluyó un control metabólico con dos fases definidas: inicialmente, baja glucosa (2 mM, Día 0-11) para favorecer una diferenciación progresiva sin activación metabólica prematura, seguida de una fase con alta glucosa (10 mM, Día 11-16) para inducir maduración funcional y respuestas glucosa-insulina adecuadas.

4.9.1. Caracterización de células β por qPCR y morfológica

Las células sometidas al proceso de diferenciación fueron lavadas con PBS, seguido por la extracción de ARN total utilizando TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La calidad e integridad del ARN obtenido se confirmó mediante espectrofotometría (relación A260/A280) y electroforesis en gel de agarosa al 2%. Posteriormente, se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc) utilizando transcriptasa inversa en presencia de oligo-dT y hexámeros aleatorios de la sección 4.7.3.

La expresión génica específica se evaluó mediante qPCR en tiempo real, utilizando primers específicos para marcadores característicos de células β pancreáticas inmaduras (*MAFB*) y de intermediarios (*NUEROG3*) y un gen *housekeeping* (*18S rRNA*). La reacción se realizó utilizando un termociclador con sistema de detección de fluorescencia SYBR Green bajo las condiciones descritas

previamente en la sección 4.7.4. Las células diferenciadas fueron examinadas mediante microscopía, documentando cambios en la morfología.

4.9.2. Análisis estadístico

En todos los experimentos realizados se trabajó con triplicados técnicos, aunque en el día 16 hubo una excepción porque no se logró recolectar la cantidad de muestra suficiente para ese punto. Para cada uno de los análisis, se evaluó si los datos seguían una distribución normal utilizando tanto la prueba de Shapiro-Wilk como la de Kolmogorov-Smirnov, considerando además el valor p ajustado de Dallal-Wilkinson-Lillie como referencia adicional. Solo se continuó con el análisis paramétrico cuando los resultados indicaban que p era mayor a 0.05.

Cuando el experimento requería comparar solo dos grupos, como por ejemplo entre el control y los fibroblastos tratados con SASP, o también al evaluar efectos de ciertas moléculas durante la diferenciación, se aplicó la prueba t de Student para muestras independientes. Esto se utilizó en análisis como el de la expresión relativa de genes como *MAFB* y *NEUROG3* en células que estaban diferenciadas o no hacia un fenotipo parecido al de células β pancreáticas.

En los casos donde se analizaron cuatro condiciones diferentes, es decir, el grupo control, el tratado con SASP, el tratado con cordicepina, y el grupo que recibió ambos tratamientos juntos, se decidió aplicar un análisis de varianza de un solo factor (ANOVA de un factor). Esta prueba se usó para comparar la expresión de

genes específicos como *IL6*, *CDKN1A*, *KLF4* y *SOX2* con respecto al grupo control. En este tipo de análisis también se mantuvieron los triplicados técnicos por cada uno de los genes evaluados.

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.0. Los datos fueron presentados como media con su desviación estándar, y se consideró que había significancia estadística cuando el valor de p era menor a 0.05. Para mostrar los niveles de significancia en las gráficas, se usaron asteriscos: uno para p menor a 0.05, dos para p menor a 0.01, tres para p menor a 0.001 y cuatro cuando p fue menor a 0.0001. Cuando no hubo diferencias significativas entre los grupos, se indicó como “ns”, es decir, no significativo.

4.10. Propuesta de mecanismo de acción molecular de la cordicepina en procesos de desdiferenciación/diferenciación celular: metodología computacional.

Para llevar a cabo este estudio, primero fue necesario construir una base de datos con diferentes compuestos endógenos que participan en el metabolismo de las purinas. Esta selección se hizo porque la cordicepina (COR) comparte similitud estructural con el esqueleto básico de estas moléculas. Se incluyeron compuestos como adenosina, inosina y guanosina (ADO, INO y GUA, respectivamente), junto con sus correspondientes formas mono-, di- y trifosforiladas (por ejemplo: AMP, ADP, ATP). Asimismo, se incorporó la S-adenosilmetionina (SAM), dada su

reconocida relevancia bioquímica. A esta colección se añadieron tanto la COR como varios de sus metabolitos derivados, como cordicepina monofostato (COR-MP) o 3'-desoxiinosina monofostato (3'-dIMP), que ya han sido documentados en la literatura. Para representar cada molécula, se recuperaron sus códigos CID (Compound Identifier) y SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) desde la base de datos PubChem, y posteriormente se modelaron considerando un pH fisiológico cercano a 7.4 utilizando el software Avogadro¹⁰⁹. Los datos recopilados se organizaron en una tabla donde se comparan con compuestos derivados de ADO.

4.10.1. Análisis comparativo de la estructura de la cordicepina y sus análogos frente a compuestos derivados de purinas

Después de haber reunido esta información, se procedió con un análisis estructural comparativo entre las moléculas seleccionadas. Este análisis incluyó tanto la similitud bidimensional (2D) como la tridimensional (3D). En el caso de la similitud 2D, se calcularon los coeficientes de Tanimoto (TC), los cuales comparan la huella digital química entre pares de moléculas. Estos valores pueden ir de 0 a 100, donde valores más altos indican mayor semejanza estructural¹¹⁰. Para evaluar la similitud tridimensional, se calcularon dos puntuaciones distintas: una que toma en cuenta la forma espacial (ST) y otra que considera propiedades químicas específicas como la capacidad de formar enlaces de hidrógeno o la presencia de

regiones hidrofóbicas (CT). Ambas puntuaciones también van de 0 a 100, y al sumarlas se obtiene el llamado Combo Tanimoto, cuyo valor máximo es 200¹¹¹.

Si el TC está entre 50 y 80 se considera una similitud intermedia, mientras que valores mayores de 80 para CT o combinaciones que den un Combo T mayor a 130 ya se interpretan como alta similitud¹¹². Los valores individuales obtenidos de cada comparación fueron procesados en el servicio Score Matrix de PubChem¹¹³.

4.10.2. Análisis fisicoquímico comparativo entre la cordicepina, sus análogos y los compuestos derivados de purinas

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis más detallado que comparó las propiedades fisicoquímicas de todas las moléculas del estudio. Esta evaluación se realizó utilizando la herramienta SwissADME que permite predecir parámetros como el peso molecular, el número de enlaces rotacionales o la cantidad de donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno, así como otros aspectos relacionados con la polaridad, la lipofilicidad o la rigidez estructural de cada compuesto¹¹⁴.

Con estos datos se construyó una matriz para comparar todas las moléculas, estandarizando previamente los valores mediante puntuaciones Z. Esto fue necesario porque cada parámetro tiene unidades distintas. Se empleó un agrupamiento jerárquico (HC por sus siglas en inglés) sin supervisión para observar si las moléculas se organizaban en patrones coherentes basados en sus

características fisicoquímicas. Para ello, se utilizó RStudio con diversas bibliotecas estadísticas, y se aplicaron distancias euclidianas junto con el método de Ward¹¹⁵.

4.10.3. Identificación de posibles blancos moleculares basada en las propiedades estructurales de la cordicepina y sus compuestos análogos

Además, se exploró la posibilidad de que estas moléculas interactuaran con blancos moleculares específicos dentro del organismo. Para ello se usó la plataforma SwissTargetPrediction, la cual permite inferir posibles proteínas blanco basándose en la similitud química de los compuestos con ligandos conocido. Esta herramienta cuenta con una base de datos bastante amplia, que incluye más de 3000 macromoléculas y cientos de miles de compuestos activos¹¹⁶.

El análisis incluyó una puntuación de probabilidad basada en similitud 2D/3D y coincidencias con compuestos bioactivos. Sin embargo, para la cordicepina y su derivado 3'-dINO, SwissTargetPrediction no generó resultados. Aunque puedan parecer similares a moléculas activas conocidas, la herramienta depende de comparaciones cuantitativas con bases de datos específicas, y si no se supera cierto umbral de similitud o no hay blancos validados, no emite predicciones. Por esta razón, se recurrió a otra herramienta llamada Similarity Ensemble Approach (SEA), que se basa en un principio similar, pero usa distintos algoritmos de comparación molecular.

4.10.4. Estudio comparativo de afinidad y mecanismos de interacción de la cordicepina y sus derivados frente a blancos moleculares de metabolitos endógenos

A continuación, se evaluó si las moléculas del estudio eran capaces de interactuar con las enzimas o proteínas endógenas que participan en la ruta de las purinas. Se prepararon estructuras tridimensionales de las moléculas utilizando Avogadro, y se optimizaron energéticamente con el campo de fuerza MMFF94. Por otro lado, las estructuras de las proteínas humanas fueron descargadas del PDB y limpiadas de ligandos, agua e iones mediante Chimera 1.16^{117,118}.

Para simular las interacciones se utilizó AutoDock 4.2, donde se calcularon las energías de acoplamiento entre las moléculas candidatas y sus posibles blancos. Las condiciones de la simulación incluyeron adición de cargas específicas tanto a proteínas como a ligandos, y la predicción de los sitios activos se basó en datos de UniProt y DoGSiteScorer^{119,120}.

Entre los algoritmos usados, el método genético de tipo Lamarckiano permitió explorar distintas conformaciones y localizar aquellas con mejor afinidad. En total se hicieron 10 ejecuciones por cada simulación, con millones de evaluaciones y generaciones para garantizar buenos resultados. Se registraron las mejores puntuaciones obtenidas y se compararon los modos de unión con los de los ligandos endógenos. Las interacciones más representativas fueron observadas con Chimera X¹²¹.

4.10.5. Simulaciones de dinámica molecular

En la última etapa del análisis, se procedió con simulaciones de dinámica molecular. En primer lugar, se construyeron modelos tridimensionales de dos isoformas de la enzima adenilato ciclasa humana utilizando el algoritmo RosettaFold¹²². Nombramos ADCY5 a la AC transmembrana y ADCY10 a la AC soluble. Debido a que ciertas regiones de estas proteínas eran demasiado largas o desordenadas, se modelaron por fragmentos y después se ensamblaron en Schrödinger-Maestro.

Luego, se generaron los modelos de ligandos de adenosina trifosfato (ATP) o Cordicepina trifosfato (COR-TP), basados en datos cristalográficos obtenidos del PDB¹²³.

Con los modelos listos, se realizaron simulaciones de dinámica molecular con el programa Desmond 3.6¹²⁴. Se utilizaron condiciones fisiológicas estandarizadas, como una temperatura cercana a los 310 K, presión constante, iones en solución y un sistema de agua TIP3P. En el caso de ADCY5 se agregó una membrana de fosfatidilcolina para simular el entorno transmembranal.

4.10.6. Metadinámica bien temperada

Por último, se realizó una simulación de metadinámica bien temperada (well-tempered metadynamics), empleando los modelos seleccionados de cada complejo

proteína–ligando. Para esta simulación, se eligió como variable colectiva la distancia entre el centro de masa del ligando y los residuos de la proteína que interactúan con él. Durante 25 nanosegundos se aplicó un potencial repulsivo de tipo gaussiano para explorar las distintas configuraciones del sistema. Esta técnica permitió observar con mayor detalle los cambios conformacionales y la estabilidad de la interacción bajo condiciones dinámicas similares a las fisiológicas.

En la Figura 7 se observa un diagrama general de la metodología *in silico* descrita en esta sección.

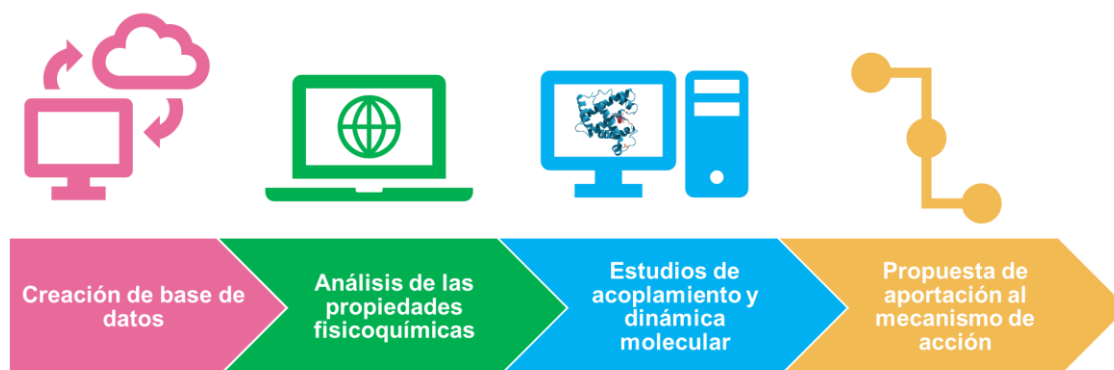


Figura 7. Diagrama de la metodología *in silico* para la propuesta del mecanismo de acción de la cordicepina en procesos de plasticidad celular. *Fuente: Elaboración propia.*

4.11. Gestión y disposición de residuos

Los residuos generados en este proyecto se manejaron siguiendo el programa de gestión de la FCQ de la UANL, clasificándolos en contenedores según su naturaleza:

- **A:** Soluciones de sales, ácidos y bases neutralizadas.
- **B:** Sólidos inorgánicos.
- **C:** Disolventes orgánicos no halogenados.
- **D:** Disolventes orgánicos halogenados.
- **E:** Materiales tóxicos o cancerígenos.
- **G:** Sólidos orgánicos.
- **Vidrio/Plástico:** Impregnados con químicos.

Para los **Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI)**, se usaron contenedores específicos:

- **Rojo rígido:** Punzocortantes contaminados.
- **Rojo hermético:** Sangre, torundas y tubos.
- **Amarillo:** Residuos patológicos.

Capítulo V

5. Resultados y discusión

La presente sección integra los principales hallazgos experimentales derivados de la investigación, organizados de acuerdo con los objetivos específicos planteados.

5.1. Inducción experimental de senescencia celular en fibroblastos humanos IMR-90

En esta etapa se buscó confirmar la eficacia del tratamiento con mitomicina C para inducir un fenotipo senescente en la línea celular de fibroblastos humanos IMR-90. Se pudo observar la morfología característica de células senescentes en 20x, donde se ven los fibroblastos más grandes, alargados y menos delgadas del centro, dando la apariencia de estar aplastadas o extendidas sobre la superficie del frasco (Figura 8).

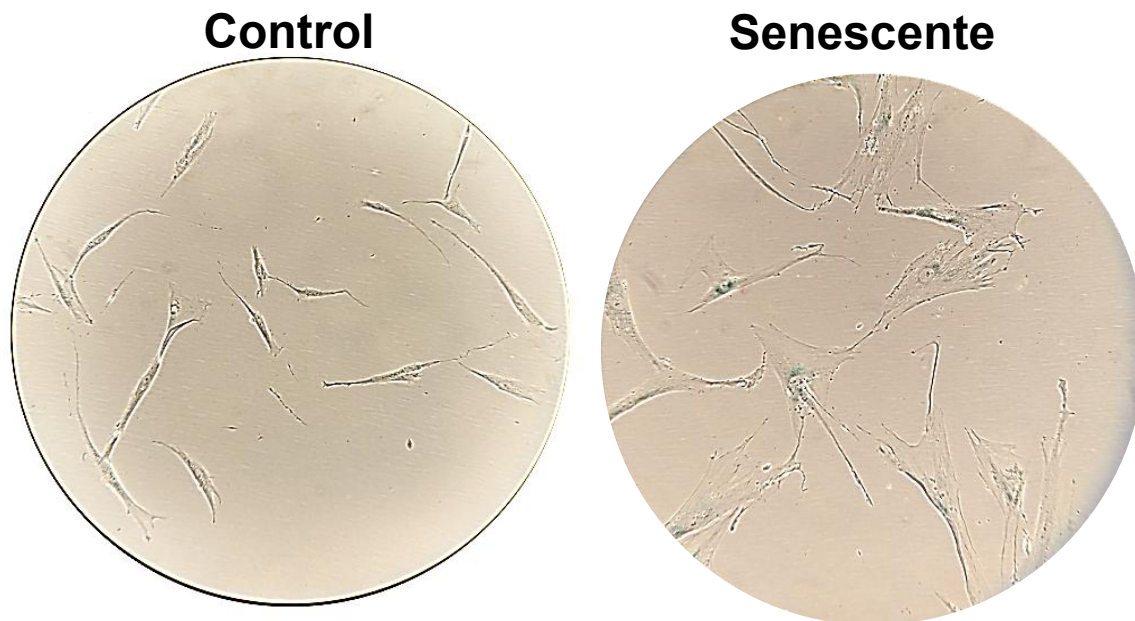


Figura 8. Inducción de senescencia en células IMR-90. Cambio morfológico observado a 20x. *Fuente: Elaboración propia.*

Se verificó la inducción de senescencia mediante el ensayo citoquímico de actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia. Los resultados mostraron un elevado número de células positivas teñidas en azul en los cultivos expuestos a MMC, confirmando la inducción de senescencia celular. En contraste, los cultivos control presentaron un número significativamente menor de células teñidas (Figura 9).

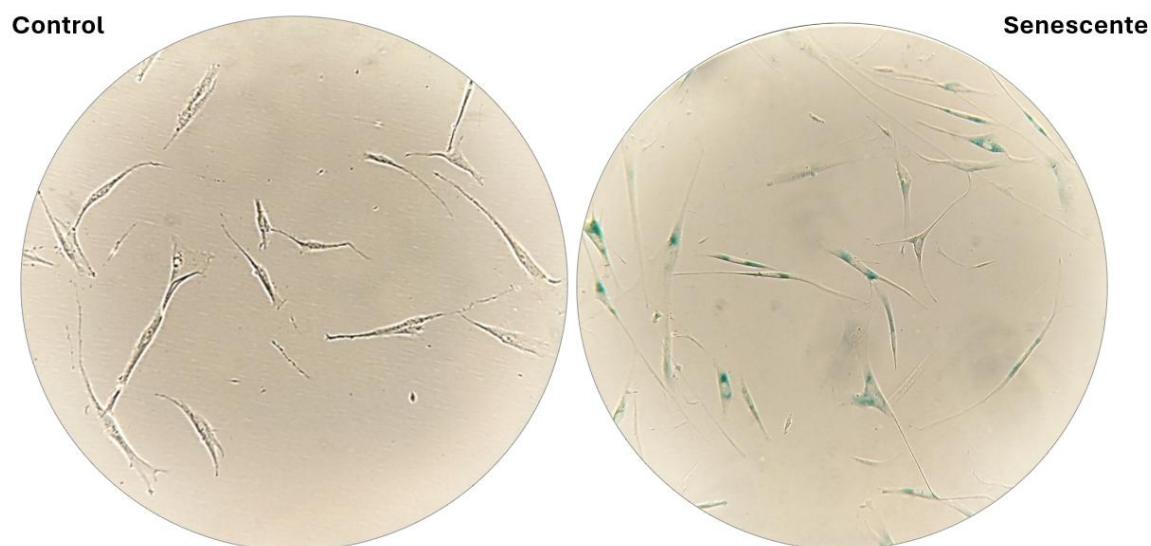


Figura 9. Ensayo de la β -galactosidasa después de la inducción de senescencia en células IMR-90. Tinción observada a 10x. *Fuente: Elaboración propia.*

5.2. Recolección de SASP

Una vez establecida la senescencia en los fibroblastos se cultivaron 24 y 48 horas en medio DMEM fresco sin SFB. Se recolectó el SASP en tubos Falcon de 15 mL y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Una limitación relevante del presente trabajo es que no se caracterizó la composición exacta del secretoma producido por las células senescentes (SASP). Sin embargo, estudios previos han demostrado que el SASP contiene una mezcla compleja de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8), factores de crecimiento (TGF- β , VEGF), metaloproteinasas, exosomas, y especies reactivas de oxígeno, los cuales

pueden modular la plasticidad celular y favorecer estados de desdiferenciación¹²⁵⁻¹²⁷.

5.3. Resultados del proceso de desdiferenciación o reprogramación celular

El objetivo principal del estudio fue evaluar el proceso de desdiferenciación de células fibroblásticas IMR-90 hacia células con características pluripotenciales. Este proceso se realizó mediante un ensayo experimental con una duración total de 28 días, según lo especificado en la sección de metodología (Figura 3). Cada cuatro días se realizaron cambios de medio y se llevaron a cabo extracciones de ARN, donde se determinó la integridad de la muestra de ARN en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X (Figura 10).

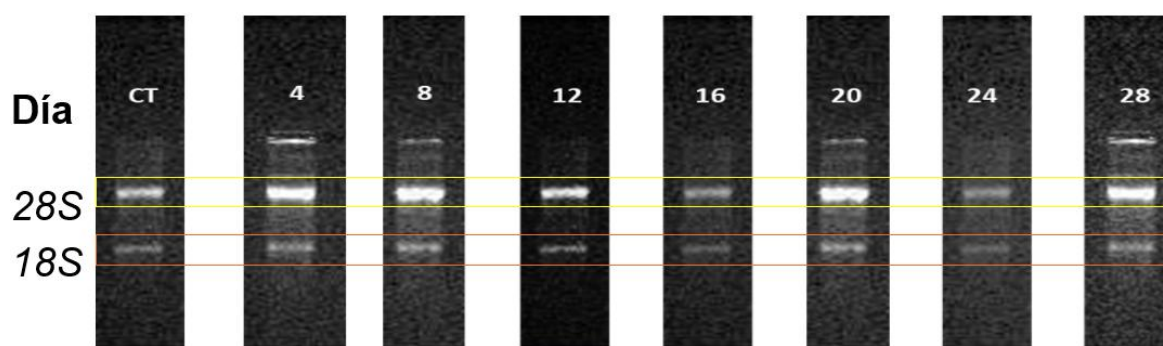


Figura 10. Geles de electroforesis al 2% en buffer TBE 1X de las muestras de ARN en los diferentes días, iniciando con el día 0 como CT y hasta el día 28. *Fuente: Elaboración propia.*

La expresión relativa fue determinada empleando el gen *18S rRNA* como gen constitutivo. A partir de esto, se calcularon los valores de ΔCT y $\Delta\Delta CT$ en relación con el grupo control correspondiente al día 0. En el caso del día 16, no se logró llevar a cabo el análisis estadístico porque ocurrió un error durante el experimento, lo cual impidió contar con el triplicado técnico necesario.

Los resultados indicaron de manera consistente un aumento en los marcadores de senescencia (*IL6* y *CDKN1A*) y los de pluripotencia (*KLF4* y *SOX2*) en los días 8 y 24, siendo el día 24 el que mostró un aumento más drástico en los marcadores y una notable caída de estos para el día 28. Por ende, se partió del día 24 (donde los marcadores de pluripotencia estaban en su pico) para iniciar el proceso de diferenciación). En las Figuras 11, 12, 13 y 14 se observa el cambio de los marcadores *IL6*, *CDKN1A*, *KLF4* y *SOX2* de forma individual y en la Figura 15 en conjunto.

Los datos de expresión génica muestran un aumento simultáneo en marcadores asociados tanto a senescencia (*IL6*, *CDKN1A*) como a pluripotencia (*KLF4*, *SOX2*) durante la exposición al SASP, específicamente en el día 24. Esta coexpresión sugiere un estado transitorio o mixto característico de las células en etapas pluripotenciales caracterizados por una hiperactivación transcripcional¹²⁸. En la figura 17 se observan ciertos cambios en la forma de las células que parecen estar relacionados con un estado menos diferenciado. Esto podría estar indicando una posible transición hacia un fenotipo pluripotente. Sin embargo, no se puede asumir que las señales de senescencia hayan desaparecido del todo, ya que

algunos rasgos propios de este estado podrían seguir presentes. Por esta razón, sería necesario realizar pruebas adicionales que ayuden a entender con mayor claridad qué tipo de características son las que dominan en este momento en la población celular.

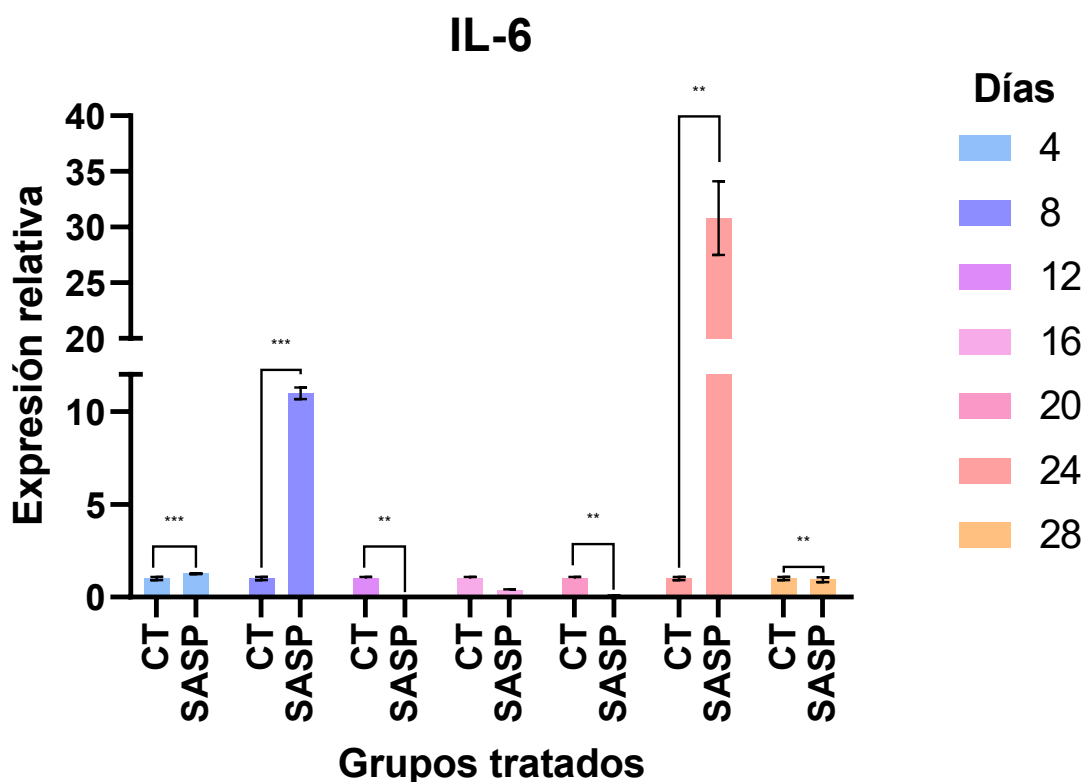


Figura 11. Expresión relativa del marcador de senescencia *IL6* en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP (SASP) en periodos de 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 días de incubación. Valor $p < 0.05$ (*), $p < .01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns). *Fuente: Elaboración propia empleando GraphPad Prism 8.*

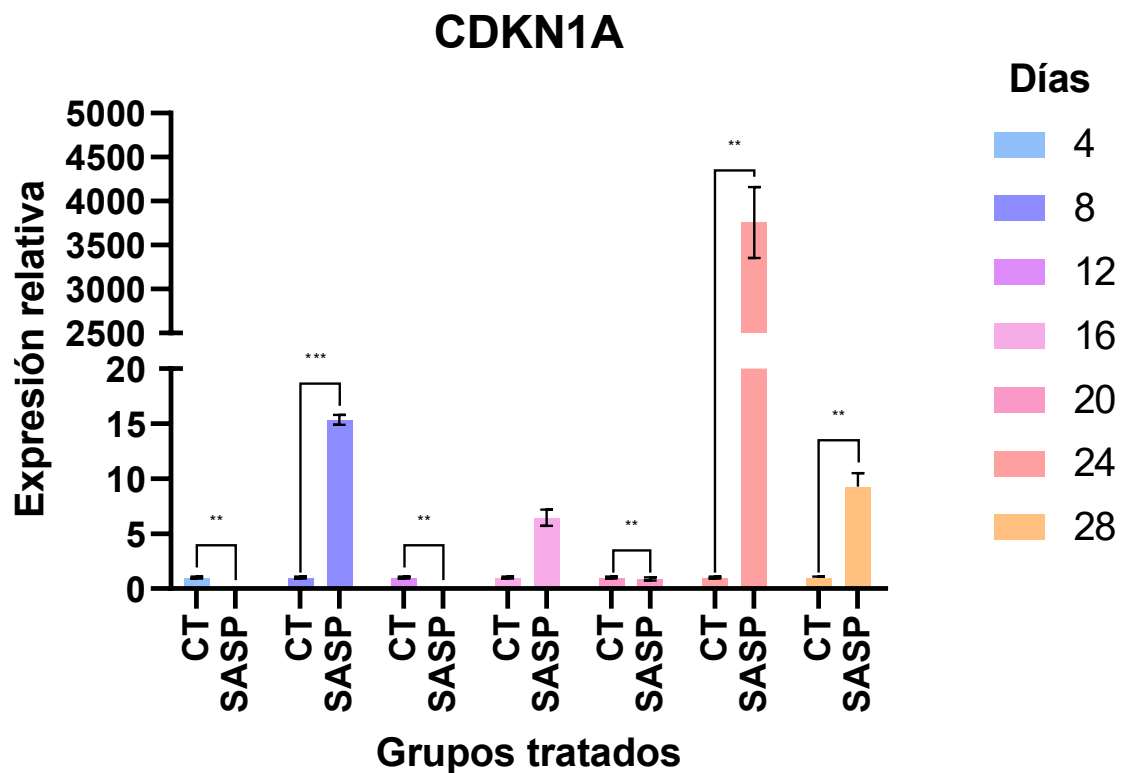


Figura 12. Expresión relativa del marcador de senescencia *CDKN1A* en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP (SASP) en periodos de 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 días de incubación. Valor $p < 0.05$ (*), $p < .01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns). *Fuente: Elaboración propia empleando GraphPad Prism 8.*

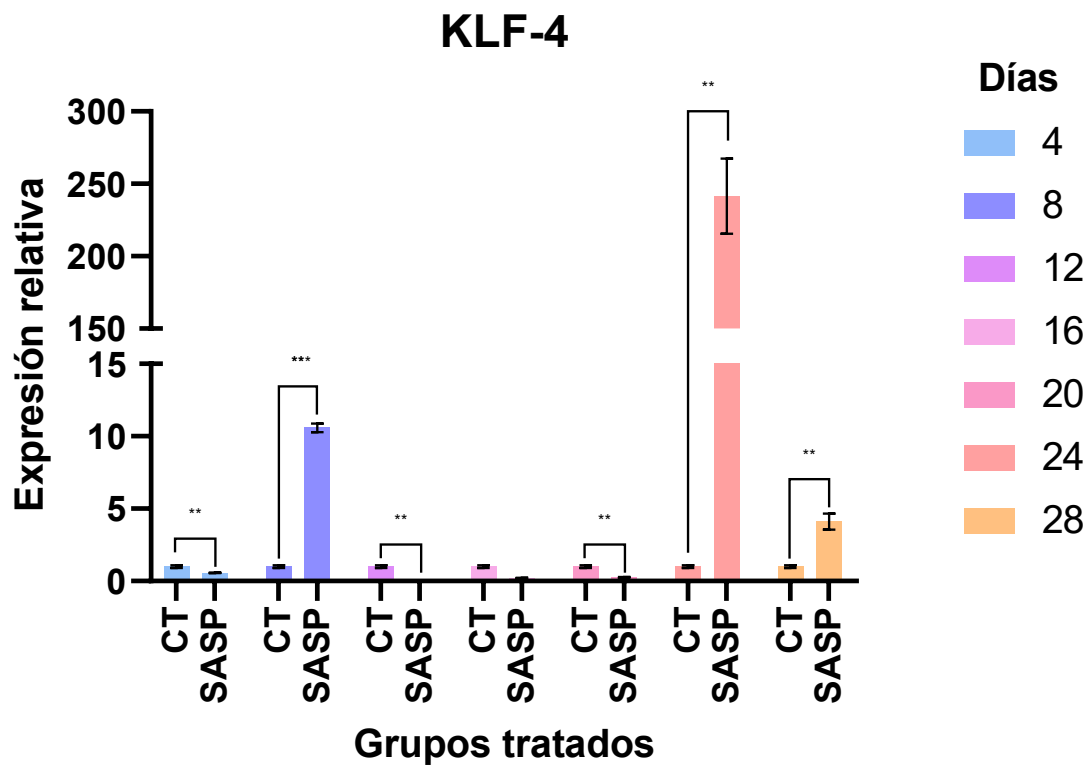


Figura 13. Expresión relativa del marcador de pluripotencia *KLF4* en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP (SASP) en periodos de 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 días de incubación. Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns). *Fuente: Elaboración propia empleando GraphPad Prism 8.*

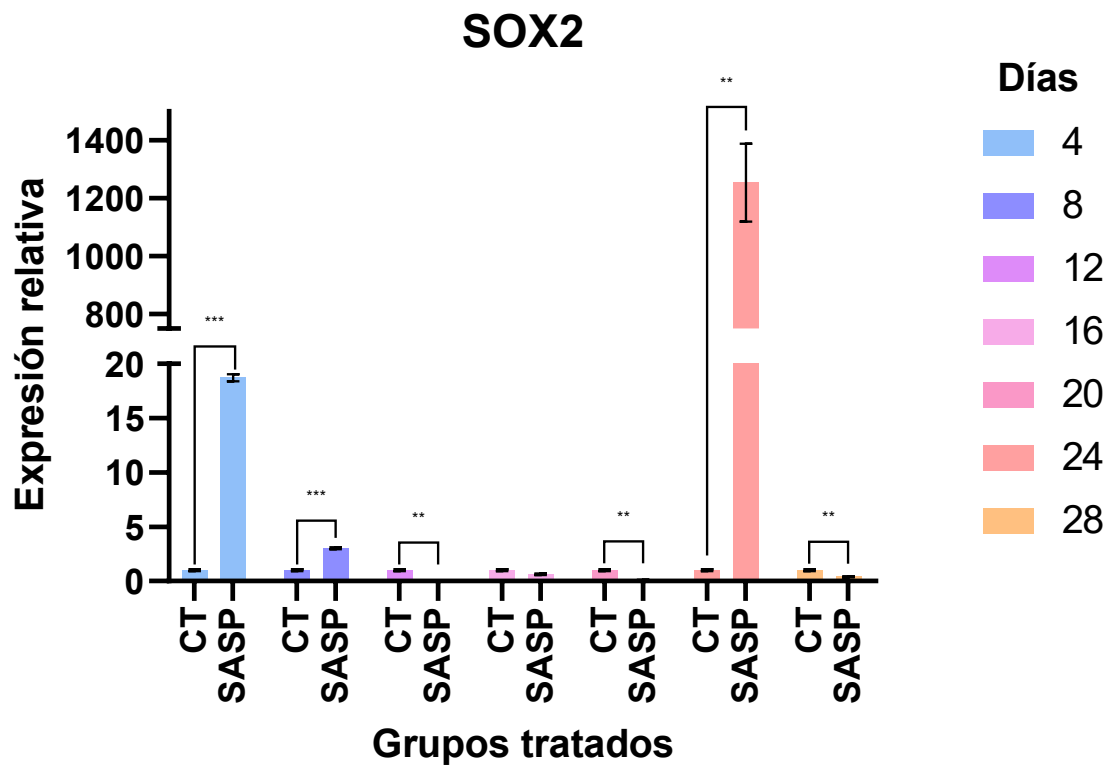


Figura 14. Expresión relativa del marcador de pluripotencia SOX2 en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP (SASP) en periodos de 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 días de incubación. Valor $p < 0.05$ (*), $p < .01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns). *Fuente:* Elaboración propia empleando GraphPad Prism 8.

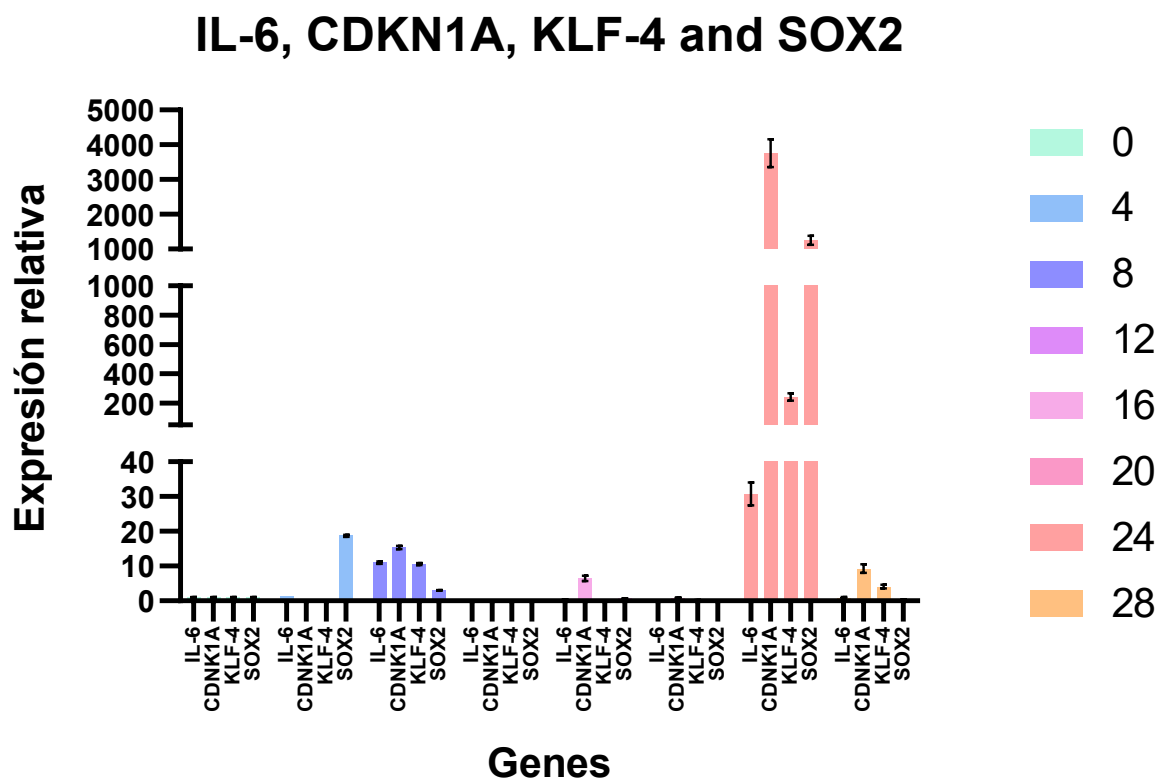


Figura 15. Expresión relativa de los marcadores de senescencia (*IL6* y *CDKN1A*) y de pluripotencia (*KLF4* y *SOX2*) en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP (SASP) en periodos de 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 días de incubación. *Fuente: Elaboración propia empleando GraphPad Prism 8.*

En cuanto a la morfología, se pudo observar una drástica diferencia en cuanto a la forma y tamaño de las células. En la Figura 16 se ven las células IMR-90 sin exposición al SASP, estos presentan una morfología típica de fibroblastos con su característica forma de bastones alargados con extremidades finas y en la Figura 17 se puede ver en detalle el cambio morfológico del día 24 de exposición al SASP,

donde las células tienen aspecto circular, son más pequeñas, se presentan en una menor densidad y en agrupaciones de 2 a 10 células.



Figura 16. Morfología de los fibroblastos IMR-90 sin tratamiento. *Fuente: Elaboración propia.*



Figura 17. Morfología de los fibroblastos IMR-90 después de 24 días expuestas a SASP. *Fuente: Elaboración propia.*

Adicionalmente, una vez determinado el día 24 tratado con SASP como el punto temporal donde se observaba un pico en los marcadores de pluripotencia y senescencia se evaluó el efecto de la cordicepina sobre estos dos procesos celulares una vez establecidos y en el día 28 se realizaron nuevamente extracciones de ARN para repetir el análisis. Los resultados de esta etapa indicaron claramente que el tratamiento con cordicepina redujo significativamente la expresión de marcadores asociados tanto a senescencia como a pluripotencia, mostrando efectos similares al emplearse individualmente o en combinación con el medio condicionado de senescencia. Esto se observa detalladamente en las Figuras 18, 19, 20 y 21, donde se muestran diferencias significativas entre los tratamientos en todos los marcadores analizados.

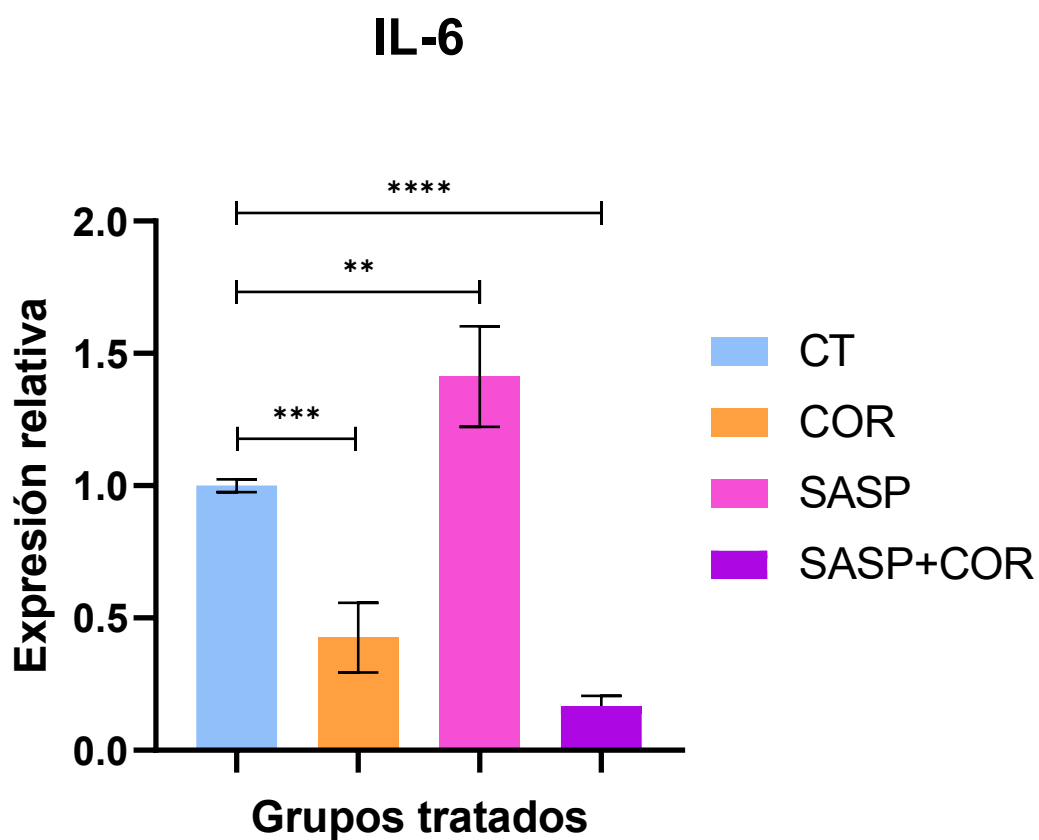


Figura 18. Expresión relativa del marcador de senescencia *IL6* en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP al 25% (SASP), cordicepina a 20 μ M (COR) y un grupo con ambos (SASP + COR) en un periodo de incubación de 4 días (del día 24 al 28). Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns). *Fuente: Elaboración propia empleando GraphPad Prism 8.*

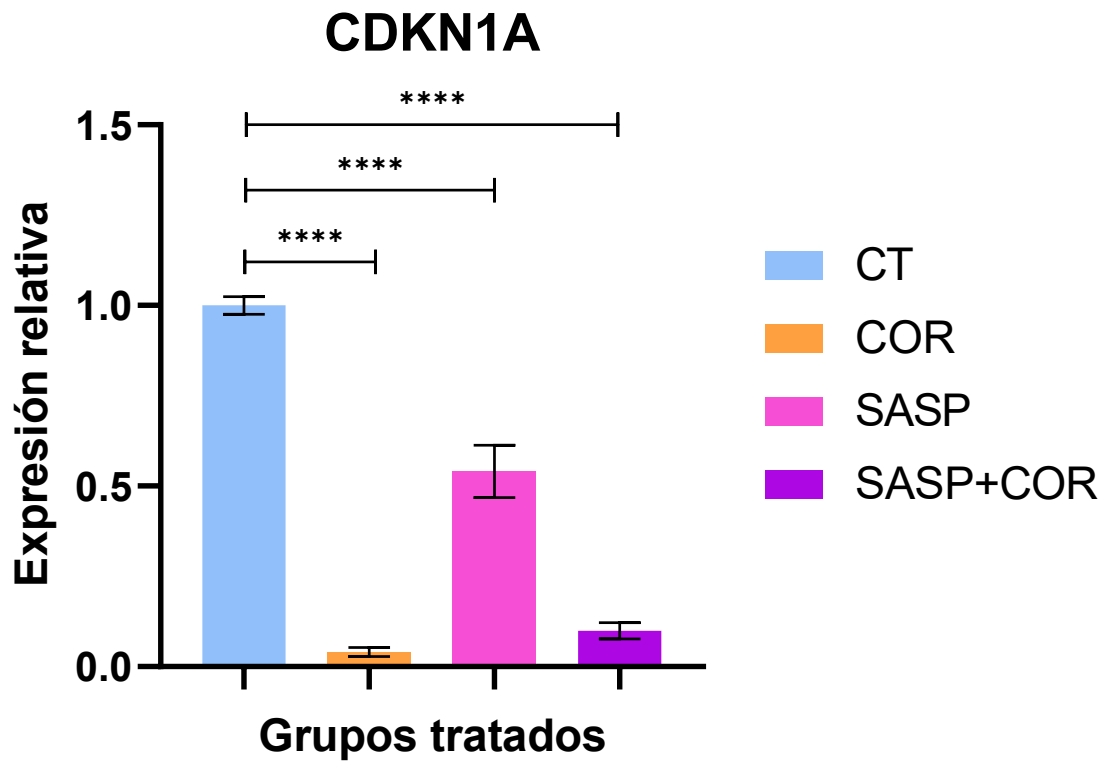


Figura 19. Expresión relativa del marcador de senescencia *CDKN1A* en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP al 25% (SASP), cordicepina a 20 μ M (COR) y un grupo con ambos (SASP + COR) en un periodo de incubación de 4 días (del día 24 al 28). Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns). *Fuente: Elaboración propia empleando GraphPad Prism 8.*

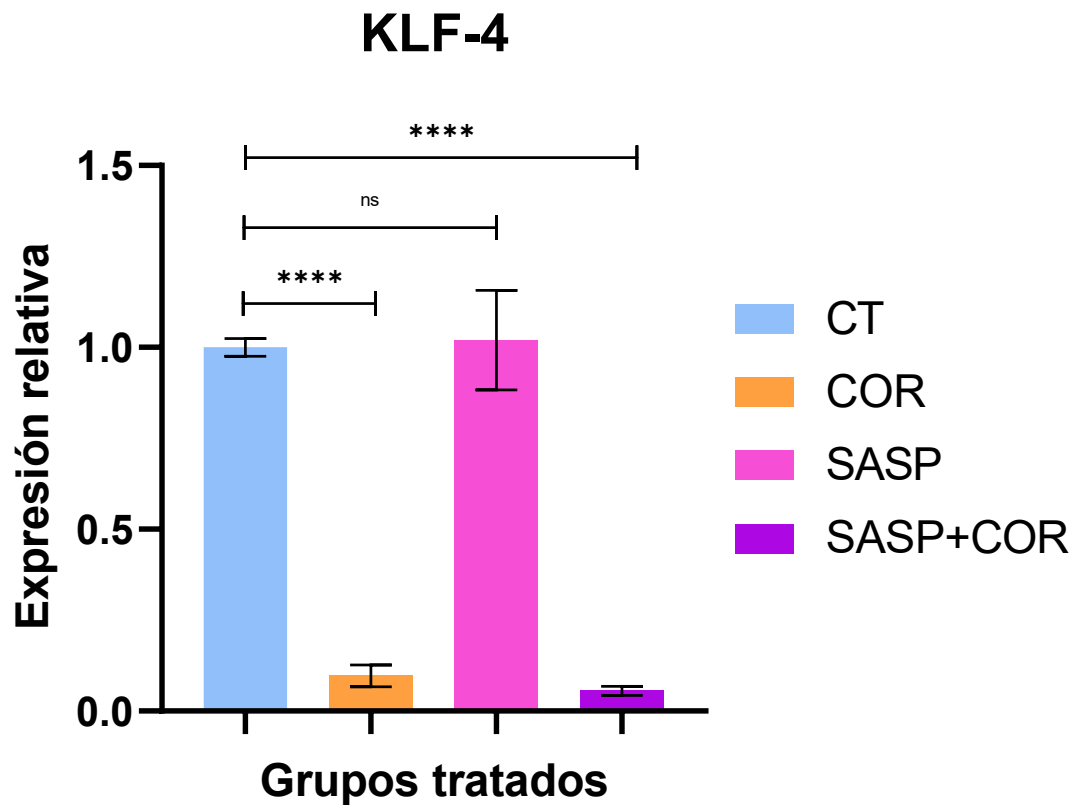


Figura 20. Expresión relativa del marcador de pluripotencia *KLF4* en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP al 25% (SASP), cordicepina a 20 μ M (COR) y un grupo con ambos (SASP + COR) en un periodo de incubación de 4 días (del día 24 al 28). Valor $p < 0.05$ (*), $p < .01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns). *Fuente: Elaboración propia empleando GraphPad Prism 8.*

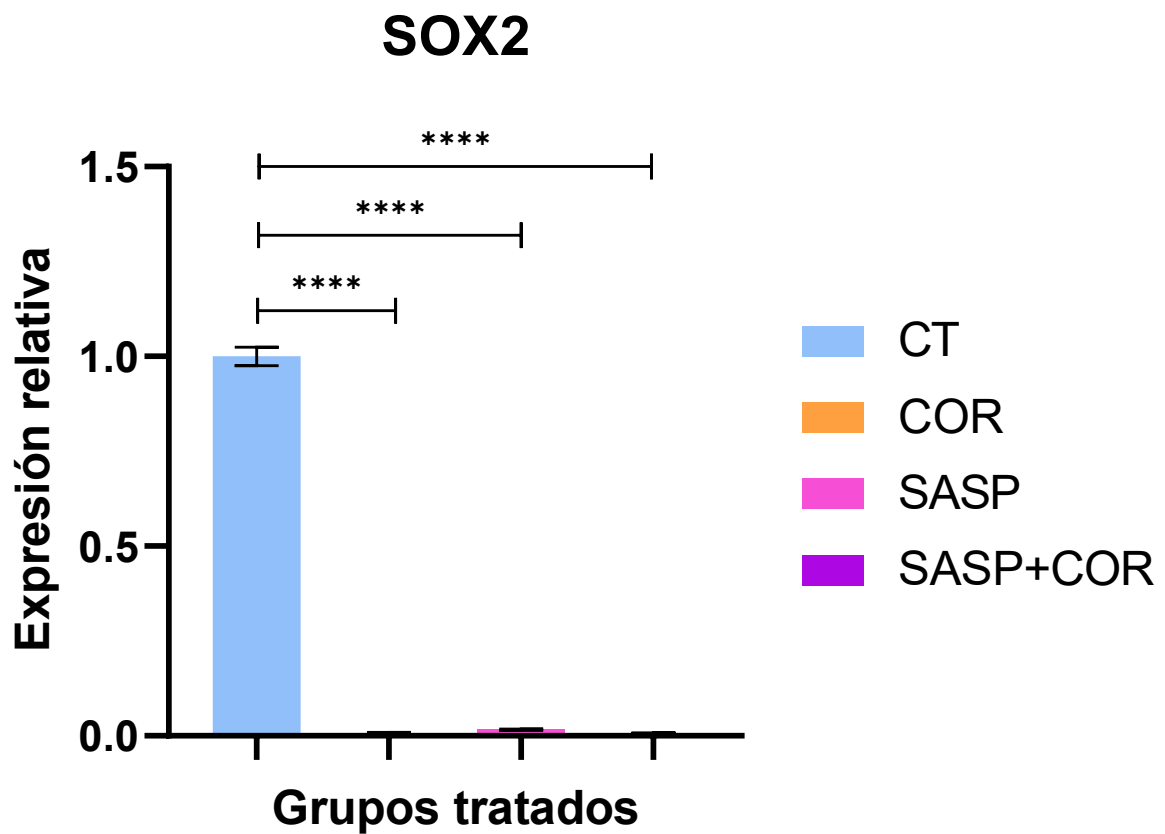


Figura 21. Expresión relativa del marcador de pluripotencia SOX2 en los fibroblastos IMR-90 no expuestos (CT) y expuestos a SASP al 25% (SASP), cordicepina a 20 μ M (COR) y un grupo con ambos (SASP + COR) en un periodo de incubación de 4 días (del día 24 al 28). Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns). *Fuente: Elaboración propia empleando GraphPad Prism 8.*

El patrón de expresión de *IL6* y *CDKN1A* describe una dinámica temporal precisa de la senescencia, con un pico en el día 24 y una disminución posterior en el día 28 (Figura 15). Estos datos sugieren que la senescencia inducida podría representar un estado transitorio antes de la restauración parcial de la proliferación o la adquisición de plasticidad celular. Tanto *IL6*, un regulador clave del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP), y *CDKN1A*, el cual codifica a p21, un inhibidor del ciclo celular, parecen actuar en conjunto para modular este proceso.

Curiosamente, la expresión de *KLF4* y *SOX2*, factores esenciales en la pluripotencia, sigue una tendencia paralela a la de los marcadores de senescencia. Este fenómeno concuerda con estudios previos que han sugerido que la reprogramación celular puede estar precedida por un estado de senescencia transitoria, facilitando la plasticidad celular mediante modificaciones en la cromatina y la activación de vías de señalización como Wnt/ β -catenina, Hippo y Notch⁴⁹. La coincidencia entre el pico de expresión de estos marcadores sugiere la existencia de una ventana óptima para la conversión celular.

La cordicepina, cuya evaluación se realizó en días tardíos (24 en adelante) del proceso de desdiferenciación, mostró un efecto significativo en la modulación de la senescencia y la pluripotencia en fibroblastos IMR-90 expuestos a SASP. La reducción en la expresión de *IL6* y *CDKN1A* sugiere que la cordicepina puede mitigar la inflamación asociada a la senescencia, posiblemente a través de la regulación epigenética y la modulación de vías de señalización como AMPK/mTOR y NF- κ B tal como lo reportado en la literatura¹²⁹.

La disminución de *KLF4* y *SOX2* en presencia de cordicepina sugiere una posible modulación del estado pluripotente, aunque se requieren estudios adicionales para determinar si esto refleja un cambio funcional hacia la diferenciación. Estudios previos han indicado que ciertos nucleósidos análogos pueden influir en la estabilidad del mRNA y la metilación del ADN¹³⁰, lo que podría explicar su impacto en este modelo experimental. Este hallazgo contrasta con estudios previos donde se ha descrito que la cordicepina puede mantener o incluso potenciar la pluripotencia en células madre embrionarias o mesenquimales a través de la activación de rutas como Jak2/STAT3, el aumento en los factores de pluripotencia⁴⁷ y el incremento de SIRT1⁷¹.

No obstante, en nuestro estudio no fue posible establecer si la disminución observada se relaciona directamente con la modulación de SIRT1, ya que no se evaluó su expresión ni actividad de manera específica. A pesar de esta limitación, es importante considerar que existen mecanismos previamente descritos mediante los cuales la cordicepina puede ejercer efectos en la regulación de la pluripotencia y la senescencia. Entre ellos destacan la activación de las vías AMPK¹²⁹, MAPK¹³¹ y otras rutas asociadas al metabolismo energético y la respuesta al estrés celular⁷⁰. Estos mecanismos podrían haber influido en la respuesta observada, promoviendo un entorno más proclive a la diferenciación o pérdida de plasticidad celular en lugar de mantener un fenotipo pluripotente¹³². Así, nuestros resultados subrayan la necesidad de profundizar en el análisis de contexto, dosis y tipo celular al interpretar los efectos de cordicepina sobre la identidad celular y su potencial aplicación en estrategias de reprogramación.

Es importante señalar que este estudio tiene ciertas limitaciones que deben tomarse en cuenta. Una de ellas es que no se revisó si las células desdiferenciadas lograron mantener su fenotipo durante más tiempo o si, en algún momento, podrían regresar a un estado senescente o menos diferenciado. Además, no se sabe si el efecto observado con cordicepina es exclusivo de los fibroblastos IMR-90, pues no se hicieron pruebas en otros tipos celulares, lo que limita el alcance de las conclusiones. Otro punto es que el análisis se basó solo en la expresión de algunos genes seleccionados y no incluyó estudios que confirmaran si esas células pueden adquirir funciones nuevas o comportamientos distintos. Por eso, cualquier idea sobre su posible aplicación necesita comprobarse con estudios funcionales más específicos, ya sea en cultivo o en modelos animales.

5.4. Resultados del proceso de diferenciación

Al realizar el análisis de la expresión relativa del día 4, sólo se obtuvieron triplicados para realizar una comparación entre *MAFB* del grupo control y el grupo tratado con moléculas pequeñas para diferenciarse a células similares a β -pancreáticas. En este análisis se observó un aumento de 2.56 del grupo tratado comparado con el grupo control. Esto se puede observar en la Figura 22.

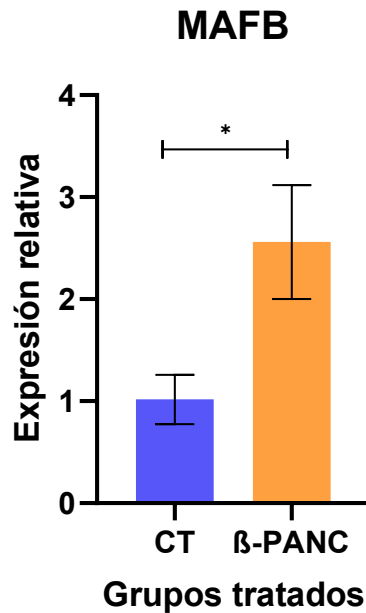


Figura 22. Expresión relativa del marcador de células similares a β -pancreática *MAFB* en los fibroblastos IMR-90 desdiferenciados de 24 días (CT) y diferenciados (β -PANC) con un periodo de incubación de 4 días. Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns).
Fuente: Elaboración propia empleando GraphPad Prism 8.

No se contó con el triplicado técnico debido a un error metodológico y, posteriormente, una cantidad insuficiente de muestra para realizar nuevamente el ensayo de qPCR del grupo control del día 4, por lo tanto, no se pudo realizar una comparación de la expresión relativa del gen *NEUROG3* del grupo tratado con moléculas pequeñas para diferenciarse a células similares a β -pancreáticas del mismo día. Sin embargo, se pudo realizar una comparación de la expresión relativa del mismo grupo tratado usándolo como control para observar los cambios en el

grupo tratado del día 8. En el cual se observó una expresión relativa de 9,092,692.90 veces en el día 8 comparado con el día 4 entre los grupos tratados para diferenciarlas a β -pancreáticas. Esto se puede observar en la Figura 23.

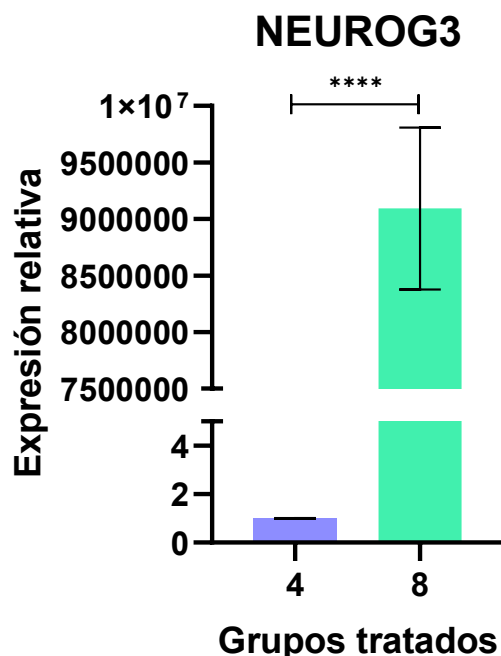


Figura 23. Expresión relativa del marcador de células similares a β -pancreática *NEUROG3* en los fibroblastos IMR-90 diferenciados por 4 días (4) y por 8 días (8). Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns). *Fuente: Elaboración propia empleando GraphPad Prism 8.*

Finalmente, comparamos los CT del grupo tratado hacia células β -pancreáticas del día 12 contra el mismo grupo del día 4. Obteniendo una expresión relativa de 21,626,190.19 veces más para el día 12 comparado con el día 4 del mismo tratamiento (Figura 24).

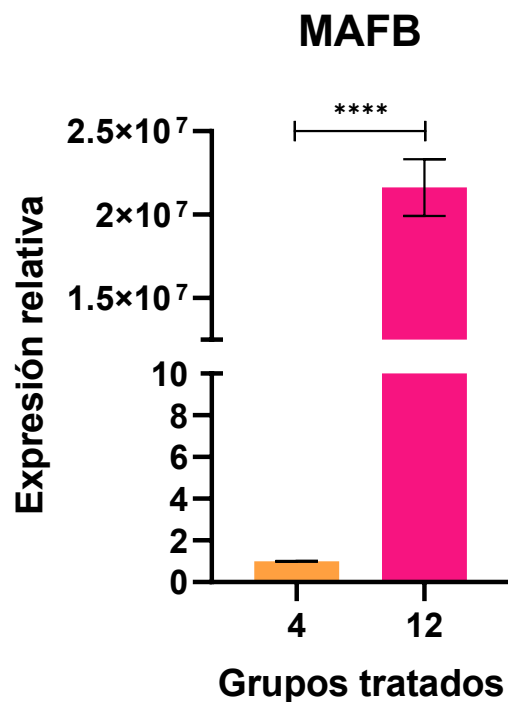


Figura 24. Expresión relativa del marcador de células similares a β -pancreática *MAFB* en los fibroblastos IMR-90 diferenciados por 4 días (4) y por 12 días (12). Valor $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) y para $p > 0.05$ sin significancia estadística (ns). *Fuente: Elaboración propia empleando GraphPad Prism 8.*

La diferenciación hacia células β pancreáticas se acompaña de un aumento significativo en la expresión de *NEUROG3* y *MAFB*, ambos reguladores clave en la ontogenia del páncreas endocrino¹³³. La naturaleza transitoria de *NEUROG3*, cuya expresión cesa en el día 12, indica una transición parcial hacia el linaje β , en línea con hallazgos previos en el desarrollo pancreático⁹⁶.

En cuanto a la morfología de las células diferenciadas, se observó un fenotipo similar a células epiteliales, con una forma esférica, pero también se detectó la presencia de fenotipos con similitudes neuronales como se muestra en la Figura 25.

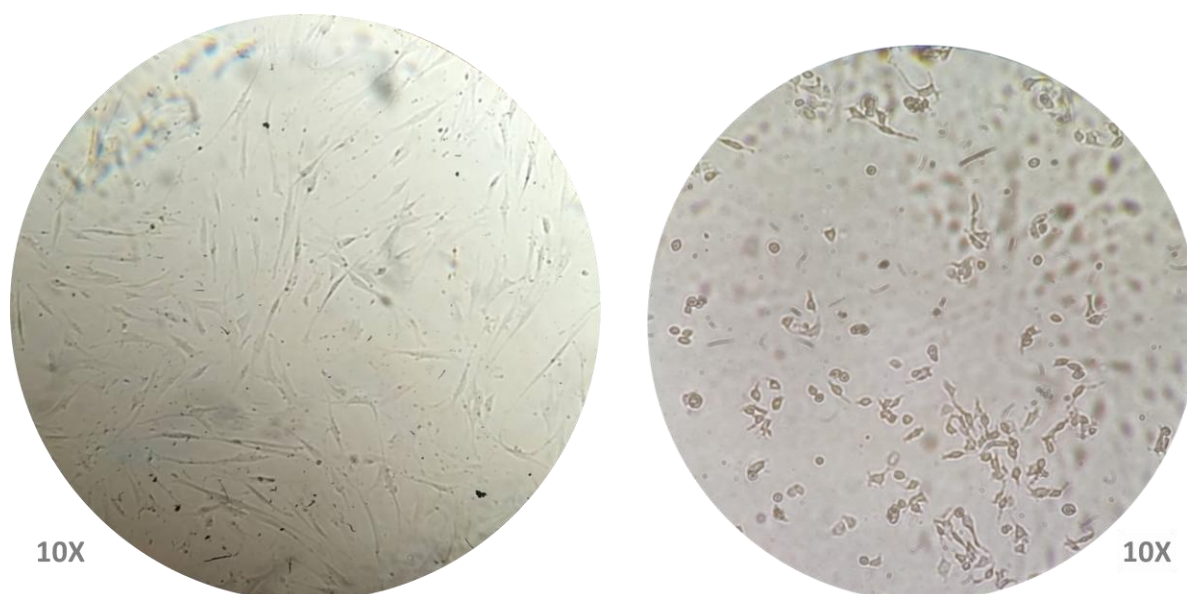


Figura 25. Apariencia de células en un posible proceso de diferenciación hacia un fenotipo similar a β -pancreáticas a partir de células desdiferenciadas con 24 días expuestas a SASP. *Fuente: Elaboración propia.*

El presente trabajo propuso un protocolo simplificado de seis fases para inducir la diferenciación de fibroblastos humanos IMR-90 hacia un fenotipo similar al de células β -pancreáticas en un periodo de 16 días. Si bien se observó un patrón de expresión compatible con una transición parcial hacia dicho linaje, particularmente con el aumento de la expresión de *MAFB* y la transitoriedad de *NEUROG3*, estos hallazgos deben interpretarse con cautela al contrastarlos con protocolos consolidados y más extensos, como el descrito por Hoglebe et al. (2021)⁷⁷.

Una de las principales diferencias metodológicas radica en la duración total del protocolo. Mientras que nuestro esquema culmina en poco más de dos semanas, el protocolo de Hoglebe emplea alrededor de cinco semanas para completar el proceso de diferenciación y maduración de células madre pluripotentes humanas hacia células β funcionales. Esta diferencia temporal permite una maduración más robusta y sostenida en los modelos descritos por Hoglebe, lo cual se traduce en células capaces de secretar insulina en respuesta a glucosa y revertir la hiperglucemia en modelos murinos, lo cual no fue evaluado en nuestro modelo.

En términos de expresión génica, nuestros resultados muestran que *NEUROG3* presenta una expresión elevada en el día 8, pero deja de ser detectable en el día 12. Esta transitoriedad es coherente con lo descrito en el desarrollo pancreático y también reportada por Hoglebe, quien destaca que la activación temporal de *NEUROG3* es esencial para la especificación endocrina. No obstante, en nuestro sistema no se evidenció la coexpresión de factores clave como NKX6-1 y PDX1, lo cual probablemente se debió a limitaciones metodológicas, particularmente relacionadas con el tiempo de diferenciación. En el protocolo de Hoglebe, la expresión secuencial y sostenida de estos factores resulta indispensable para restringir el destino celular hacia una identidad β monohormonal funcional. La ausencia de estos marcadores impide confirmar si la activación de *NEUROG3* en nuestro modelo llevó a una especificación efectiva del linaje pancreático.

Respecto a *MAFB*, su expresión en el día 12 sólo fue detectable en células tratadas, mientras que estuvo ausente en el grupo control. Esto sugiere un efecto diferencial atribuible al tratamiento con moléculas pequeñas. No obstante, el hecho de que *MAFB* también se exprese en estados inmaduros de células β implica que este hallazgo, aunque prometedor, no es suficiente por sí solo para afirmar una diferenciación funcional completa.

Otro contraste relevante es la falta de evaluación funcional en nuestro estudio. Mientras que Hoglebe *et al.* incluyen pruebas de secreción de insulina, índice de proinsulina/insulina y ensayos dinámicos de respuesta a glucosa, en este trabajo no fue posible realizar dichas evaluaciones debido a limitaciones en la viabilidad celular en etapas finales.

Finalmente, en términos morfológicos, aunque se observó una transición hacia una morfología epitelial con algunas características neuronales, esta heterogeneidad sugiere que el protocolo empleado puede inducir una plasticidad celular parcial, pero no una diferenciación dirigida y eficiente. Esto contrasta con la formación de agregados funcionales tipo islote en el protocolo de referencia, donde la especificación endocrina ocurre después de una cuidadosa modulación del citoesqueleto y bajo condiciones de cultivo optimizadas.

5.5. Resultados del análisis *in silico*

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la metodología *in silico* propuesta previamente.

5.5.1. Resultados del análisis *in silico* del posible mecanismo de acción de la cordicepina en procesos de diferenciación/desdiferenciación y senescencia celular.

Con el objetivo de profundizar en los mecanismos moleculares a través de los cuales la cordicepina podría modular la plasticidad celular, se llevó a cabo un análisis *in silico* integrando herramientas de química computacional, predicción de blancos y dinámica molecular. Particular atención se prestó a su forma trifosfatada (COR-TP), dado que estudios recientes han señalado que esta es una forma bioactiva relevante dentro del entorno tumoral y en células inmunes¹³⁴.

Los análisis estructurales y de acoplamiento molecular revelaron que COR-TP presenta una similitud considerable con ATP, tanto en términos de propiedades fisicoquímicas como de afinidad por sitios catalíticos enzimáticos. Destaca su potencial interacción con la enzima adenilato ciclasa, la cual desempeña un papel clave en la generación de AMPc y en la regulación de la diferenciación celular¹³⁵. En condiciones fisiológicas, esta enzima requiere del grupo hidroxilo en posición 3' del ATP para formar el nucleótido cíclico; sin embargo, COR-TP carece de dicho

grupo funcional, lo que sugiere que podría actuar como un análogo no funcional o "pseudo-ATP", interfiriendo con la producción de AMPc¹³⁶.

Esta hipótesis fue respaldada por simulaciones de dinámica molecular, en las que COR-TP mostró puntuaciones de afinidad comparables o incluso superiores a las de ATP al interactuar con isoformas solubles y transmembranales de adenilato ciclasa. Dado que la señalización mediada por AMPc regula no solo la diferenciación celular, sino también la senescencia e incluso la reprogramación epigenética en distintos contextos celulares, estos hallazgos ofrecen una posible explicación mecanística de los efectos pleiotrópicos de la cordicepina observados en modelos experimentales.

En los apartados siguientes se detallan los resultados específicos derivados de los estudios *in silico*, con énfasis en las posibles implicaciones de la inhibición de adenilato ciclasa por COR-TP y su impacto sobre rutas celulares dependientes de nucleótidos cíclicos, tales como la activación de PKA, CREB o EPAC, fundamentales en la regulación del destino celular.

Los resultados obtenidos sugieren claramente una posible intervención de la cordicepina en la regulación de vías de señalización mediadas por nucleótidos cíclicos, destacando particularmente la interacción con la enzima adenilato ciclasa. Esta enzima juega un papel fundamental en la diferenciación celular, activada por diversas moléculas inductoras de diferenciación como la forskolina¹³⁷. La importancia del mecanismo de señalización mediado por nucleótidos cíclicos es evidente por el empleo frecuente en protocolos experimentales de compuestos que

activan o inhiben fosfodiesterasas, tales como el 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), comúnmente empleados en medios destinados a inducir la diferenciación de células madre¹³⁸.

5.5.2. Evaluación de la similitud 2D y 3D para evaluar la similitud estructural de la cordicepina con metabolitos endógenos.

Se utilizó el servidor PubChem Score Matrix para evaluar la similitud estructural entre la cordicepina COR y sus derivados en relación con nucleósidos y nucleótidos endógenos, tanto en un nivel bidimensional (2D) como tridimensional (3D). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación estructural en 2D y 3D para evaluar la similitud estructural entre la cordicepina y sus derivados en relación con nucleósidos y nucleótidos endógenos. *Fuente: Adaptada de González-Llerena et. al., 2024.*¹³⁶

	COR-TP				COR-DP				COR-MP			
	TC	ST	CT	ComT	TC	ST	CT	ComT	TC	ST	CT	ComT
ATP	99	86	43	129	98	86	47	133	97	77	55	132
ADP	98	82	44	126	99	77	55	132	97	88	56	144
AMP	97	72	44	116	97	82	47	129	99	91	65	156
ADO	93	62	38	100	93	75	51	126	95	87	52	139
INO	73	59	14	73	73	69	23	92	74	87	29	116
	COR				3'-dINO				ADO			

	TC	ST	CT	ComT	TC	ST	CT	ComT	TC	ST	CT	ComT
ATP	92	66	45	111	73	60	19	79	93	67	56	123
ADP	93	75	50	125	73	75	29	104	94	73	60	133
AMP	94	85	58	143	74	82	25	107	95	88	67	155
ADO	98	98	85	183	77	98	52	150	100	100	100	200
INO	77	98	52	150	99	94	63	157	78	89	34	123

Los valores del TC oscilan entre 0 y 100, donde 100 indica una similitud máxima en 2D. Como era previsible, la comparación entre COR y ADO arrojó un TC de 98, mientras que las comparaciones entre COR-MP/AMP, COR-DP/ADP y COR-TP/ATP alcanzaron un TC de 99. De manera similar, la evaluación entre inosina (INO) y 3'-dINO obtuvo un valor de TC de 99.

No obstante, se observó una disminución en los valores del TC al comparar 3'-dINO con ADO (TC de 77) e INO con ADO (TC de 78), lo que sugiere una mayor divergencia estructural en estos pares de comparación en relación con los derivados fosforilados de la cordicepina. Dado que los nucleósidos no solo difieren en la ausencia del grupo hidroxilo en la posición 3', sino también en la base nitrogenada (hipoxantina en la inosina y adenina en la adenosina), esta variabilidad estructural influye en su similitud química. En este sentido, el coeficiente de Tanimoto (TC) experimenta una disminución significativa cuando la composición de las bases nitrogenadas difiere, lo que indica un menor grado de semejanza molecular. No obstante, aunque la ausencia del grupo hidroxilo tiene un impacto limitado en la similitud estructural bidimensional, su capacidad para participar en enlaces de

hidrógeno puede modificar las interacciones con dianas biológicas, afectando así su reconocimiento y afinidad molecular. El parámetro ST se enfoca en la forma y la orientación espacial que pueden adoptar las moléculas, mientras que el CT evalúa características químicas distintivas, como la presencia de anillos aromáticos, grupos funcionales similares y la capacidad de donar o aceptar enlaces de hidrógeno.

A partir de los valores de ST y CT obtenidos, se calculó el parámetro Combo T, resultado de la suma de ambos, cuyo rango oscila entre 0 y 200. Según la literatura, se considera que valores superiores a 80 para ST, 50 para CT y 130 para Combo T representan una similitud estructural aceptable. Los resultados indican que la COR y sus derivados mantienen valores elevados de similitud tridimensional en comparación con los metabolitos endógenos.

En particular, la comparación entre COR y ADO arrojó un ST de 98, un CT de 85 y un Combo T de 183. Para COR-MP y AMP, se registró un ST de 91, un CT de 65 y un Combo T de 156. De manera similar, la comparación COR-DP/ADP mostró un ST de 77, un CT de 55 y un Combo T de 132, mientras que COR-TP/ATP presentó un ST de 86, un CT de 43 y un Combo T de 129. Estos datos reflejan una alta similitud estructural entre COR y ADO, tanto en su forma nucleósido como nucleotídica, evidenciando la conservación de la estructura y las características funcionales clave.

En cuanto a la comparación entre INO y 3'-dINO, se obtuvo un ST de 94, un CT de 63 y un Combo T de 157. Por otro lado, la evaluación de 3'-dINO frente a ADO arrojó un ST de 98, un CT de 52 y un Combo T de 150, siendo este último valor

superior al obtenido para la comparación entre inosina y adenosina (ST de 89, CT de 34 y Combo T de 123). Esto es congruente con datos experimentales que indican que la cordicepina y sus metabolitos pueden ser reconocidos por las mismas dianas que identifican ligandos endógenos de estructura similar^{139–141}.

5.5.3. Comparación fisicoquímica de la cordicepina y sus derivados frente a los derivados de purinas.

El análisis de agrupamiento jerárquico entre COR-TP y los metabolitos incluidos en la base de datos permitió la identificación de ocho clústeres (Figura 26). El clúster 1 representó el 9.21% de la distribución total e incluyó GDP, ADP, IDP, ATP, GTP, ITP y COR-TP, caracterizados por ser nucleótidos purínicos con dos o tres grupos fosfato. Por otro lado, el clúster 2, con una distribución del 17.11%, estuvo conformado por nucleótidos purínicos monofosforilados, como IMP, AMP, GMP, AMPc y GMPc. No obstante, este clúster también incluyó nucleósidos purínicos (ADO, INO y GUA), intermediarios glucolíticos (GLU, G6P, F6P y F1,6BP) y L-ASS.

El clúster 3, con una distribución del 1.32%, estuvo constituido únicamente por PAL, el único ácido graso presente en la base de datos, el cual se diferenció notablemente del resto de los metabolitos. El clúster 4, con una representación del 10.53%, agrupó intermediarios de la glucólisis (DHAP, G3P, 1,3BPG, 3PG), del ciclo de Krebs (MAL, ISOCITR, CITR) y GLI3P.

El clúster 5, con un porcentaje del 18.42%, comprendió metabolitos involucrados en el metabolismo de la creatina y el ciclo de la urea, incluyendo L-CAR, L-ORN, L-LYS, PUT, CAD, AGM, SPD, SPR, ADMA, L-CIT, SDMA, L-ARG, NG-MMA y L-HARG.

El clúster 6 representó el 17.10% de la distribución total y mostró una composición heterogénea, integrando compuestos provenientes del metabolismo de aminoácidos, glucosa, creatina y poliaminas, así como intermediarios del ciclo de la urea y del ciclo de Krebs (L-TYR, L-KYN, L-TRP, L-PHE, FUM, CP, PEP, PYR, ACETO, OXA, SUCC, KETOG).

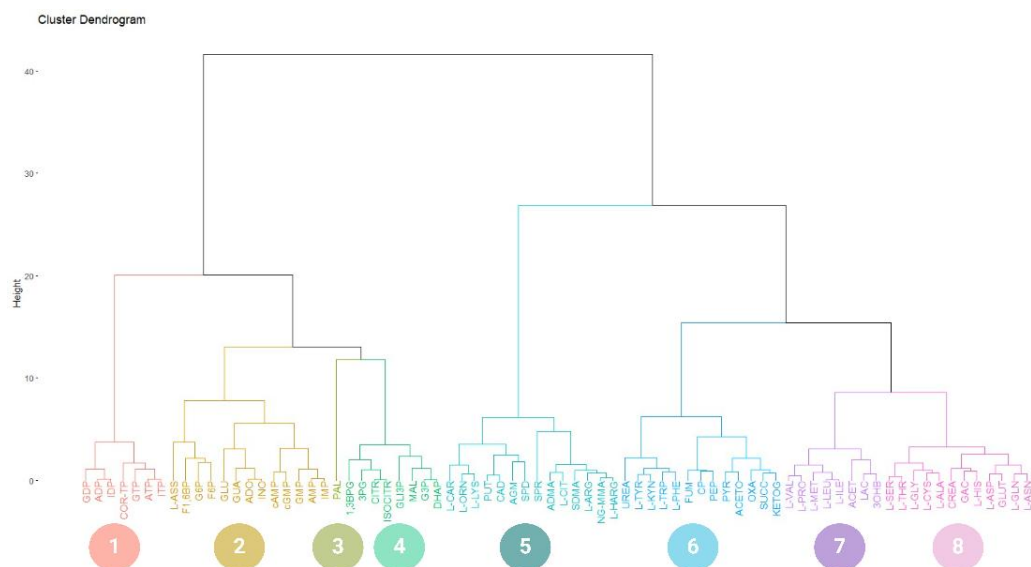
El clúster 7, con un 10.53% de distribución, incluyó principalmente compuestos derivados del metabolismo de aminoácidos, intermediarios glucolíticos y cuerpos cetónicos, tales como L-VAL, L-PRO, L-MET, L-LEU, L-ILE, ACET, LAC y 3OHB. Finalmente, el clúster 8, con una representación del 15.79%, estuvo constituido por compuestos relacionados con el metabolismo de aminoácidos y creatina, incluyendo L-SER, L-THR, L-GLY, L-CYS, L-ALA, CREA, GAC, L-HIS, L-ASP, GLUT y L-ASN.

Además, se realizaron agrupamientos adicionales para los demás derivados de la cordicepina, observándose los mismos ocho clústeres con ligeras variaciones. Los cambios registrados se presentaron en el clúster de interés, el cual variaba en función de las características particulares de cada molécula. Por ejemplo, COR-DP se agrupó con ADP, GDP e IDP; COR-MP fue clasificado junto con AMP, GMP, IMP, cAMP y cGMP. Por su parte, la cordicepina se agrupó con ADO, GUA e INO,

mientras que 3'-dINO se agrupó con GUA, ADO e INO. Todos los metabolitos se agruparon correctamente en función del número de grupos fosfato presentes en su estructura.

Cabe destacar que 3'-dINO solo difiere de la cordicepina en la base nitrogenada, lo que explica su agrupamiento con el mismo conjunto de compuestos. De manera particular, la clasificación de COR-MP es especialmente relevante debido a su comportamiento en los agrupamientos.

En concordancia con estos hallazgos, los resultados de este análisis evidencian que los derivados de la cordicepina, en función de sus propiedades fisicoquímicas, pueden presentar una relación estructural con los metabolitos endógenos.



5.5.4. Predicción de blancos moleculares según las características estructurales de la cordicepina y sus derivados.

Los resultados obtenidos indicaron que los derivados de COR muestran afinidad por blancos moleculares asociados con los sistemas purinérgico y

adenosinérgico, así como con enzimas clave del metabolismo de nucleótidos y sus vías de reciclaje. Además, se identificaron interacciones potenciales con cinasas específicas y enzimas como la ADN polimerasa y el adenilato ciclasa soluble (sAC).

Estos hallazgos son congruentes con las similitudes estructurales 2D y 3D, así como con las propiedades fisicoquímicas previamente determinadas. En particular, las dianas identificadas interactúan con ligandos endógenos como la adenosina (ADO), el monofosfato de adenosina (AMP), el difosfato de adenosina (ADP) y el trifosfato de adenosina (ATP), además de otras moléculas relacionadas con nucleótidos, como la S-adenosilmetionina (SAM).

5.5.5. Análisis comparativo de la afinidad y modos de unión de la cordicepina y sus derivados con blancos endógenos.

Con el propósito de evaluar si las similitudes fisicoquímicas y la predicción de blancos moleculares previamente obtenidas se traducían en afinidades comparables entre los derivados de cordicepina y los derivados de adenosina (ADO), se llevó a cabo un estudio de acoplamiento molecular (docking). Los resultados obtenidos, que reflejan los puntajes de acoplamiento de la cordicepina, sus derivados y los metabolitos endógenos con sus respectivos blancos, se presentan en la Figura 27.

En términos generales, el análisis de acoplamiento molecular evidenció afinidades comparables entre los derivados de COR y ADO en una variedad de

blancos moleculares. Por ejemplo, en el sitio 1 de la enzima adenosina quinasa (ADK), se registraron valores de -6.24 kcal/mol, -6.92 kcal/mol y -5.58 kcal/mol para ADO, COR y 3'-dINO, respectivamente. Mientras que en el sitio 2, los valores fueron de -4.25 kcal/mol, -5.56 kcal/mol y -5.23 kcal/mol para ADO, COR y 3'-dINO, lo que sugiere una posible ocupación de estos sitios activos por COR y 3'-dINO.

De manera similar, la evaluación de los receptores de adenosina (A_1R , $A_{2A}R$, $A_{2B}R$) mostró el mismo patrón de afinidad, lo que sugiere nuevamente que tanto COR como 3'-dINO podrían interactuar con estos receptores. Además, en la enzima adenosina desaminasa (ADA), se observaron valores de afinidad comparables entre ADO y COR, con puntajes de acoplamiento de -7.84 kcal/mol y -7.94 kcal/mol, respectivamente. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que los derivados de COR pueden ocupar sitios de unión relevantes en proteínas asociadas al metabolismo de nucleótidos y además, este hallazgo es consistente con estudios *in vivo* e *in vitro*, en los cuales se ha observado que la cordicepina es rápidamente convertida en 3'-desoxiinosina a través de esta enzima¹⁴².

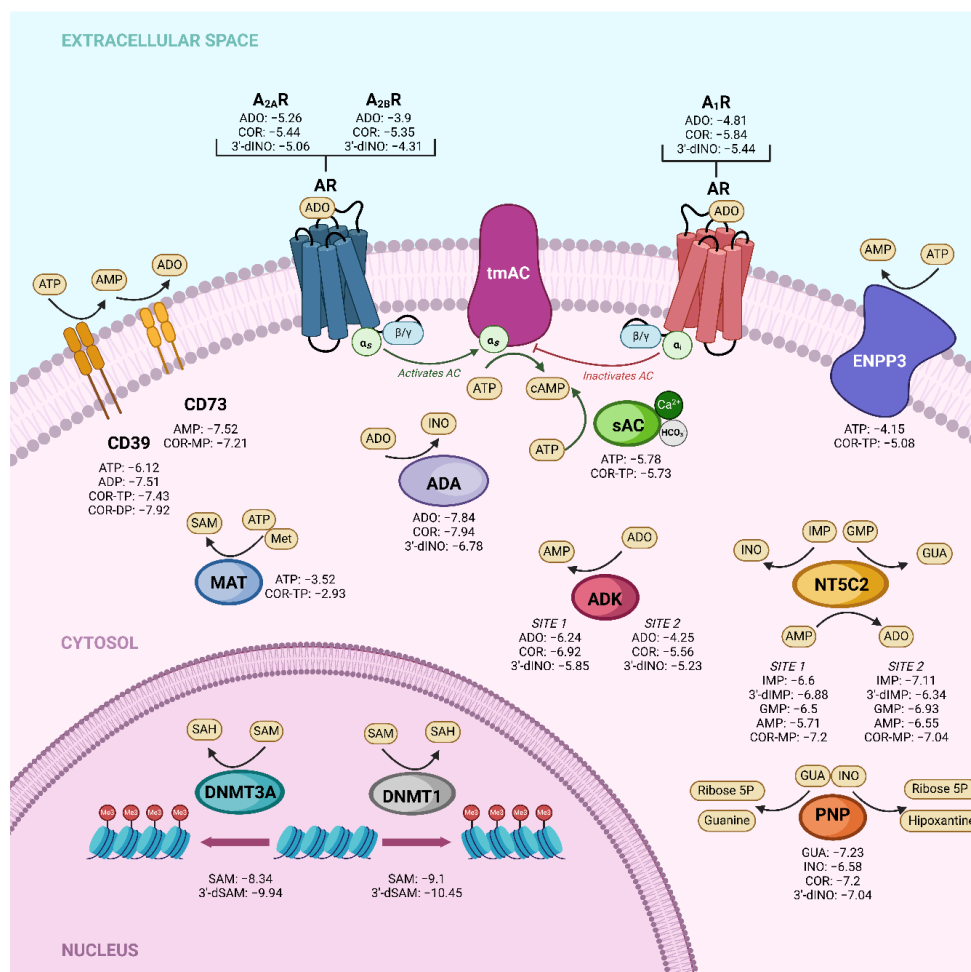


Figura 27. Puntuaciones de acoplamiento (kcal/mol) de diferentes dianas con COR y derivados comparados con afinidades de metabolitos endógenos. *Fuente: Adaptada de González-Llerena et. al., 2024¹³⁶.*

5.5.6. Evaluación de la afinidad de la cordicepina y sus derivados por enzimas que utilizan ATP como sustrato.

Para analizar la posible interacción de la cordicepina y sus derivados con enzimas que emplean ATP como sustrato, se evaluaron las afinidades de COR-TP

y ATP en relación con ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1 (CD39), pirofosfatasa/fosfodiesterasa de nucleótidos (ENPP3), metionina adenosil transferasa (MAT) y adenilato ciclasa soluble (sAC o ADCY10). Se seleccionó ADCY10 debido a su mecanismo catalítico de acción. Además, en el caso de CD39, se compararon los valores de acoplamiento molecular entre ADP y COR-DP, dado que ADP también puede actuar como sustrato de esta enzima (Figura 29).

Los resultados indicaron que, para CD39, ATP presentó una energía de acoplamiento de -6.12 kcal/mol, mientras que COR-TP obtuvo un valor de -7.43 kcal/mol. Asimismo, ADP mostró un valor de -7.51 kcal/mol y COR-DP de -7.92 kcal/mol, sugiriendo una posible interacción favorable con esta enzima. Para ENPP3, ATP registró una afinidad de -4.15 kcal/mol, en tanto que COR-TP presentó un valor de -5.08 kcal/mol. En el caso de MAT, ATP mostró una energía de acoplamiento de -3.52 kcal/mol, mientras que COR-TP exhibió un valor de -2.93 kcal/mol. Finalmente, en ADCY10, ATP obtuvo un puntaje de -5.78 kcal/mol y COR-TP de -5.73 kcal/mol, lo que sugiere una interacción potencialmente favorable entre esta enzima y COR-TP.

En conjunto, estos resultados derivados del estudio de acoplamiento molecular sugieren que la cordicepina y sus derivados podrían actuar como moléculas miméticas de la adenosina y sus derivados en procesos biológicos mediados por estas enzimas como lo reportado previamente en la literatura.

Además del análisis de afinidades, se examinaron los modos de unión entre COR y algunos de sus derivados, como 3'-dINO y COR-TP, en comparación con los

metabolitos endógenos ADO y ATP. El propósito de este análisis fue determinar si los modos de interacción de la cordicepina y sus derivados eran comparables a los de sus contrapartes endógenas. En la Figura 28 se ilustran los blancos para las moléculas no fosforiladas, mientras que la Figura 29 presenta los blancos para las moléculas fosforiladas.

En cuanto a las moléculas no fosforiladas, se evaluaron los modos de unión en los receptores de adenosina $A_{2A}R$ y $A_{2B}R$, además de la adenosina quinasa (ADK, sitio 1) y la adenosina desaminasa (ADA). En todos los casos, se observaron modos de unión comparables entre COR, 3'-dINO y el metabolito endógeno ADO. En el receptor $A_{2A}R$, ADO estableció enlaces de hidrógeno con los residuos Glu 169, Asn 253 y His 278 del sitio activo; COR mostró enlaces con Glu 169 y Asn 253, mientras que 3'-dINO formó enlaces con Asn 253 y Glu 169. Estos sitios de unión coinciden con los residuos de aminoácidos reportados en UniProt, que incluyen Glu 169, Asn 253, Ser 277 y His 278.

Para el receptor $A_{2B}R$, el ligando endógeno ADO estableció dos enlaces de hidrógeno con Asn 254, mientras que COR formó interacciones con Thr 89, Asn 186 y Asn 254, y 3'-dINO con Asn 254. Los residuos de aminoácidos reportados en UniProt para este receptor incluyen Glu 174, Asn 254, Ser 279 y His 280. Estos

hallazgos refuerzan la hipótesis de que la cordicepina y sus derivados pueden imitar la interacción de los nucleótidos endógenos en diversas dianas moleculares.

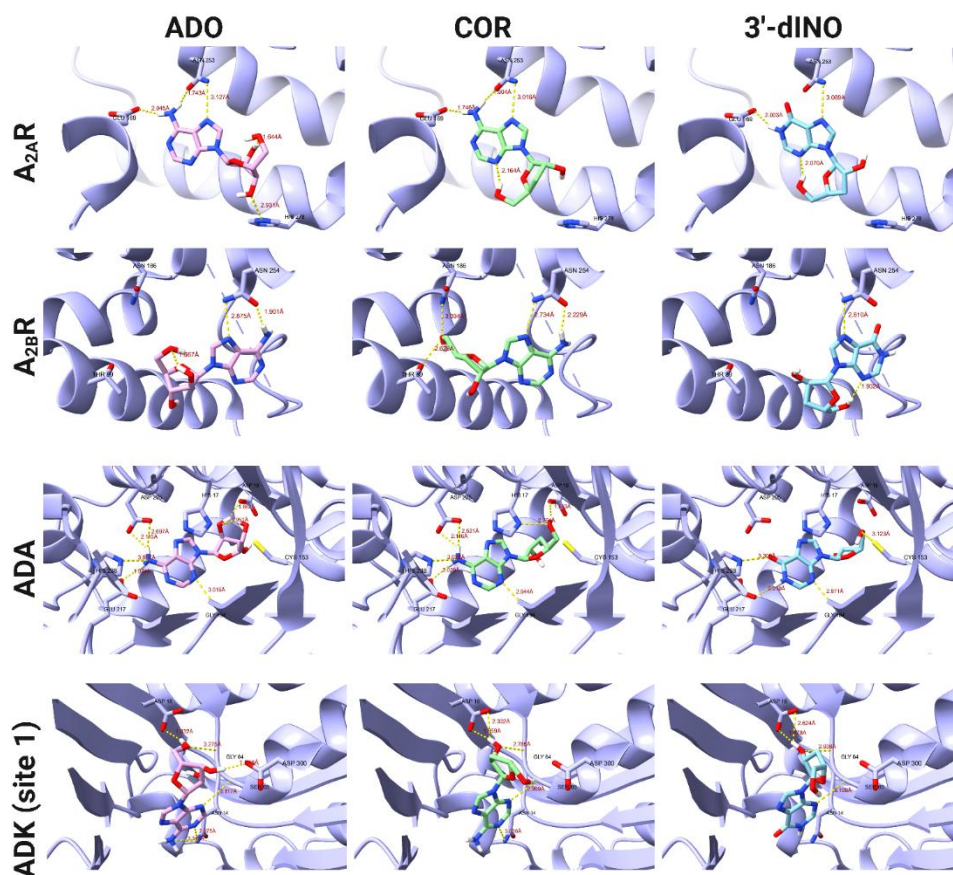


Figura 28. Modos de enlace de COR, 3'-dINO y ADO con diferentes objetivos como ADK (sitio 1), ADA, A_{2A}R y A_{2B}R. *Fuente: Adaptada de González-Llerena et. al., 2024¹³⁶.*

En el caso de la enzima ADA, el ligando endógeno ADO estableció enlaces de hidrógeno con Asp 19, Gly 184, Glu 217, His 238 y Asp 295. COR mostró interacciones con His 17, Asp 19, Gly 184, Glu 217, His 238 y Asp 295, mientras que 3'-dINO formó enlaces con Cys 153, Gly 184, Glu 217 y His 238. Estos resultados son consistentes con los residuos de aminoácidos reportados en UniProt, los cuales incluyen His 17, Asp 19, Gly 184, Glu 217 y Asp 295.

Por otro lado, los modos de unión de ATP y COR-TP en los blancos CD39, ENPP3 y sAC, así como de ADP y COR-DP en CD39, se presentan en la Figura 32. En la proteína CD39, ATP y COR-TP formaron enlaces de hidrógeno con Arg 93, Arg 113, Lys 143 y Thr 164, mientras que COR-TP también interactuó con Lys 161, Thr 237, Asp 242 y Glu 161. Se registraron un total de doce interacciones para COR-TP y ocho para ATP. En el caso de ADP y COR-DP, ambos establecieron enlaces con Arg 93, Arg 113, Lys 143 y Lys 161, mientras que COR-DP presentó interacciones adicionales con Tyr 237 y Thr 237.

El análisis de ENPP3 reveló que tanto ATP como COR-TP establecieron enlaces de hidrógeno con Asn 227, Asn 226 y Gln 244. Sin embargo, se observaron diferencias en la formación de enlaces, donde ATP interactuó con Lys 204 y COR-TP con Tyr 289 y His 329. UniProt reporta residuos interactuantes como Lys 204, Thr 205, Asn 226, Glu 275 y Tyr 289. Se registraron ocho interacciones para COR-TP y siete para ATP, con variaciones en los residuos involucrados.

En sAC, los modos de unión entre ATP y COR-TP fueron similares, compartiendo interacciones con Asp 99 y Arg 416, aunque COR-TP difería de ATP

en su interacción con Thr 52. De acuerdo con UniProt, se conservaron interacciones como Thr 52, Asp 99 y Arg 416. No obstante, la ausencia de iones de magnesio durante la simulación pudo generar desviaciones en la orientación y los modos de unión de los ligandos, afectando interacciones con residuos como Ser 49, Lys 144 y Val 406.

Dado que los estudios de acoplamiento molecular presentan ciertas limitaciones, como la rigidez de la proteína en la simulación y la ausencia de cofactores metálicos o moléculas de agua en el sitio de unión, se decidió validar estos resultados mediante una técnica más avanzada. Por ello, considerando ATP y COR-TP como ligandos, se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular en las isoformas soluble y transmembrana de la enzima adenilato ciclasa (AC).

5.5.7. Dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular constituyen una herramienta clave para evaluar la estabilidad estructural y el comportamiento conformacional de modelos proteicos en un entorno virtual que simula condiciones biológicas. Para garantizar la confiabilidad de estos modelos, se llevó a cabo un análisis exhaustivo de su calidad estructural, empleando herramientas como el diagrama de Ramachandran y el Z-score. La evaluación reveló que más del 90% de los residuos adoptaban conformaciones permitidas, lo que indica una adecuada estabilidad conformacional de los modelos generados mediante homología¹⁴³. Asimismo, el Z-

score confirmó que las estructuras obtenidas se encuentran dentro del rango aceptable en comparación con modelos cristalográficos, validando su idoneidad para los cálculos posteriores¹⁴⁴. A partir de estos modelos, se procedió a la construcción de los sistemas para su posterior relajación y análisis mediante simulaciones de dinámica molecular, cuyos resultados se presentan en la siguiente sección.

Tabla 4. Modelos obtenidos por modelización de homología y control de calidad.

Fuente: Adaptada de González-Llerena et. al., 2024¹³⁶.

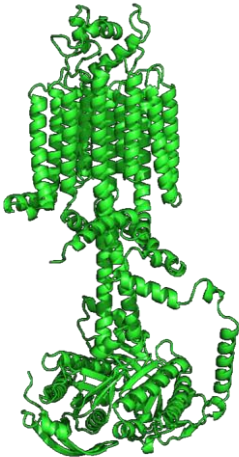
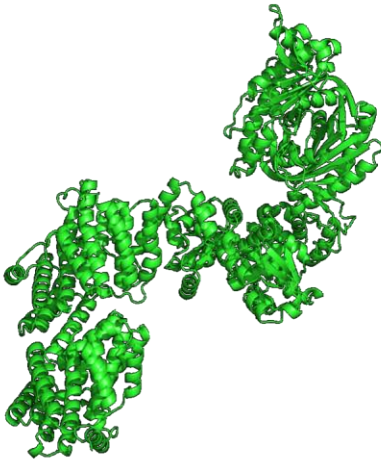
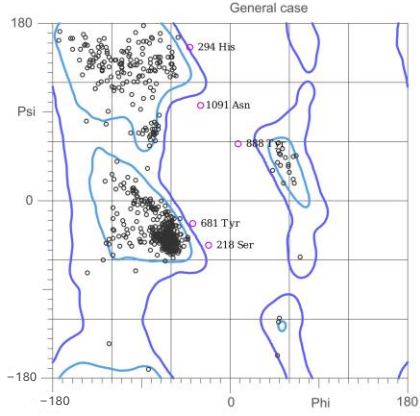
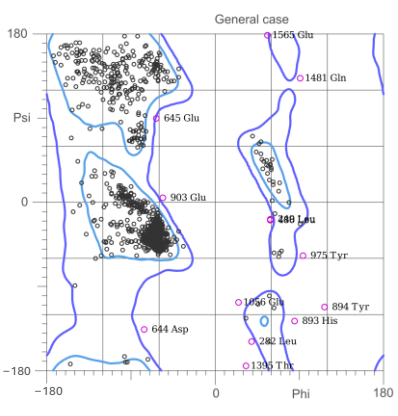
Sistema	Adenilato Ciclasa Tipo 05 (tmAC)	Adenilato Ciclasa Tipo 10 (sAC)
Modelo		
Rotámeros favorecidos	99.24%	99.45%

Diagrama de Ramachandran		
Regiones no permitidas de Ramachandran	0.75%	1.06%
Regiones favorecidas de Ramachandran	96.23%	96.39%
Z-score	0.95 ± 0.25	0.14 ± 0.20

5.5.8. Relajación de complejos mediante simulaciones de dinámica molecular

Una vez contruidos los complejos entre los nucleótidos y las enzimas, se sometieron a un proceso de relajación mediante simulaciones de dinámica molecular con una duración de 100 ns en un entorno de átomos completos. Este procedimiento permitió estabilizar las interacciones entre la proteína y el ligando, asegurando que las conformaciones adoptadas fueran representativas del estado dinámico del sistema. Como resultado de estas simulaciones, se obtuvo una

conformación estable (C1), considerada como la más relevante para el análisis estructural posterior. La Figura 30 ilustra la variación del RMSD a lo largo del tiempo, tanto para los complejos como para los ligandos, proporcionando información sobre la estabilidad conformacional alcanzada durante la simulación.

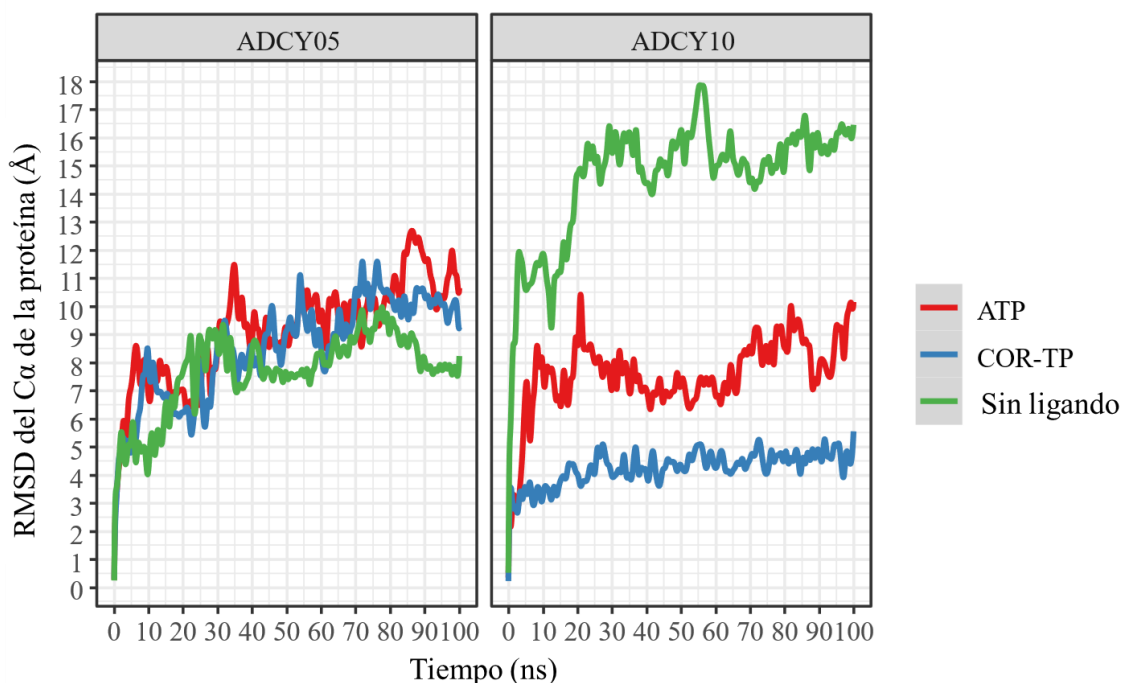


Figura 30. Variación del RMSD de los carbonos α en los complejos proteína-ligando en comparación con la proteína en estado libre. *Fuente: Adaptada de González-Llerena et. al., 2024¹³⁶.*

A pesar de las fluctuaciones aparentes, los sistemas que incluyen ADCY05 alcanzan la estabilidad a partir de los 50 ns, con cambios mínimos en el RMSD en presencia de los ligandos. En contraste, en ADCY10, el sistema libre muestra una mayor variabilidad en el RMSD en comparación con los complejos, siendo la menor

fluctuación conformacional observada en presencia de COR-TP. En todos los casos, las simulaciones de 100 ns resultaron suficientes para estabilizar los sistemas.

Adicionalmente, se identificó un cambio en la posición de los ligandos con respecto a la proteína y a su ubicación inicial. Estos resultados se ilustran en la Figura 31 y Figura 32.

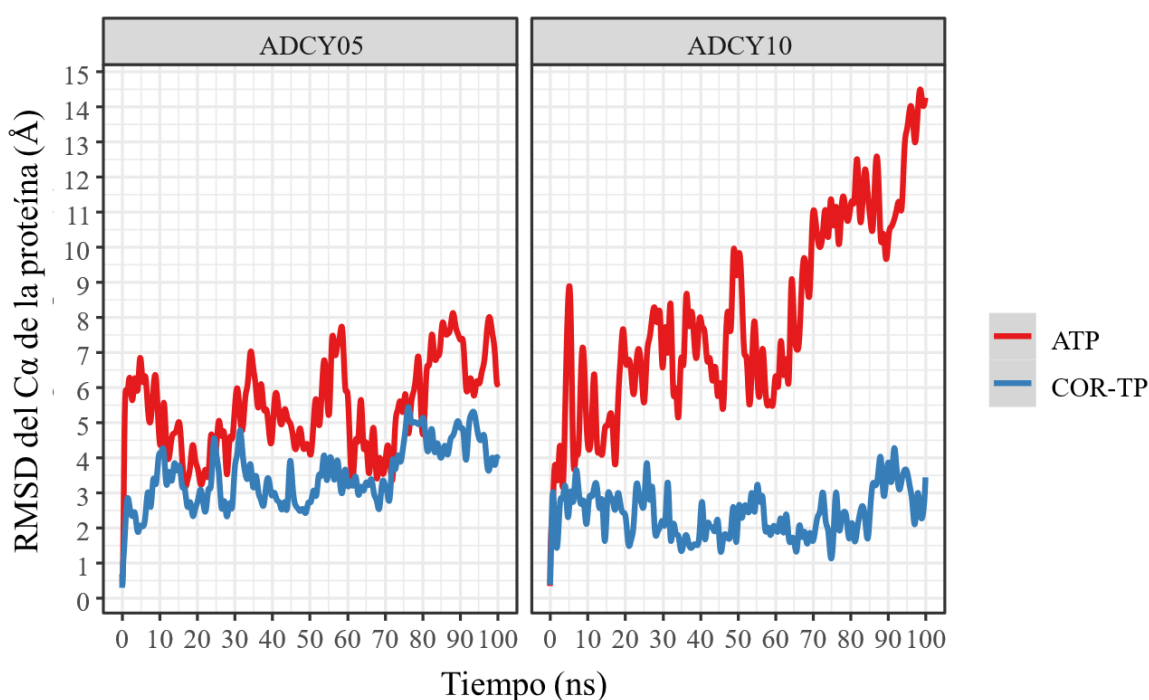


Figura 31. Variación del RMSD de los átomos del ligando en relación con la proteína. *Fuente: Adaptada de González-Llerena et. al., 2024¹³⁶.*

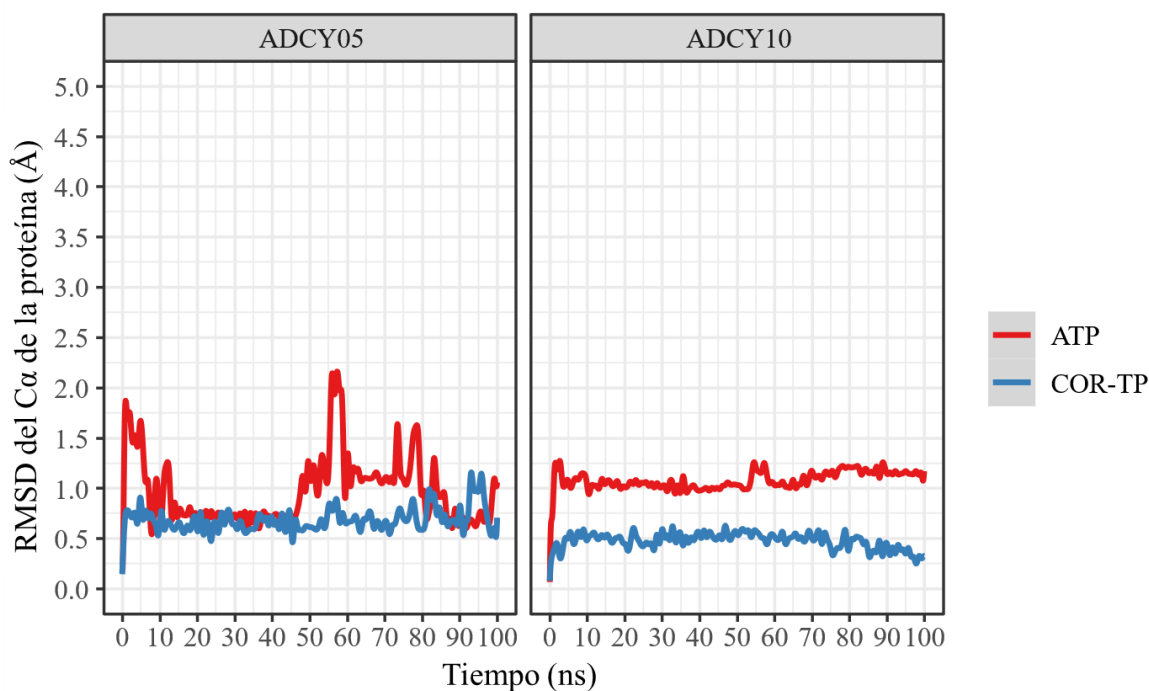


Figura 32. Variación del RMSD de los átomos del ligando con respecto a su posición original. *Fuente: Adaptada de González-Llerena et. al., 2024¹³⁶.*

Los resultados muestran que, a pesar de su unión al sitio activo, el ATP mantiene una conformación relativamente estable en ambas proteínas, sin experimentar cambios estructurales drásticos. De manera similar, COR-TP no presenta modificaciones conformacionales significativas a lo largo de las simulaciones, lo que sugiere que la orientación inicial obtenida mediante acoplamiento molecular es estable dentro del sistema de dinámica molecular.

En cuanto a las interacciones establecidas y perdidas a lo largo de la simulación, las Figuras 33 y 34 muestran los aminoácidos que interactúan con mayor frecuencia con los ligandos. Se observa que, en ADCY5, ambos ligandos forman predominantemente interacciones iónicas. Sin embargo, ATP exhibe una

mayor dependencia de las interacciones mediadas por moléculas de agua, lo cual es coherente con la menor polaridad de COR-TP. Este último presenta un mayor número de interacciones hidrofóbicas, principalmente con los residuos Phe 1074 e Ile 1125, además de enlaces de hidrógeno con residuos catalíticos clave.

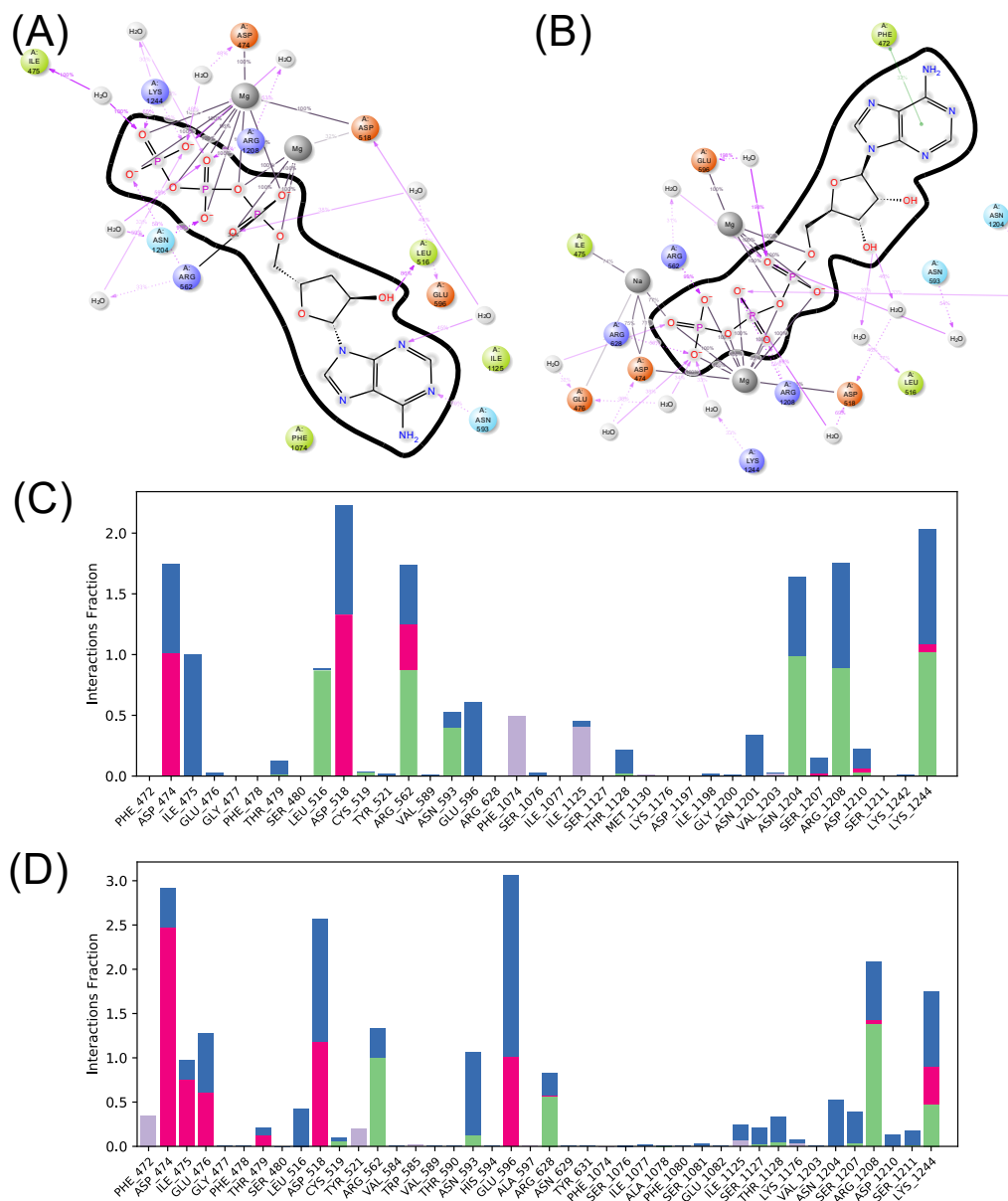


Figura 33. Resumen de las interacciones del ligando con ADCY05. **(A)** Interacciones COR-TP; **(B)** Interacciones de ATP. **(C)** Residuos de aminoácidos con los que interactúa el COR-TP; **(D)** residuos de aminoácidos con los que interactúa el ATP. El verde representa los enlaces de hidrógeno; el morado representa las interacciones hidrofóbicas; el rosa representa las interacciones iónicas; y el azul

representa las interacciones mediadas por el agua. *Fuente: Adaptada de González-Llerena et. al., 2024¹³⁶.*

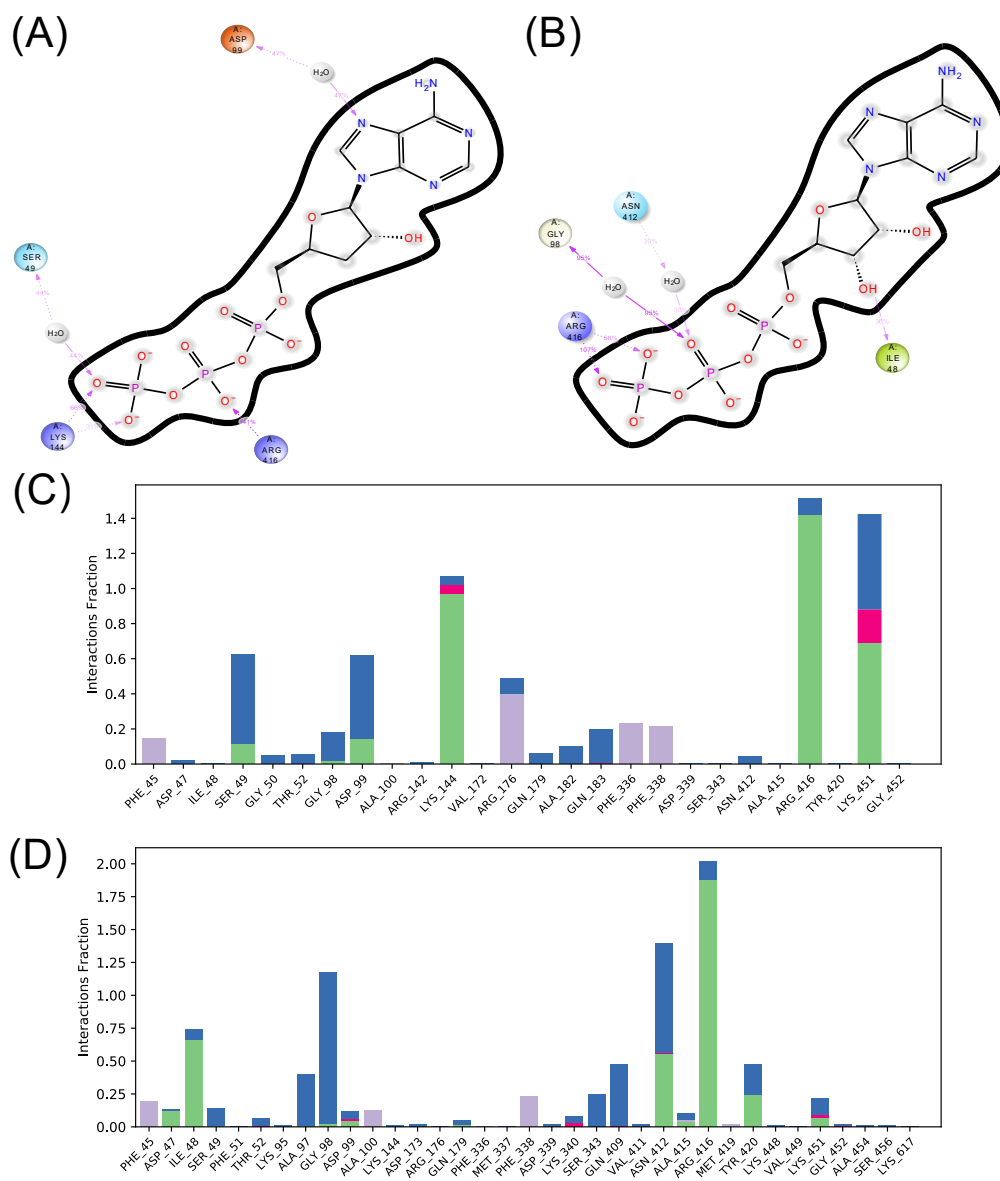


Figura 34. Resumen de las interacciones entre los ligandos y ADCY10. (A) Interacciones de COR-TP; (B) interacciones de ATP. (C) Residuos de aminoácidos con los que interactúa COR-TP; (D) residuos de aminoácidos con los que interactúa ATP. Las interacciones de hidrógeno se representan en verde, las interacciones

hidrofóbicas en morado, las interacciones iónicas en rosa y las interacciones mediadas por agua en azul. *Fuente: Adaptada de González-Llerena et. al., 2024¹³⁶.*

A pesar de la similitud estructural entre los ligandos, se identifica un patrón diferenciado de interacciones tanto a nivel de los aminoácidos involucrados como del tipo de interacciones que establecen. Este hallazgo sugiere que ambos compuestos podrían presentar diferencias significativas en su afinidad por el sitio catalítico de ADCY5, lo que podría tener implicaciones funcionales en su mecanismo de acción.

En el caso de ADCY10, el complejo con COR-TP presenta un mayor número de interacciones hidrofóbicas en comparación con otras interacciones dentro de esta isoforma. Sin embargo, la cantidad total de interacciones es menor en comparación con la otra variante en estudio. Además, se identificó que las interacciones predominantes en ambos casos corresponden a enlaces de hidrógeno y aquellas mediadas por moléculas de agua. Asimismo, se observó un patrón diferenciado en las interacciones establecidas, lo que podría indicar una afinidad diferencial de estos compuestos hacia esta isoforma específica.

5.5.9. Simulaciones de metadinámica bien temperada

Para evaluar la estabilidad y la afinidad del complejo ligando-ciclase, se llevaron a cabo cálculos de metadinámica utilizando la conformación más representativa obtenida en las simulaciones de dinámica molecular. Este enfoque

permitió generar un perfil de energía libre en función de la distancia entre los centros de masa del ligando y el sitio de unión de los aminoácidos. En la Figura 35 se presentan los perfiles de energía correspondientes a los complejos formados entre los ligandos y la adenilato ciclasa.

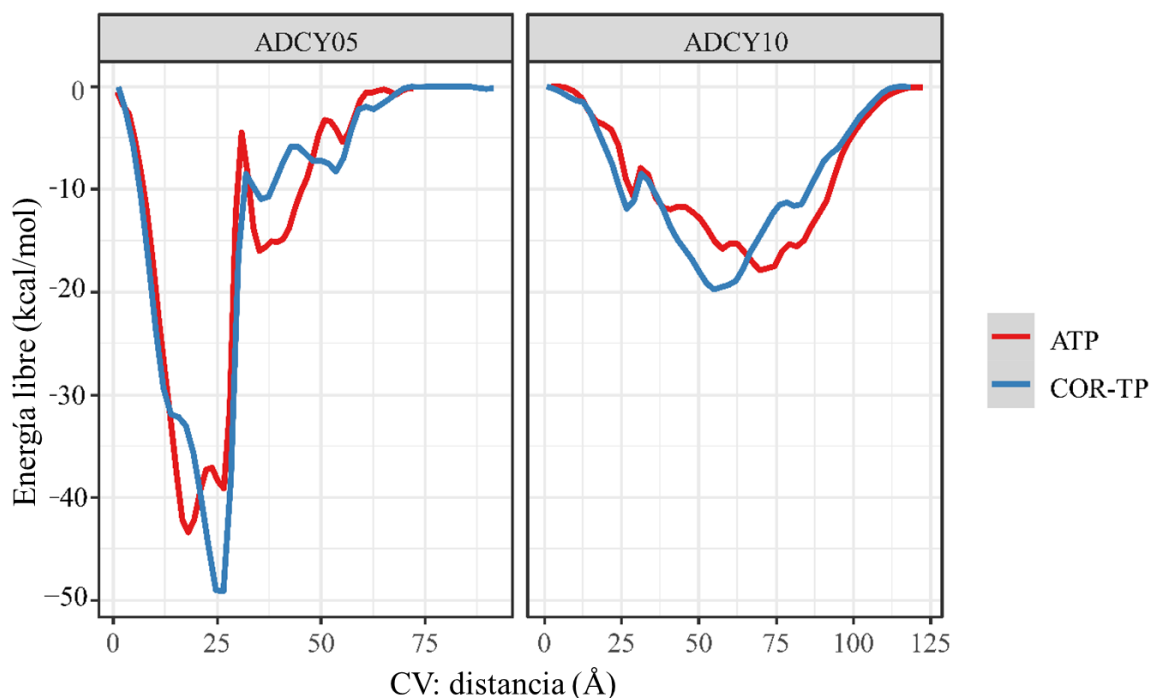


Figura 35. Perfil de energía libre obtenido mediante metadinámica, utilizando como variable colectiva la distancia entre los centros de masa del ligando y el sitio catalítico. *Fuente: Adaptada de González-Llerena et. al., 2024¹³⁶.*

Para generar el perfil de energía libre, se modificó la distancia entre los centros de masa de las moléculas, empleando esta medida como variable colectiva. La aplicación de potenciales gaussianos permitió inducir cambios conformacionales

que, de otro modo, serían difíciles de alcanzar debido a las elevadas demandas computacionales. De este modo, el perfil de energía libre basado en la distancia facilita la estimación de la energía de unión entre dos moléculas, cuyos valores se presentan en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Energía libre de unión (kcal/mol) de los complejos ligando–adenilato ciclasa. *Fuente: Adaptada de González-Llerena et. al., 2024¹³⁶.*

	Ligando	
Proteína	COR-TP	ATP
ADCY05	-51.92	-44.39
ADCY10	-20.38	-19.41

Como se ilustra en la Figura 35, los perfiles de energía libre de unión presentan una notable similitud entre los distintos ligandos, lo cual era predecible considerando la elevada homología estructural de las moléculas evaluadas en la misma proteína. No obstante, el análisis de las interacciones intermoleculares revela que pequeñas variaciones estructurales fueron suficientes para generar diferencias en la afinidad de unión entre los ligandos. Tal como se detalla en la Tabla 5, los ligandos exhibieron una mayor afinidad de unión (valores de energía más negativos) hacia ADCY05 en comparación con ADCY10, manteniendo un patrón similar: COR-TP mostró una mayor afinidad por la adenilato ciclasa estudiada que su sustrato natural. Aunque esta tendencia se mantiene en ambas ciclasas, es relevante

destacar que en ADCY05 la afinidad de COR-TP supera en más de 50 veces la de ATP, mientras que en ADCY10 esta diferencia es menor a siete veces. Además, la diferencia en la energía libre de unión no supera el umbral de incertidumbre convencional en métodos computacionales (1 kcal/mol), lo que sugiere que, en ADCY10, la diferencia en afinidad entre los ligandos podría no ser estadísticamente significativa.

Diversos estudios han demostrado que la cordicepina trifosfato (COR-TP) puede generarse *in vitro* en células tumorales y en células del sistema inmunológico, como los macrófagos^{140,141}. Además, se ha reportado que la cordicepina, en su forma no trifosforilada (COR), ejerce una inhibición moderada sobre la adenilato ciclasa, aunque el mecanismo subyacente aún no ha sido completamente dilucidado¹⁴⁵. En nuestro estudio, confirmamos que esta inhibición podría deberse a la reducción de la actividad de la adenilato ciclasa mediada por COR-TP. Este mecanismo guarda similitudes con la forma en que operan diversas enzimas, como las ARN polimerasas, las poli(A) polimerasas (PAP) y la primasa de ADN, las cuales emplean el grupo hidroxilo en posición 3' como nucleófilo en sus procesos catalíticos^{139,146–148}.

Adicionalmente, nuestros hallazgos fueron respaldados mediante comparaciones fisicoquímicas entre la cordicepina y sus derivados con la adenosina y sus análogos. De manera complementaria, llevamos a cabo estudios de *docking* molecular de la cordicepina y sus metabolitos con dianas conocidas por su interacción con la adenosina y sus derivados. Los resultados revelaron modos de

unión similares, con energías de interacción comparables e incluso superiores en algunos casos. Posteriormente, realizamos simulaciones de dinámica molecular (MD) utilizando dos isoformas de adenilato ciclasa, transmembranal (tmAC) y soluble (sAC), con el propósito de contrastar las interacciones de COR-TP con la adenilato ciclasa frente a las del ATP con la misma enzima.

La metodología utilizada en el presente estudio ha sido previamente empleada para dilucidar mecanismos de acción novedosos o poco explorados, como se ha documentado en trabajos previos de Espinosa et al. (2023)¹⁴⁹. Nuestros resultados en los análisis fisicoquímicos refuerzan la hipótesis de que la cordicepina y sus derivados pueden ser reconocidos por las mismas dianas que interactúan con la adenosina y sus metabolitos, dada la alta similitud estructural entre estas moléculas. De hecho, se observó que ciertas dianas no discriminan entre la adenosina endógena, la cordicepina y sus derivados, lo que sugiere que estos compuestos podrían ocupar sitios de unión relevantes en proteínas del metabolismo de nucleótidos. Esta hipótesis se ve respaldada por evidencia experimental, donde se ha reportado la formación de compuestos como 3'-desoxiinosina (3'-dINO), cordicepina monofosfato (COR-MP), difosfato (COR-DP) y trifosfato (COR-TP)¹⁴⁰, así como de análogos estructurales como 3'-desoxi-S-adenosilmetionina (3'-dSAM)¹⁵⁰ y 3'-desoxiinosina monofosfato (3'-dIMP)^{151,152}. La presencia de 3'-dIMP es particularmente relevante, ya que sugiere que 3'-dINO podría ser reconocido y fosforilado por enzimas como la adenosina quinasa, como lo indican nuestros estudios fisicoquímicos y de *docking* molecular.

En cuanto a estudios computacionales previos, Wang et al. (2010) realizaron un análisis de docking molecular entre COR-MP y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), en el cual se reportaron energías de unión comparables a las observadas para la interacción entre AMP y AMPK¹⁵³. Posteriormente, Hawley et al. (2020) validaron experimentalmente que la activación de AMPK por la cordicepina es mediada principalmente por su metabolito monofosfato (COR-MP)¹²⁹. En relación con este aspecto, se obtuvieron resultados que coincidieron en gran medida con los hallazgos descritos anteriormente por Wang y colaboradores en 2010. Al igual que en ese estudio, se observaron patrones similares tanto en la manera en que las moléculas se unen como en la fuerza con la que lo hacen. Era algo que ya se anticipaba. No obstante, en el análisis realizado aquí, se identificaron ciertos blancos moleculares que parecían tener una afinidad más elevada hacia COR y también hacia algunos de sus derivados, cosa que no se había detallado en los datos anteriores. Aunque las similitudes fueron claras, estas diferencias podrían sugerir comportamientos específicos en ciertos contextos que no fueron reportados por otros autores.

Por otro lado, Niramitrannon et al. (2020) realizaron simulaciones de dinámica molecular entre la cordicepina y una isoforma de la adenosina desaminasa (ADA), reportando que COR presentaba una afinidad comparable, aunque inferior a la de la adenosina endógena¹⁴². En nuestro estudio, al analizar dos isoformas de adenilato ciclasa, observamos que en un caso (ADCY10) la afinidad de unión de COR-TP fue similar a la del ligando endógeno, mientras que en el otro (ADCY05) fue superior. Hasta la fecha, los estudios *in silico* que exploran las interacciones

entre los derivados de la cordicepina y dianas humanas son limitados, especialmente en comparación con los metabolitos endógenos, lo que representa un campo de investigación que amerita una exploración más profunda.

Cabe destacar que la formación de COR-TP no ocurre en todas las células de manera uniforme, sino que parece estar restringida a aquellas con un metabolismo acelerado y una proliferación rápida, como células tumorales, células del sistema inmunológico y células madre, las cuales comparten un perfil metabólico similar^{154–156}. Este fenómeno podría explicar la baja toxicidad de la cordicepina y las diferencias en su mecanismo de acción, dado que la trifosforilación del compuesto no se produce en todas las células, lo que confiere un efecto específico según el tipo celular. Un ejemplo notable es el microambiente tumoral, en este, el sistema adenosinérgico exhibe una actividad metabólica y de señalización elevada¹⁵⁷. Dado que la cordicepina comparte una similitud estructural considerable con la adenosina, es plausible que algunas enzimas la reconozcan como si fuera este nucleósido endógeno, facilitando la generación de COR-TP en sitios donde su acción es más requerida, sin provocar efectos adversos significativos. Finalmente, nuestras simulaciones de dinámica molecular confirman que COR-TP puede unirse eficazmente a las isoformas transmembranal (tmAC, ADCY05) y soluble (sAC, ADCY10) de la adenilato ciclasa, lo que refuerza su potencial como modulador de esta vía de señalización.

5.5.10. Propuesta del mecanismo de acción de la cordicepina mediada por nucleótidos cíclicos y su relación con la plasticidad celular.

En esta sección se analizan las implicaciones de nuestros hallazgos experimentales en el contexto de los diversos efectos atribuidos a la cordicepina en distintos modelos celulares y fisiopatológicos. Se contrasta nuestra propuesta mecanística, basada en evidencia *in silico*, según la cual COR-TP disminuye la señalización mediada por nucleótidos cíclicos, en particular el AMPc, afectando procesos clave como la senescencia, la reprogramación y la plasticidad celular, ofreciendo para interpretar los efectos inmunológicos y antitumorales aparentemente opuestos de la cordicepina, proponiendo su acción como un modulador epigenético del destino celular, donde la plasticidad juega un papel central.

Respecto al cáncer, donde la plasticidad celular desempeña un papel fundamental en la progresión, evasión inmunológica y resistencia terapéutica¹⁵⁸, la cordicepina ha sido ampliamente investigada por su capacidad para modular diversas rutas de señalización¹⁵⁹. Entre los mecanismos descritos se incluyen la inhibición de la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la activación de AMPK, la inhibición de mTOR, la inducción de apoptosis mediada por receptores de muerte y la supresión de GSK-3 β ^{70,160}. Estos efectos sugieren que la cordicepina puede interferir con programas celulares críticos para el mantenimiento de fenotipos malignos altamente plásticos. A pesar de ello, no se ha logrado esclarecer completamente su mecanismo molecular, ya que estas rutas

por sí solas no explican la totalidad de sus efectos biológicos. En particular, ha llamado la atención su comportamiento aparentemente contradictorio sobre el sistema inmune, pues por un lado presenta propiedades antiinflamatorias, mientras que por el otro, estimula respuestas proinflamatorias útiles en contextos tumorales. La primera de estas acciones se ha relacionado con la activación de AMPK y su capacidad para inhibir NF- κ B¹⁶¹. Sin embargo, esta vía no explica cómo COR puede inducir una respuesta inflamatoria antitumoral, ya que la inhibición de NF- κ B tiende a suprimir este tipo de respuestas¹⁶².

Nuestra hipótesis propone que este efecto dual podría explicarse por la conversión de COR en su forma trifosfatada (COR-TP), la cual reduciría la síntesis de AMPc y, simultáneamente, induciría una respuesta inmunitaria proinflamatoria localizada. Esto tendría un papel importante en el microambiente tumoral, donde tanto las células cancerosas como los fibroblastos asociados al tumor (CAF, por sus siglas en inglés) podrían dejar de secretar señales inmunosupresoras al disminuir sus niveles de AMPc, facilitando su eliminación por el sistema inmune^{163,164}. Esta dualidad podría deberse a que en tejidos no tumorales predomina la forma desaminada y no fosforilada de COR (3'-dINO), la cual tendría un efecto antiinflamatorio comparable al de la inosina (INO), que se sabe actúa sobre receptores A2_A de adenosina con débil afinidad^{165,166}. De esta forma, COR podría ejercer efectos distintos dependiendo del entorno celular, promoviendo la inflamación antitumoral y reduciéndola en tejidos periféricos.

Si la señalización por cAMP se ve interrumpida, es posible que las células tumorales pierdan su fenotipo proliferativo y los mecanismos inmunosupresores en el microambiente tumoral disminuyan. En apoyo a esta idea, Deng et al. (2022) observaron en un modelo murino que COR aumenta la infiltración de células T CD4+, CD8+, células NK y macrófagos de tipo M1 en tumores de colon, además de reducir la expresión de CD47, lo cual favorece la fagocitosis de las células malignas¹⁶⁷. Por otro lado, Chaicharoenaudomrung et al. (2023) mostraron que en una línea celular NK, COR induce la expresión de citocinas como IL-2, TNF- α e IFN γ , aumentando también su actividad antitumoral¹⁶⁸.

Diversos estudios han evaluado la combinación de COR con inhibidores de puntos de control inmunológico (ICI, por sus siglas en inglés), como CD47 y TIGIT. Estas combinaciones han mostrado un aumento en la infiltración de células dendríticas, una mayor presentación de antígenos tumorales y una reducción en las células T reguladoras (Tregs). También se reportó la expresión del marcador CD226, el cual se ha relacionado con mejor pronóstico en pacientes oncológicos^{169,170}. Asimismo, COR mejora la proliferación y la citotoxicidad de las células NK, y su combinación con inhibidores de CTLA-4 incrementa la infiltración de linfocitos T CD8+ y reduce la presencia de FOXP3+¹⁷¹. De manera adicional, se demostró que COR puede mejorar la maduración de células dendríticas y la producción de anticuerpos en un modelo de vacunación contra rabia, lo que apoya su función como inmunomodulador¹⁷².

Otro aspecto importante es su acción sobre la vía MAPK, la cual parece estar suprimida tras el tratamiento con COR debido a una disminución en la activación del receptor EGFR¹⁷³. Aunque aún se discute si COR-TP actúa como inhibidor competitivo del ATP o como donador de fosfato, no hay evidencia directa que confirme su unión estructural al receptor. Además, su potencia resulta inferior a la de inhibidores clásicos como gefitinib^{174,175}. La activación de la vía MAPK también puede darse a través de la proteína Epac y su efector Rap1, involucrado en múltiples procesos como proliferación, adhesión y migración celular¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. Rap1 favorece la metástasis al activar integrinas^{179,180}, y en muchos tumores se ha observado una disminución de Rap1GAP, su inhibidor natural¹⁸¹.

Además, Rap1 promueve la migración celular al reducir la expresión de E-cadherina y aumentar la producción de metaloproteinasas como MMP2 y MMP9, las cuales activan TGF- β ^{182,183}. También se ha relacionado con la activación de Src, lo que lleva a la activación de ERK y la producción de VEGF, promoviendo la angiogénesis¹⁸⁴. Este mecanismo además se asocia con la expresión de PD-L1, un marcador que contribuye a la evasión del sistema inmune^{185,186}. COR ha mostrado efectos en la inhibición de estos procesos, ya que reduce características de células madre en modelos de leucemia y cáncer de ovario^{132,187}, bloquea la fosforilación de ERK por MEK^{174,175}, aumenta la expresión de E-cadherina, disminuye MMP9 y, por tanto, frena la transición epitelio-mesénquima (EMT)^{131,188,189}. También se ha observado que disminuye la expresión de PD-L1 en cáncer de colon¹⁹⁰.

Por todo esto, se ha propuesto el uso de inhibidores de Epac como ESI-09¹⁹¹. Nosotros sugerimos que COR, al reducir la concentración de cAMP, limita la activación de Epac y bloquea la vía de Rap1, lo cual inhibiría la ruta MAPK desde una etapa temprana del proceso de señalización.

Comprender con mayor claridad los eventos posteriores a la administración de cordicepina continúa siendo un paso clave para dilucidar su mecanismo intracelular. Con base en nuestros resultados y la revisión de literatura previa, planteamos que la forma activa de esta molécula, cordicepina trifosfato (COR-TP), podría inducir una disminución en los niveles intracelulares de AMP cíclico (AMPc), posiblemente por interferir con la actividad de la adenilato ciclasa. El AMPc es conocido por desempeñar un papel fundamental en múltiples procesos celulares, incluyendo la regulación del estado senescente y la pluripotencia.

La disminución observada en nuestros experimentos tanto de marcadores asociados a senescencia (como *IL6* y *CDKN1A*) como de factores clave relacionados con la pluripotencia (como *SOX2* y *KLF4*) podría atribuirse a la reducción en los niveles intracelulares de AMPc inducida por COR-TP. Este hallazgo resulta particularmente interesante, ya que contrasta con estudios previos que han señalado que la vía AMPc–PKA–CREB cumple un papel fundamental en la prevención de la senescencia celular¹⁹². Concretamente, la activación de PKA fosforila a CREB, lo cual facilita el reclutamiento de los coactivadores epigenéticos CBP/p300 a sitios específicos del ADN¹⁹³. No obstante, recientes estudios indican que la regulación mediada por AMPc no siempre es lineal ni predecible. Por ejemplo,

se ha reportado que niveles elevados y sostenidos de AMPc pueden promover la senescencia celular en células madre mesenquimales humanas, probablemente debido a la activación excesiva de vías alternativas como Epac, o a la sobreestimulación del complejo CREB–CBP/p300¹⁹⁴. Esto implica que el AMPc ejerce efectos altamente dependientes del contexto celular y del tiempo de exposición.

Dentro de este panorama, proponemos que los resultados obtenidos con COR-TP representan un mecanismo por el cual se atenúan señales pro-senescentes previamente activadas, en nuestro caso por una exposición prolongada al SASP. La reducción en AMPc inducida por COR-TP podría resultar en una disminución de la fosforilación de CREB y, en consecuencia, una menor actividad del complejo CBP/p300. Esto limitaría la acetilación y activación de proteínas como p53 y NF-κB, reduciendo así la expresión de genes asociados al arresto del ciclo celular y a la inflamación crónica. Este modelo es consistente con estudios anteriores que han demostrado que la inhibición de CBP/p300 o la activación de SIRT1 pueden revertir parcialmente la senescencia celular¹⁹⁵.

Sin embargo, la reducción de la senescencia celular no necesariamente implica un aumento en la plasticidad. De hecho, algunas investigaciones indican que un grado moderado y temporal de senescencia, mediado por el SASP y vías como JAK/STAT3, puede facilitar la reprogramación al secretar moléculas que preparan a las células para adquirir una identidad más flexible^{196,197}. En consecuencia, si COR-TP inhibe estas señales al disminuir la función de CREB o

interferir con CBP/p300, podría también afectar negativamente a promotores críticos de genes de pluripotencia como *KLF4* o *SOX2*. De hecho, se ha demostrado que estas proteínas epigenéticas son necesarias para mantener la accesibilidad a regiones del ADN que caracterizan el estado pluripotente¹⁹⁸. Así, aunque la acción de COR-TP podría restablecer cierta homeostasis celular al reducir marcadores pro-senescentes, podría simultáneamente restringir a la célula a un estado más diferenciado y menos plástico.

Capítulo VI

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio permiten sostener parcialmente la hipótesis planteada. La exposición de fibroblastos humanos IMR-90 al fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) indujo un aumento en la expresión de marcadores vinculados con procesos de dediferenciación y pluripotencia, como *KLF4* y *SOX2*, lo que sugiere que el microambiente proinflamatorio generado por el SASP puede favorecer un estado de dediferenciación parcial. Sin embargo, no se logró demostrar de manera concluyente la adquisición de un estado pluripotente funcional ni la capacidad de diferenciación efectiva hacia un linaje β -pancreático maduro y productor de insulina.

Se replicó correctamente un modelo funcional de senescencia en fibroblastos IMR-90 mediante tratamiento con mitomicina C, evidenciado por la sobreexpresión de *IL6* y *CDKN1A*, así como por cambios morfológicos característicos, lo que permitió obtener medio condicionado rico en SASP. La exposición a este medio promovió cambios en la expresión génica compatibles con una transición hacia un estado menos diferenciado.

La inducción química hacia un linaje pancreático permitió detectar la expresión de genes como *NEUROG3* y *MAFB*, asociados a la diferenciación β -pancreática.

No obstante, al no demostrarse funcionalidad insulínica, estos hallazgos deben interpretarse como preliminares.

En cuanto a la cordicepina, los resultados no respaldan el efecto esperado como potenciador de la reprogramación celular. Por el contrario, se observó una reducción en la expresión de los marcadores evaluados, lo que sugiere una posible acción moduladora negativa que merece una evaluación más detallada en estudios futuros.

El análisis computacional permitió identificar posibles blancos moleculares de la cordicepina, incluyendo enzimas reguladoras del metabolismo de nucleótidos cíclicos como adenilato ciclasa.

Los hallazgos obtenidos permiten proponer que la cordicepina, al convertirse en COR-TP, podría reducir los niveles de AMPc al interferir con la adenilato ciclasa, modulando negativamente la vía AMPc–PKA–CREB–CBP/p300. Esta inhibición afectaría la expresión de genes asociados tanto a la senescencia como a la pluripotencia, lo que explicaría la pérdida simultánea de estos marcadores observada. Así, en contextos donde el SASP está crónicamente activado, la cordicepina podría limitar la plasticidad celular al suprimir estas señales epigenéticas. Aunque estos hallazgos aportan hipótesis sobre mecanismos de acción plausibles, no han sido validados experimentalmente, por lo que deben interpretarse con cautela.

Capítulo VII

7. Perspectivas

Es necesario realizar estudios adicionales para confirmar si la reprogramación inducida por el SASP y la cordicepina conduce a un estado de verdadera pluripotencia o a un fenotipo híbrido con características de senescencia. Entre las estrategias recomendadas se incluyen la evaluación de marcadores de superficie específicos de células madre pluripotentes, ensayos funcionales de diferenciación *in vitro*, y análisis proteómicos y metabolómicos del entorno celular. Estos estudios permitirán dilucidar con mayor precisión la naturaleza de la plasticidad celular inducida y su aplicabilidad en contextos terapéuticos.

Para optimizar esta metodología, se sugiere explorar la combinación del SASP con diversos moduladores epigenéticos u otras moléculas bioactivas, con el fin de aumentar no solo la eficiencia de reprogramación hacia un estado pluripotente, sino también asegurar la calidad funcional y molecular de las células generadas, fortaleciendo así los protocolos orientados a la aplicación clínica.

También es importante evaluar el efecto de la cordicepina en distintas etapas del proceso de pluripotencia, tanto de manera individual como en combinación con el SASP y otras moléculas pequeñas, para analizar su potencial en mantener un

estado celular plástico, evitando la entrada prematura en senescencia o su diferenciación hacia linajes específicos. Esta estrategia contribuiría a mejorar las condiciones de cultivo y manipulación de células pluripotentes con fines diversos.

Asimismo, es crucial que las evaluaciones trasciendan el análisis fenotípico superficial y aborden aspectos funcionales específicos de las células diferenciadas. De igual manera, se debe considerar la estabilidad genética y epigenética a largo plazo, dado que la reprogramación celular conlleva alteraciones en la arquitectura del genoma y epigenoma. Evaluaciones del potencial oncogénico y de la estabilidad genómica son indispensables para garantizar un enfoque seguro, especialmente en aplicaciones clínicas orientadas a enfermedades crónicas como la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2.

Finalmente, se recomienda adoptar enfoques metodológicos optimizados y estandarizados, integrando tecnologías avanzadas en el ámbito de las ciencias ómicas (transcriptómica, metabolómica y proteómica). La integración interdisciplinaria de estas herramientas permitiría una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares subyacentes en la diferenciación celular, y contribuiría al desarrollo de terapias regenerativas más eficaces y seguras para el tratamiento de enfermedades metabólicas y crónicas.

Capítulo VIII

8. Referencias

1. Tomic, D., Shaw, J. E. & Magliano, D. J. The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* **18**, 525–539 (2022).
2. Ruze, R. *et al.* Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments. *Front Endocrinol (Lausanne)* **14**, (2023).
3. Liu, Z., Wang, H., Yang, Z., Lu, Y. & Zou, C. Causal associations between type 1 diabetes mellitus and cardiovascular diseases: a Mendelian randomization study. *Cardiovasc Diabetol* **22**, 236 (2023).
4. Harborg, S. *et al.* New Horizons: Epidemiology of Obesity, Diabetes Mellitus, and Cancer Prognosis. *J Clin Endocrinol Metab* **109**, 924–935 (2024).
5. WHO. Diabetes . https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1.
6. Khan, M. A. B. *et al.* Epidemiology of Type 2 Diabetes – Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *J Epidemiol Glob Health* **10**, 107 (2019).
7. Soto-Estrada, G., Moreno Altamirano, L., García-García, J. J., Ochoa Moreno, I. & Silberman, M. Trends in frequency of type 2 diabetes in Mexico and its relationship to dietary patterns and contextual factors. *Gac Sanit* **32**, 283–290 (2018).
8. INEGI. *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA DIABETES (14 DE NOVIEMBRE)*. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/EAP_Diabetes2021.pdf (2021).
9. Gong, B., Yang, W., Xing, Y., Lai, Y. & Shan, Z. Global, regional, and national burden of type 1 diabetes in adolescents and young adults. *Pediatr Res* **97**, 568–576 (2025).
10. Gregory, G. A. *et al.* Global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021 with projection to 2040: a modelling study. *Lancet Diabetes Endocrinol* **10**, 741–760 (2022).
11. Klak, M. *et al.* Type 1 diabetes: genes associated with disease development. *Central European Journal of Immunology* **45**, 439–453 (2020).

12. Chiou, J. *et al.* Interpreting type 1 diabetes risk with genetics and single-cell epigenomics. *Nature* **594**, 398–402 (2021).
13. Taylor, R. Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Diabetes* **61**, 778–779 (2012).
14. Cerf, M. E. Beta Cell Dysfunction and Insulin Resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**, (2013).
15. Yang, W., Jiang, W. & Guo, S. Regulation of Macronutrients in Insulin Resistance and Glucose Homeostasis during Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients* **15**, 4671 (2023).
16. Galicia-Garcia, U. *et al.* Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci* **21**, 6275 (2020).
17. Tsalamandris, S. *et al.* The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. *European Cardiology Review* **14**, 50–59 (2019).
18. Kang, Z. *et al.* UPRmt and coordinated UPRER in type 2 diabetes. *Front Cell Dev Biol* **10**, (2022).
19. Himanshu, D., Ali, W. & Wamique, M. Type 2 diabetes mellitus: pathogenesis and genetic diagnosis. *J Diabetes Metab Disord* **19**, 1959–1966 (2020).
20. Asthana, S., Mallick, B., Alexandrescu, A. T. & Jha, S. IAPP in type II diabetes: Basic research on structure, molecular interactions, and disease mechanisms suggests potential intervention strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1860**, 1765–1782 (2018).
21. Syed, F. Z. Type 1 Diabetes Mellitus. *Ann Intern Med* **175**, ITC33–ITC48 (2022).
22. Melendez-Ramirez, L. Y., Richards, R. J. & Cefalu, W. T. Complications of Type 1 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* **39**, 625–640 (2010).
23. Barton, F. B. *et al.* Improvement in Outcomes of Clinical Islet Transplantation: 1999–2010. *Diabetes Care* **35**, 1436–1445 (2012).
24. Shapiro, A. M. J. State of the Art of Clinical Islet Transplantation and Novel Protocols of Immunosuppression. *Curr Diab Rep* **11**, 345–354 (2011).
25. Shapiro, A. M. J., Pokrywczynska, M. & Ricordi, C. Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol* **13**, 268–277 (2017).
26. Hebrok, M. Generating Cells from Stem Cells--The Story So Far. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a007674–a007674 (2012).
27. Lean, M. E. *et al.* Primary care-led weight management for remission of type 2 diabetes (DiRECT): an open-label, cluster-randomised trial. *The Lancet* **391**, 541–551 (2018).

28. Bellary, S., Kyrou, I., Brown, J. E. & Bailey, C. J. Type 2 diabetes mellitus in older adults: clinical considerations and management. *Nat Rev Endocrinol* **17**, 534–548 (2021).
29. Grandl, G., Novikoff, A., Liu, X. & Müller, T. D. Recent achievements and future directions of anti-obesity medications. *The Lancet Regional Health - Europe* **47**, 101100 (2024).
30. Tahrani, A. A., Barnett, A. H. & Bailey, C. J. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* **12**, 566–592 (2016).
31. Gao, L. *et al.* Tirzepatide versus insulin glargine as second-line or third-line therapy in type 2 diabetes in the Asia-Pacific region: the SURPASS-AP-Combo trial. *Nat Med* **29**, 1500–1510 (2023).
32. Mousaei Ghasroldasht, M., Seok, J., Park, H.-S., Liakath Ali, F. B. & Al-Hendy, A. Stem Cell Therapy: From Idea to Clinical Practice. *Int J Mol Sci* **23**, 2850 (2022).
33. McCall, M. D., Toso, C., Baetge, E. E. & Shapiro, A. M. J. Are stem cells a cure for diabetes? *Clin Sci* **118**, 87–97 (2010).
34. Domínguez-Bendala, J., Inverardi, L. & Ricordi, C. Stem cell-derived islet cells for transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* **16**, 76–82 (2011).
35. D'Amour, K. A. *et al.* Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* **23**, 1534–1541 (2005).
36. D'Amour, K. A. *et al.* Production of pancreatic hormone–expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **24**, 1392–1401 (2006).
37. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
38. Seki, T. *et al.* Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Terminally Differentiated Circulating T Cells. *Cell Stem Cell* **7**, 11–14 (2010).
39. Kang, X. *et al.* Effects of Integrating and Non-Integrating Reprogramming Methods on Copy Number Variation and Genomic Stability of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS One* **10**, e0131128 (2015).
40. Pauwels, K. *et al.* State-of-the-Art Lentiviral Vectors for Research Use: Risk Assessment and Biosafety Recommendations. *Curr Gene Ther* **9**, 459–474 (2009).
41. Ban, H. *et al.* Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 14234–14239 (2011).

42. Soria-Valles, C., Osorio, F. G. & López-Otín, C. Reprogramming aging through DOT1L inhibition. *Cell Cycle* **14**, 3345–3346 (2015).
43. Lee, J. *et al.* Activation of Innate Immunity Is Required for Efficient Nuclear Reprogramming. *Cell* **151**, 547–558 (2012).
44. Brady, J. J. *et al.* Early role for IL-6 signalling during generation of induced pluripotent stem cells revealed by heterokaryon RNA-Seq. *Nat Cell Biol* **15**, 1244–1252 (2013).
45. Erdoğan, Ö. *et al.* Proteomic dissection of LPS-inducible, PHF8-dependent secretome reveals novel roles of PHF8 in TLR4-induced acute inflammation and T cell proliferation. *Sci Rep* **6**, 24833 (2016).
46. Huangfu, D. *et al.* Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* **26**, 795–797 (2008).
47. Wang, C.-H. *et al.* The novel application of cordycepin in maintaining stem cell pluripotency and increasing iPS cell generation efficiency. *Sci Rep* **10**, 2187 (2020).
48. Herranz, N. & Gil, J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation* **128**, 1238–1246 (2018).
49. Mosteiro, L., Pantoja, C., de Martino, A. & Serrano, M. Senescence promotes in vivo reprogramming through p16-INK4a and IL-6. *Aging Cell* **17**, (2018).
50. Campisi, J. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* **33**, 703–709 (1997).
51. McHugh, D., Durán, I. & Gil, J. Senescence as a therapeutic target in cancer and age-related diseases. *Nat Rev Drug Discov* **24**, 57–71 (2025).
52. Lopes-Paciencia, S. *et al.* The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine* **117**, 15–22 (2019).
53. Aliouat-Denis, C.-M. *et al.* p53-Independent Regulation of p21Waf1/Cip1 Expression and Senescence by Chk2. *Molecular Cancer Research* **3**, 627–634 (2005).
54. Rao, S. G. & Jackson, J. G. SASP: Tumor Suppressor or Promoter? Yes! *Trends Cancer* **2**, 676–687 (2016).
55. Milanovic, M. *et al.* Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* **553**, 96–100 (2018).
56. Nacarelli, T., Liu, P. & Zhang, R. Epigenetic Basis of Cellular Senescence and Its Implications in Aging. *Genes (Basel)* **8**, 343 (2017).
57. Campisi, J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu Rev Physiol* **75**, 685–705 (2013).

58. Méndez-López, L. F. Revisiting Epithelial Carcinogenesis. *Int J Mol Sci* **23**, 7437 (2022).
59. Ritschka, B. *et al.* The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev* **31**, 172–183 (2017).
60. Schwitalla, S. *et al.* Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-like Properties. *Cell* **152**, 25–38 (2013).
61. Karra, R., Knecht, A. K., Kikuchi, K. & Poss, K. D. Myocardial NF- κ B activation is essential for zebrafish heart regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 13255–13260 (2015).
62. Nordmann, T. M. *et al.* The Role of Inflammation in β -cell Dedifferentiation. *Sci Rep* **7**, 6285 (2017).
63. Eckersley-Maslin, M. A. Keeping your options open: insights from Dppa2/4 into how epigenetic priming factors promote cell plasticity. *Biochem Soc Trans* **48**, 2891–2902 (2020).
64. Burchfield, J. S., Li, Q., Wang, H. Y. & Wang, R.-F. JMJD3 as an epigenetic regulator in development and disease. *Int J Biochem Cell Biol* **67**, 148–157 (2015).
65. Jung, J.-W. *et al.* Histone deacetylase controls adult stem cell aging by balancing the expression of polycomb genes and jumonji domain containing 3. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 1165–1176 (2010).
66. Chan, J. M. *et al.* Lineage plasticity in prostate cancer depends on JAK/STAT inflammatory signaling. *Science* (1979) **377**, 1180–1191 (2022).
67. Bassler, J., Schultz, J. E. & Lupas, A. N. Adenylate cyclases: Receivers, transducers, and generators of signals. *Cell Signal* **46**, 135–144 (2018).
68. Tesmer, J. J. G. & Sprang, S. R. The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase. *Curr Opin Struct Biol* **8**, 713–719 (1998).
69. CUNNINGHAM, K. G., MANSON, W., SPRING, F. S. & HUTCHINSON, S. A. Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. *Nature* **166**, 949–949 (1950).
70. Radhi, M. *et al.* A Systematic Review of the Biological Effects of Cordycepin. *Molecules* **26**, 5886 (2021).
71. CHUEAPHROMSRI, P., KUNHORM, P., PHONCHAI, R., CHAICHAROENAUDOMRUNG, N. & NOISA, P. Cordycepin Enhances SIRT1 Expression and Maintains Stemness of Human Mesenchymal Stem Cells. *In Vivo (Brooklyn)* **37**, 596–610 (2023).

72. Jędrejko, K. *et al.* Cordyceps militaris—Fruiting Bodies, Mycelium, and Supplements: Valuable Component of Daily Diet. *Antioxidants* **11**, 1861 (2022).
73. Boreak, N. *et al.* Dose-Dependent Effect of Cordycepin on Viability, Proliferation, Cell Cycle, and Migration in Dental Pulp Stem Cells. *J Pers Med* **11**, 718 (2021).
74. Verhoeff, K. *et al.* Optimizing Generation of Stem Cell-Derived Islet Cells. *Stem Cell Rev Rep* **18**, 2683–2698 (2022).
75. Yabe, S. G. *et al.* Efficient generation of functional pancreatic β -cells from human induced pluripotent stem cells. *J Diabetes* **9**, 168–179 (2017).
76. Xu, B. *et al.* Three-Dimensional Culture Promotes the Differentiation of Human Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells Into Insulin-Producing Cells for Improving the Diabetes Therapy. *Front Pharmacol* **10**, (2020).
77. Högberg, N. J., Maxwell, K. G., Augsornworawat, P. & Millman, J. R. Generation of insulin-producing pancreatic β cells from multiple human stem cell lines. *Nat Protoc* **16**, 4109–4143 (2021).
78. Wei, Q., Qian, Y., Yu, J. & Wong, C. C. Metabolic rewiring in the promotion of cancer metastasis: mechanisms and therapeutic implications. *Oncogene* **39**, 6139–6156 (2020).
79. Cui, B. *et al.* Pyrroline-5-carboxylate reductase 1 reprograms proline metabolism to drive breast cancer stemness under psychological stress. *Cell Death Dis* **14**, 682 (2023).
80. Plattner, F. *et al.* The role of ventral striatal cAMP signaling in stress-induced behaviors. *Nat Neurosci* **18**, 1094–1100 (2015).
81. Fritz, A. L., Adil, M. M., Mao, S. R. & Schaffer, D. V. cAMP and EPAC Signaling Functionally Replace OCT4 During Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming. *Molecular Therapy* **23**, 952–963 (2015).
82. Knyazer, A. *et al.* Small molecules for cell reprogramming: a systems biology analysis. *Aging* **13**, 25739–25762 (2021).
83. Mujoo, K., Krumenacker, J. S. & Murad, F. Nitric oxide–cyclic GMP signaling in stem cell differentiation. *Free Radic Biol Med* **51**, 2150–2157 (2011).
84. Kots, A. Y. & Bian, K. Regulation and Pharmacology of the Cyclic GMP and Nitric Oxide Pathway in Embryonic and Adult Stem Cells. *Cells* **13**, 2008 (2024).
85. de Morree, A. & Rando, T. A. Regulation of adult stem cell quiescence and its functions in the maintenance of tissue integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **24**, 334–354 (2023).

86. Ogawa, S. *et al.* Three-dimensional culture and cAMP signaling promote the maturation of human pluripotent stem cell-derived hepatocytes. *Development* **140**, 3285–3296 (2013).
87. Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science* (1979) **322**, 949–953 (2008).
88. Santostefano, K. E. *et al.* A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples. *Laboratory Investigation* **95**, 4–13 (2015).
89. Woltjen, K. *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* **458**, 766–770 (2009).
90. Zhou, W. & Freed, C. R. Adenoviral Gene Delivery Can Reprogram Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* **27**, 2667–2674 (2009).
91. Yu, J. *et al.* Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science* (1979) **324**, 797–801 (2009).
92. Al Abbar, A., Ngai, S. C., Nograles, N., Alhaji, S. Y. & Abdullah, S. Induced Pluripotent Stem Cells: Reprogramming Platforms and Applications in Cell Replacement Therapy. *Biores Open Access* **9**, 121–136 (2020).
93. Hou, P. *et al.* Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science* (1979) **341**, 651–654 (2013).
94. Guan, J. *et al.* Chemical reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cells. *Nature* **605**, 325–331 (2022).
95. Jeyagaran, A., Urbanczyk, M., Layland, S. L., Weise, F. & Schenke-Layland, K. Forward programming of hiPSCs towards beta-like cells using Ngn3, Pdx1, and MafA. *Sci Rep* **14**, 13608 (2024).
96. Liu, H. *et al.* Chemical combinations potentiate human pluripotent stem cell-derived 3D pancreatic progenitor clusters toward functional β cells. *Nat Commun* **12**, 3330 (2021).
97. Banito, A. *et al.* Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev* **23**, 2134–2139 (2009).
98. Chien, Y. *et al.* Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev* **25**, 2125–2136 (2011).
99. Hong, H. *et al.* Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53–p21 pathway. *Nature* **460**, 1132–1135 (2009).

100. Aarts, M. *et al.* Coupling shRNA screens with single-cell RNA-seq identifies a dual role for mTOR in reprogramming-induced senescence. *Genes Dev* **31**, 2085–2098 (2017).
101. Esteban, M. A. *et al.* Vitamin C Enhances the Generation of Mouse and Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **6**, 71–79 (2010).
102. Mikkelsen, T. S. *et al.* Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* **454**, 49–55 (2008).
103. Lapasset, L. *et al.* Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev* **25**, 2248–2253 (2011).
104. Shamsian, A. *et al.* Cancer cells as a new source of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther* **13**, 459 (2022).
105. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
106. American Type Culture Collection. ATCC. <https://www.atcc.org/products/ccl-186> (2024).
107. Markham, N. R. & Zuker, M. UNAFold. in 3–31 (2008). doi:10.1007/978-1-60327-429-6_1.
108. Krzywkowski, T., Hauling, T. & Nilsson, M. In Situ Single-Molecule RNA Genotyping Using Padlock Probes and Rolling Circle Amplification. in 59–76 (2017). doi:10.1007/978-1-4939-6442-0_4.
109. Hanwell, M. D. *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform* **4**, 17 (2012).
110. Cereto-Massagué, A. *et al.* Molecular fingerprint similarity search in virtual screening. *Methods* **71**, 58–63 (2015).
111. Liu, R., AbdulHameed, M. D. M. & Wallqvist, A. Teaching an Old Dog New Tricks: Strategies That Improve Early Recognition in Similarity-Based Virtual Screening. *Front Chem* **7**, (2019).
112. De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G. & Cavalli, A. Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. *J Med Chem* **59**, 4035–4061 (2016).
113. Bolton, E. E. *et al.* PubChem3D: a new resource for scientists. *J Cheminform* **3**, 32 (2011).
114. Daina, A., Michielin, O. & Zoete, V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Res* **47**, W357–W364 (2019).

115. Allaire, J. J. *RStudio: Integrated Development Environment for R*. <http://www.rstudio.org/>.
116. Gfeller, D. *et al.* SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic Acids Res* **42**, W32–W38 (2014).
117. Berman, H. M. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **28**, 235–242 (2000).
118. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605–1612 (2004).
119. Volkamer, A., Kuhn, D., Grombacher, T., Rippmann, F. & Rarey, M. Combining Global and Local Measures for Structure-Based Druggability Predictions. *J Chem Inf Model* **52**, 360–372 (2012).
120. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* **45**, D158–D169 (2017).
121. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science* **30**, 70–82 (2021).
122. Baek, M. *et al.* Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science* (1979) **373**, 871–876 (2021).
123. Chretien, A. *et al.* Light-induced Trpⁱⁿ/Met^{out} Switching During BLUF Domain Activation in ATP-bound Photoactivatable Adenylate Cyclase OaPAC. *J Mol Biol* 168439 (2024) doi:10.1016/j.jmb.2024.168439.
124. Bowers, K. J. *et al.* Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters. *ACM/IEEE SC 2006 Conference (SC'06)* 43 (2006).
125. Rodier, F. & Campisi, J. Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology* **192**, 547–556 (2011).
126. Coppé, J.-P. *et al.* Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol* **6**, e301 (2008).
127. Bryan Alejandro Espinosa Rodríguez. Estudio del transcriptoma, proteoma y metaboloma del efecto combinado de la metformina y el fenotipo secretor asociado a senescencia sobre células tumorales. (Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, 2023).
128. Arthur, T. D. *et al.* Complex regulatory networks influence pluripotent cell state transitions in human iPSCs. *Nat Commun* **15**, 1664 (2024).
129. Hawley, S. A. *et al.* Mechanism of Activation of AMPK by Cordycepin. *Cell Chem Biol* **27**, 214–222.e4 (2020).
130. Esteller, M. Epigenetics in Cancer. *New England Journal of Medicine* **358**, 1148–1159 (2008).

131. Lee. Cordycepin inhibits TPA-induced matrix metalloproteinase-9 expression by suppressing the MAPK/AP-1 pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Mol Med* **25**, (2009).
132. Wang, C.-W., Lee, B.-H. & Tai, C.-J. The inhibition of cordycepin on cancer stemness in TGF-beta induced chemo-resistant ovarian cancer cell. *Oncotarget* **8**, 111912–111921 (2017).
133. Russ, H. A. *et al.* Controlled induction of human pancreatic progenitors produces functional beta-like cells in vitro. *EMBO J* **34**, 1759–1772 (2015).
134. Lee, J. B. *et al.* A novel nucleoside rescue metabolic pathway may be responsible for therapeutic effect of orally administered cordycepin. *Sci Rep* **9**, 15760 (2019).
135. Ifegwu, O. C., Awale, G., Rajpura, K., Lo, K. W.-H. & Laurencin, C. T. Harnessing cAMP signaling in musculoskeletal regenerative engineering. *Drug Discov Today* **22**, 1027–1044 (2017).
136. Gonzalez-Llerena, J. L. *et al.* Cordycepin Triphosphate as a Potential Modulator of Cellular Plasticity in Cancer via cAMP-Dependent Pathways: An In Silico Approach. *Int J Mol Sci* **25**, 5692 (2024).
137. Cho, D.-H., Bae, C.-D. & Juhnn, Y.-S. Multi-facet expressions of adenylate cyclase isoforms in B16-F10 melanoma cells differentiated by forskolin treatment. *Exp Mol Med* **32**, 235–242 (2000).
138. Fajardo, J., Milthorpe, B. K. & Santos, J. Molecular Mechanisms Involved in Neural Substructure Development during Phosphodiesterase Inhibitor Treatment of Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci* **21**, 4867 (2020).
139. ROSE, K. M., BELL, L. E. & JACOB, S. T. Specific inhibition of chromatin-associated poly(A) synthesis in vitro by cordycepin 5'-triphosphate. *Nature* **267**, 178–180 (1977).
140. Klenow, H. Formation of the mono, di, and triphosphate of cordycepin in Ehrlich ascites-tumor cells in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized section on nucleic acids and related subjects* **76**, 347–353 (1963).
141. Desrosiers, R. C., Rottman, F. M., Boezi, J. A. & Towle, H. C. The sensitivity of RNA polymerases I and II from Novikoff hepatoma (N1S1) cells to 3'-deoxyadenosine 5'-triphosphate. *Nucleic Acids Res* **3**, 325–342 (1976).
142. Niramitrannon, J. & Pongprayoon, P. Exploring the binding modes of cordycepin to human adenosine deaminase 1 (ADA1) compared to adenosine and 2'-deoxyadenosine. *J Mol Model* **26**, 29 (2020).
143. Sobolev, O. V. *et al.* A Global Ramachandran Score Identifies Protein Structures with Unlikely Stereochemistry. *Structure* **28**, 1249-1258.e2 (2020).

144. Khatoon, N., Pandey, R. K. & Prajapati, V. K. Exploring Leishmania secretory proteins to design B and T cell multi-epitope subunit vaccine using immunoinformatics approach. *Sci Rep* **7**, 8285 (2017).
145. Haslam, R. J., Davidson, M. M. L. & Desjardins, J. V. Inhibition of adenylate cyclase by adenosine analogues in preparations of broken and intact human platelets. Evidence for the unidirectional control of platelet function by cyclic AMP. *Biochemical Journal* **176**, 83–95 (1978).
146. Bard, J. *et al.* Structure of Yeast Poly(A) Polymerase Alone and in Complex with 3'-dATP. *Science* (1979) **289**, 1346–1349 (2000).
147. Lingner, J. & Keller, W. 3'-end labeling of RNA with recombinant yeast poly(A) polymerase. *Nucleic Acids Res* **21**, 2917–2920 (1993).
148. Levenson, R., Kernen, J. & Housman, D. Synchronization of MEL cell commitment with cordycepin. *Cell* **18**, 1073–1078 (1979).
149. Espinosa-Rodriguez, B. A. *et al.* Metformin May Alter the Metabolic Reprogramming in Cancer Cells by Disrupting the L-Arginine Metabolism: A Preliminary Computational Study. *Int J Mol Sci* **24**, 5316 (2023).
150. Kredich, N. M. Inhibition of nucleic acid methylation by cordycepin. In vivo synthesis of S-3'-DEOXYADENOSYLMETHIONINE BY WI-L2 human lymphoblasts. *Journal of Biological Chemistry* **255**, 7380–7385 (1980).
151. Wataya, Y. *et al.* Anti-parasite activity of nucleoside analogues in Leishmania tropica promastigotes. *Nucleic Acids Symp Ser* 69–71 (1984).
152. Wataya, Y. & Hiraoka, O. 3'-Deoxyinosine as an anti-leishmanial agent: The metabolism and cytotoxic effects of 3'-deoxyinosine in Leishmaniatropica promastigotes. *Biochem Biophys Res Commun* **123**, 677–683 (1984).
153. Wang, Z. *et al.* Research Article: Binding of Cordycepin Monophosphate to AMP-Activated Protein Kinase and its Effect on AMP-Activated Protein Kinase Activation. *Chem Biol Drug Des* **76**, 340–344 (2010).
154. Pearce, E. L., Poffenberger, M. C., Chang, C.-H. & Jones, R. G. Fueling Immunity: Insights into Metabolism and Lymphocyte Function. *Science* (1979) **342**, (2013).
155. Ito, K. & Suda, T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 243–256 (2014).
156. DeBerardinis, R. J. & Chandel, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv* **2**, (2016).
157. Kang, C. *et al.* The adenosinergic machinery in cancer: In-tandem insights from basic mechanisms to therapy. *Front Immunol* **14**, (2023).

158. Pérez-González, A., Bévant, K. & Blanpain, C. Cancer cell plasticity during tumor progression, metastasis and response to therapy. *Nat Cancer* **4**, 1063–1082 (2023).
159. Yu, G. *et al.* The role and mechanisms of cordycepin in inhibiting cancer cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **57**, (2024).
160. Khan, M. A. & Tania, M. Cordycepin and kinase inhibition in cancer. *Drug Discov Today* **28**, 103481 (2023).
161. Zhang, J.-L., Xu, Y. & Shen, J. Cordycepin Inhibits Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Tumor Necrosis Factor (TNF)- α Production via Activating AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Signaling. *Int J Mol Sci* **15**, 12119–12134 (2014).
162. O'Reilly, M. L. *et al.* NF- κ B inhibition attenuates sympathetic hyperreflexia and concomitant development of autonomic dysreflexia and immune dysfunction after spinal cord injury. *Commun Biol* **8**, 787 (2025).
163. Vasiukov, G. *et al.* Adenosine/TGF β axis in regulation of mammary fibroblast functions. *PLoS One* **16**, e0252424 (2021).
164. Vasiukov, G. *et al.* Myeloid Cell-Derived TGF β Signaling Regulates ECM Deposition in Mammary Carcinoma via Adenosine-Dependent Mechanisms. *Cancer Res* **80**, 2628–2638 (2020).
165. Welihinda, A. A., Kaur, M., Greene, K., Zhai, Y. & Amento, E. P. The adenosine metabolite inosine is a functional agonist of the adenosine A2A receptor with a unique signaling bias. *Cell Signal* **28**, 552–560 (2016).
166. Haskó, G. & Pacher, P. Regulation of Macrophage Function by Adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 865–869 (2012).
167. Deng, Q. *et al.* Cordycepin enhances anti-tumor immunity in colon cancer by inhibiting phagocytosis immune checkpoint CD47 expression. *Int Immunopharmacol* **107**, 108695 (2022).
168. Chaicharoenaudomrung, N., Kunhorm, P. & Noisa, P. Cordycepin Enhances the Cytotoxicity of Human Natural Killer Cells against Cancerous Cells. *Biol Pharm Bull* **46**, b23-00221 (2023).
169. Bi, J. CD226: a potent driver of antitumor immunity that needs to be maintained. *Cell Mol Immunol* **19**, 969–970 (2021).
170. Chen, R. *et al.* Single-cell RNA sequencing indicates cordycepin remodels the tumor immune microenvironment to enhance TIGIT blockade's anti-tumor effect in colon cancer. *Int Immunopharmacol* **126**, 111268 (2024).
171. Chen, L. *et al.* Cordycepin synergizes with CTLA-4 blockade to remodel the tumor microenvironment for enhanced cancer immunotherapy. *Int Immunopharmacol* **124**, 110786 (2023).

172. Chen, X. *et al.* Adjuvant activity of cordycepin, a natural derivative of adenosine from *Cordyceps militaris*, on an inactivated rabies vaccine in an animal model. *Heliyon* **10**, e24612 (2024).
173. Normanno, N. *et al.* Breast cancer cells with acquired resistance to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib show persistent activation of MAPK signaling. *Breast Cancer Res Treat* **112**, 25–33 (2008).
174. Wang, Z. *et al.* Cordycepin Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation of Human Lung Cancer Cell Line H1975 via Inhibiting the Phosphorylation of EGFR. *Molecules* **21**, 1267 (2016).
175. Hsu, P.-Y. *et al.* Cordycepin and a preparation from *Cordyceps militaris* inhibit malignant transformation and proliferation by decreasing EGFR and IL-17RA signaling in a murine oral cancer model. *Oncotarget* **8**, 93712–93728 (2017).
176. Bos, J. L. All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO J* **17**, 6776–6782 (1998).
177. Ohtsuka, T., Shimizu, K., Yamamori, B., Kuroda, S. & Takai, Y. Activation of Brain B-Raf Protein Kinase by Rap1B Small GTP-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 1258–1261 (1996).
178. Gao, L. *et al.* Ras-Associated Protein-1 Regulates Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation and Migration in Melanoma Cells: Two Processes Important to Melanoma Tumorigenesis and Metastasis. *Cancer Res* **66**, 7880–7888 (2006).
179. Bailey, C. L., Kelly, P. & Casey, P. J. Activation of Rap1 Promotes Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Res* **69**, 4962–4968 (2009).
180. McSherry, E. A., Brennan, K., Hudson, L., Hill, A. D. & Hopkins, A. M. Breast cancer cell migration is regulated through junctional adhesion molecule-A-mediated activation of Rap1 GTPase. *Breast Cancer Research* **13**, R31 (2011).
181. Yang, Y. *et al.* Low expression of Rap1GAP is associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) and poor prognosis in gastric cancer. *Oncotarget* **8**, 8057–8068 (2017).
182. Che, Y.-L. *et al.* The C3G/Rap1 pathway promotes secretion of MMP-2 and MMP-9 and is involved in serous ovarian cancer metastasis. *Cancer Lett* **359**, 241–249 (2015).
183. Gao, W., Ye, G., Liu, L. & Wei, L. The downregulation of Rap1 GTPase-activating protein is associated with a poor prognosis in colorectal cancer and may impact on tumor progression. *Oncol Lett* (2018) doi:10.3892/ol.2018.8305.

184. Shah, S. *et al.* Downregulation of Rap1Gap: A Switch from DCIS to Invasive Breast Carcinoma via ERK/MAPK Activation. *Neoplasia* **20**, 951–963 (2018).
185. Jiang, Y. & Zhan, H. Communication between EMT and PD-L1 signaling: New insights into tumor immune evasion. *Cancer Lett* **468**, 72–81 (2020).
186. Kumar, S. *et al.* Crk adaptor protein promotes PD-L1 expression, EMT and immune evasion in a murine model of triple-negative breast cancer. *Oncoimmunology* **7**, e1376155 (2018).
187. Liang, S.-M. *et al.* Cordycepin disrupts leukemia association with mesenchymal stromal cells and eliminates leukemia stem cell activity. *Sci Rep* **7**, 43930 (2017).
188. Zhang, P. *et al.* Cordycepin (3'-deoxyadenosine) suppressed HMGA2, Twist1 and ZEB1-dependent melanoma invasion and metastasis by targeting miR-33b. *Oncotarget* **6**, 9834–9853 (2015).
189. Lee, E., Kim, W. & Moon, S. Cordycepin suppresses TNF-alpha-induced invasion, migration and matrix metalloproteinase-9 expression in human bladder cancer cells. *Phytotherapy Research* **24**, 1755–1761 (2010).
190. Wu, S. *et al.* Cordycepin remodels the tumor microenvironment of colorectal cancer by down-regulating the expression of PD-L1. *J Cancer Res Clin Oncol* **149**, 17567–17579 (2023).
191. Wang, X., Luo, C., Cheng, X. & Lu, M. Lithium and an EPAC-specific inhibitor ESI-09 synergistically suppress pancreatic cancer cell proliferation and survival. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **49**, 573–580 (2017).
192. Wang, Z. *et al.* Cyclic AMP Mimics the Anti-ageing Effects of Calorie Restriction by Up-Regulating Sirtuin. *Sci Rep* **5**, 12012 (2015).
193. Ren, R., Ocampo, A., Liu, G.-H. & Izpisua Belmonte, J. C. Regulation of Stem Cell Aging by Metabolism and Epigenetics. *Cell Metab* **26**, 460–474 (2017).
194. Wang, Q., Su, X., Zhu, R. & Zhao, R. C. cAMP Agonist Forskolin Disrupts Mitochondrial Metabolism and Induces Senescence in Human Mesenchymal Cells. *Stem Cells Dev* **32**, 87–98 (2023).
195. Ghosh, A. K. Acetyltransferase p300 Is a Putative Epidrug Target for Amelioration of Cellular Aging-Related Cardiovascular Disease. *Cells* **10**, 2839 (2021).
196. Chakrabarty, R. P. & Chandel, N. S. Mitochondria as Signaling Organelles Control Mammalian Stem Cell Fate. *Cell Stem Cell* **28**, 394–408 (2021).
197. Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. Mechanisms underlying T cell ageing. *Nat Rev Immunol* **19**, 573–583 (2019).

198. Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E. & Ramalho-Santos, M. Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 36–47 (2011).