

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



**CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA HIPOXIA EN
SENESCENCIA Y CÓMO SU ALTERACIÓN
CONTRIBUYE A LA INMORTALIZACIÓN CELULAR Y LA
TUMORIGÉNESIS**

Daniel Otero Albiol

Graduado en Biología

Tesis doctoral

Director: Amancio Carnero Moya

Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)

2020

Dr. Amancio Carnero Moya y Dr. Juan José Toledo Aral,

CERTIFICAN:

Que el trabajo experimental presentado en esta memoria para optar al título de Doctor en Biología Molecular, Biomedicina e Investigación Clínica por la Universidad de Sevilla titulado **“CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA HIPOXIA EN SENESCENCIA Y CÓMO SU ALTERACIÓN CONTRIBUYE A LA INMORTALIZACIÓN CELULAR Y LA TUMORIGÉNESIS”** ha sido realizado por Daniel Otero Albiol en el grupo de Biología Molecular del Cáncer del área de Oncohematología y Genética del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) bajo la dirección del Dr. Amancio Carnero Moya y la tutela académica del Dr. Juan José Toledo Aral.

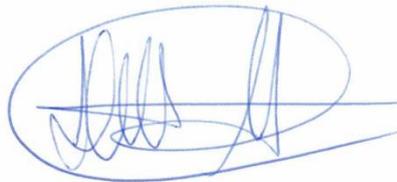
Sevilla, septiembre de 2020

El doctorando,



Daniel Otero Albiol

El director,



Dr. Amancio Carnero Moya

El tutor académico,



Dr. Juan José Toledo Aral

RESUMEN

La senescencia celular es un estado fisiológico complejo de las células caracterizado por la parada proliferativa, los cambios en la estructura de la cromatina, modificaciones epigenéticas específicas, cambios metabólicos, alta actividad β -galactosidasa ácida, un fenotipo de secreción aumentada, además de la alteración de orgánulos, entre otras características fenotípicas. La senescencia celular puede ser inducida a través de diferentes mecanismos intrínsecos y extrínsecos como el acortamiento telomérico y la respuesta a daño en el ADN, la detección de señales oncogénicas, el estrés oxidativo o el tratamiento con terapias contra el cáncer. La senescencia es necesaria en la regulación de diversos procesos fisiológicos como la supresión tumoral, el desarrollo de estructuras del embrión, la cicatrización de tejidos y la reprogramación celular implicada en la regeneración tisular. Además, la aparición de células senescentes correlaciona con el envejecimiento de los tejidos y está implicada en los efectos deletéreos de patologías asociadas a él.

A pesar de la relevancia fisiológica de la senescencia, se desconoce cómo la hipoxia, que es característica en todos los tejidos del organismo, modula su iniciación y desarrollo. De este modo, no está claro si la hipoxia actúa como un estrés que induce senescencia, o bien, se trata de un estímulo capaz de promover la proliferación y la inmortalización previa a la transformación maligna. Existen múltiples evidencias de la contribución de la hipoxia a la malignidad tumoral. Además, la hipoxia promueve el mantenimiento de la pluripotencia y la autorrenovación tanto de células madre embrionarias (ESCs) como de células madre adultas, células pluripotentes inducidas (iPSCs) y células madre tumorales (CSCs). Por tanto, decidimos estudiar el efecto de la hipoxia sobre la senescencia y la inmortalización celular y su posible contribución a la tumorigénesis.

Hemos comparado la vida proliferativa de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) cultivados en hipoxia (3% O₂) con la de MEFs cultivados en normoxia (20% O₂). Los MEFs prolongan su vida proliferativa si se cultivan en hipoxia desde el explante del embrión, mientras que aquellos que crecen en normoxia cesan la proliferación y muestran características senescentes tras 30 días de en un protocolo 3T3. Los MEFs de hipoxia presentan menor expresión de *p21^{Cip1}*, *p15^{INK4b}* y *p16^{INK4a}*. Aunque poseen signos de estrés proliferativo en hipoxia, con altos niveles de p-H2AX (Ser139) y p-p53 (Ser15), esto no desemboca en parada proliferativa a través de la activación de p53. Estos MEFs se mantienen en cultivo ininterrumpido en hipoxia al menos durante 6 meses.

Ante las evidencias de la hipoxia como un factor que promueve la autorrenovación y la pluripotencia en células madre, hemos encontrado una mayor expresión de genes de desdiferenciación y relacionados con las propiedades de células madre en las muestras de hipoxia, entre los que destacan *Oct3/4*, *Sox2*, *Sox9*, *Klf2*, *Klf4*, *c-Myc*, *Bmi1* y *Nanog*. Además, en las muestras inmortalizadas en hipoxia, se sobreexpresa *Tfcp2l1*, un regulador central de la pluripotencia y la autorrenovación de ESCs.

La variación de los niveles de expresión de *Tfcp2l1* puede provocar la entrada en senescencia. En el caso de la disminución de la expresión, el uso de shARNs contra el ARNm de *Tfcp2l1* provoca la entrada en senescencia con parada proliferativa, alta expresión de *p16^{INK4a}* y alta actividad β-galactosidasa ácida tanto en normoxia como en hipoxia. En el caso de la expresión ectópica de muy altos niveles de *Tfcp2l1*, se produce entrada en senescencia con alta actividad β-galactosidasa ácida, además de un aumento de la expresión de *p16^{INK4a}*, *p21^{Cip1}* y, al mismo tiempo, sobreexpresión de los factores de Yamanaka *Oct3/4*, *Sox2* y *Klf4*. Esto sugiere que la senescencia inducida por altos niveles de *Tfcp2l1* es similar a la inducida por oncogenes (OIS) o por reprogramación (RIS). Sólo cuando se expresan ectópicamente en normoxia, niveles de *Tfcp2l1* similares a los fisiológicos inducidos por la hipoxia, se consigue aumentar la vida proliferativa de los MEFs.

El incremento y mantenimiento de expresión de *Tfcp2l1* en hipoxia está inducido, muy probablemente, por la unión de Hif1α a un “*enhancer*” cercano a *Tfcp2l1* en el ADN. Esto lo hemos comprobado simulando hipoxia en normoxia con inhibidores de las PHDs, con la expresión ectópica de un mutante de activación constitutiva de *Hif1α* en normoxia y mediante el estudio de las zonas reguladoras asociadas a *Tfcp2l1* en el genoma.

Además de incrementar la expresión de *Tfcp2l1*, la hipoxia promueve una mayor actividad de Tfcp2l1 como factor transcripcional. Hemos realizado ChIP-Seq de Tfcp2l1 en células de normoxia y de hipoxia y hemos observado que se une a un mayor número de secuencias asociadas a genes en el ADN. En concreto, Tfcp2l1 promueve la expresión de genes reguladores de la proliferación que, en muchos casos, también están relacionados con las propiedades de células madre, como son *Sox2*, *Sox9* y *Tgfa*.

La capacidad de Tfcp2l1 de promover la proliferación y la pluripotencia también es relevante en la reprogramación. Hemos comprobado el papel causal de *Tfcp2l1* en el incremento de la eficiencia de reprogramación causada por la hipoxia. La expresión ectópica de *Tfcp2l1* en normoxia incrementa el número de colonias iPSCs al igual que la hipoxia. Además, la disminución de su expresión en hipoxia mediante shARNs disminuye el número de colonias generadas. Además, la expresión de *Tfcp2l1* correlaciona positivamente con la expresión de *Nanog* en iPSCs generadas en hipoxia y en normoxia, y negativamente con la de *p21^{Cip1}* y *p16^{INK4a}*.

Nuestros datos sugieren que la activación de *Tfcp2l1* por la hipoxia podría ser relevante en la immortalización previa a la transformación maligna, facilitando la tumorigénesis. Además, en el microambiente tumoral, que es hipóxico, la expresión de *Tfcp2l1* podría favorecer la aparición de CSCs al promover la pluripotencia y, por tanto, la desdiferenciación celular.

SUMMARY

Cellular senescence is a complex physiological state of the cell which main features are proliferative arrest, changes in chromatin structure, specific epigenetic modifications, metabolic changes, high acid β -galactosidase activity, an increased secretion phenotype and organelle alterations. Senescence can be induced by intrinsic and extrinsic stimuli like telomere shortening and DNA damage response, oncogenic signaling detection, oxidative stress, or anti-cancer therapies. Cellular senescence is necessary for the regulation of different physiological processes like tumor suppression, development of embryo structures, wound repair and cellular reprogramming in tissue repair. Furthermore, cellular senescence correlates with tissue aging and it is involved in the deleterious effects of the diseases associated with it.

Despite the physiological relevance of senescence, it is still unknown if hypoxia, which is a feature of every tissue in the organism, modulates its initiation and development. Thus, it is unclear whether hypoxia works as stress which induces senescence, or it is a stimulus able to promote proliferation and immortalization prior to malignant transformation. It has been shown that hypoxia contributes to tumor malignancy. Moreover, hypoxia supports pluripotency maintenance and self-renewal in embryonic stem cells (ESCs), adult stem cells, induced pluripotent stem cells (iPSCs) and cancer stem cells (CSCs). For these reasons, we decided to study the effect of hypoxia on cellular senescence and immortalization and its possible contribution to tumorigenesis.

We have compared the lifespan of mouse embryonic fibroblasts (MEFs) when cultured in hypoxia (3% O₂) to the lifespan of MEFs cultured in normoxia (20% O₂). The lifespan of MEFs is increased when they are cultured in hypoxia right after their isolation from the embryo. However, those MEFs which are cultured in normoxia stop proliferating and show senescence features after 30 days in a 3T3 protocol. MEFs in hypoxia express lower levels of *p21^{Cip1}*, *p15^{INK4b}* and *p16^{INK4a}*. MEFs have signs of proliferative stress in hypoxia, with high levels of p-H2AX (Ser139) and p-p53 (Ser15), but without p53-induced proliferation arrest. Additionally, we have checked the immortalization of the MEFs in hypoxia culturing these cells, at least, for 6 months.

Considering all the evidences of hypoxia as a factor promoting self-renewal and pluripotency in stem cells, we have studied the expression of differentiation/dedifferentiation and stem-related genes. We have found overexpression of dedifferentiation and stem-related genes like *Oct3/4*, *Sox2*, *Sox9*, *Klf2*, *Klf4*, *c-Myc*, *Bmi1* and *Nanog* in samples of cells cultured in hypoxia. Furthermore, we found overexpression of *Tfcp2l1*, which is a main regulator of pluripotency and self-renewal of ESCs, in MEFs immortalized by hypoxia.

Variations in the expression levels of *Tfcp2l1* can lead to cellular senescence. In the case of expression decrease, the ectopic expression of shRNAs against the mRNA of *Tfcp2l1* induces senescence with proliferation arrest, high expression of *p16^{INK4a}* and acid β -galactosidase activity in normoxia and hypoxia. In the case of ectopic expression of high levels of *Tfcp2l1*, cells senesce

with an increase in acid β -galactosidase activity, increased $p16^{INK4a}$ and $p21^{Cip1}$ expression levels and, also overexpression of Yamanaka factors *Oct3/4*, *Sox2* and *Klf4*. This suggests that senescence induced by high levels of *Tfcp2l1* is similar to oncogene induced senescence (OIS) or reprogramming induced senescence (RIS). Only the ectopic induction of expression levels of *Tfcp2l1* similar to those promoted by hypoxia can produce an increase in the lifespan of MEFs in normoxia.

The expression of *Tfcp2l1* in hypoxia is very likely increased and maintained by the binding of Hif1 α to an enhancer region close to *Tfcp2l1* in the DNA. To check this, we have simulated hypoxia in normoxia using a PHDs inhibitor, we have also induced ectopic expression of a *Hif1 α* constitutively active mutant and, finally, we have studied the regulator regions associated to *Tfcp2l1* in the DNA.

Hypoxia increases the expression of *Tfcp2l1* and promotes its activity as transcription factor. We have performed ChIP-Seq of Tfcp2l1 in cells from normoxia and hypoxia and we found that Tfcp2l1 binds to more sequences associated to genes in MEFs immortalized in hypoxia compared to senescent MEFs cultured in normoxia. Specifically, Tfcp2l1 promotes the expression of genes which regulate proliferation, which in many cases, are also related to stem cell properties, such as *Sox2*, *Sox9* and *Tgfa*.

The capacity of *Tfcp2l1* to promote proliferation and pluripotency is relevant in cellular reprogramming too. We have checked the causal role of *Tfcp2l1* in the increase of reprogramming efficiency caused by hypoxia. As hypoxia, the ectopic expression of *Tfcp2l1* in normoxia increases the number of iPSCs colonies. Moreover, the downregulation of *Tfcp2l1* expression in hypoxia with shRNAs decreases the number of colonies. Additionally, the expression of *Tfcp2l1* positively correlates with the expression of *Nanog* in iPSCs generated in hypoxia and normoxia, and negatively correlates with $p16^{INK4a}$ and $p21^{Cip1}$.

Our data suggests that the activation of *Tfcp2l1* by hypoxia could be relevant in the immortalization prior to malignant transformation, facilitating tumorigenesis. Furthermore, in the tumoral microenvironment, which is hypoxic, the expression of *Tfcp2l1* could support the presence of CSCs by promoting pluripotency and, consequently, cellular dedifferentiation.

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
SUMMARY	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ABREVIATURAS.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Senescencia celular	3
2. Características de la senescencia celular	3
2.1. Alteraciones de la señalización celular en senescencia	3
2.1.1. Parada de ciclo celular	3
2.1.2. Reversibilidad de la senescencia celular	4
2.1.3. Resistencia a apoptosis.....	4
2.1.4. Cambios en la cromatina.....	4
2.1.5. Modificaciones epigenéticas en senescencia celular.....	5
2.1.6. Cambios metabólicos	6
2.1.7. Fenotipo secretor asociado a senescencia	7
2.2. Alteraciones estructurales y morfológicas en senescencia celular	8
2.2.1. Cambios en autofagia y lisosomas.....	8
2.2.2. Mitocondria disfuncional	10
2.2.3. Morfología celular asociada a senescencia celular.....	10
3. Mecanismos que desencadenan la senescencia celular	10
3.1. Senescencia replicativa y daño en el ADN	10
3.2. Efectores de la parada proliferativa en senescencia celular	12
3.2.1. p53.....	12
3.2.2. Inhibidores de CDK	12
3.3. Senescencia inducida por oncogenes	13
3.4. Senescencia inducida por estrés oxidativo	14
3.5. Senescencia inducida por terapia	16
4. Implicación de la senescencia celular en procesos fisiológicos y patológicos	17
4.1. Senescencia celular en desarrollo embrionario	17

4.2.	Senescencia celular en cicatrización	18
4.3.	Relación entre la senescencia celular y el envejecimiento del organismo	19
5.	Hipoxia y senescencia celular	19
5.1.	Mecanismos de adaptación fisiológica a niveles bajos de oxígeno	19
5.2.	Relación entre la respuesta molecular a hipoxia y senescencia celular	21
6.	Hipoxia y capacidades de célula madre	23
6.1.	Hipoxia y células madre embrionarias y adultas	23
6.2.	Hipoxia y células madre pluripotentes inducidas (iPSCs)	24
6.3.	Hipoxia y células madre tumorales	25
	OBJETIVOS	29
	MATERIALES Y MÉTODOS	33
1.	Reactivos biológicos utilizados	35
1.1.	Plásmidos	35
1.2.	Cepas bacterianas	35
1.3.	Antibióticos	35
1.4.	Tratamientos	36
2.	Técnicas básicas de biología molecular	36
2.1.	Transformación de células quimiocompetentes	36
2.2.	Extracción de ADN plasmídico	36
2.3.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
2.4.	Reacciones de digestión sobre el ADN	37
2.5.	Clonación mediante la tecnología de recombinación Gateway	37
2.5.1.	Clonación de productos de PCR	37
2.5.2.	Reacción TOPO	37
2.5.3.	Reacción de recombinación LR	38
3.	Cultivos celulares	38
3.1.	Líneas celulares	38
3.2.	Cultivo y conservación de las líneas celulares	38
3.3.	Generación de MEFs	39
3.4.	Infección lentiviral	39
3.4.1.	Transfección células HEK-293-T mediante reactivo polietilenimina (PEI)	39

3.4.2.	Producción de virus e infección/transducción	39
3.5.	Selección de células infectadas	39
3.6.	Generación de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs)	40
4.	Ensayos celulares	41
4.1.	Protocolo 3T3 modificado para el cultivo de MEFs	41
4.2.	Actividad β -galactosidasa ácida	41
4.3.	Tratamientos de MEFs	41
5.	Técnicas de análisis de expresión a nivel de ARN	41
5.1.	Extracción de ARN total	41
5.2.	Transcripción reversa	42
5.3.	PCR cuantitativa a tiempo real	42
5.4.	PCR “array”	43
5.4.1.	Cuantificación de ARNm y transcripción reversa	43
5.4.2.	PCR cuantitativa a tiempo real	43
5.4.3.	Análisis de los resultados	43
6.	Técnicas de análisis de expresión a nivel de proteína	44
6.1.	Extracción de proteína total	44
6.2.	Western blot	44
6.3.	Cuantificación de bandas de western blot	45
7.	Inmunoprecipitación de la cromatina	45
7.1.	ChIP-Seq (“ChIPmentation”)	45
7.1.1.	Fijación, inmunoprecipitación y preparación de las librerías de secuenciación ..	45
7.1.2.	Análisis de los resultados de secuenciación del ChIP-Seq	47
7.2.	ChIP-qPCR de validación	47
8.	Análisis bioinformáticos de datos públicos	49
8.1.	Análisis de regiones reguladoras asociadas a <i>Tfcp2l1</i>	49
8.2.	Meta-análisis de expresión de iPSCs	49
	RESULTADOS	51
1.	Efecto de la hipoxia sobre la senescencia celular	53
1.1.	Efecto de la hipoxia sobre el crecimiento y la aparición de características de senescencia celular	53

1.2. Efecto de la hipoxia sobre la expresión de genes relacionados con las propiedades de células madre	55
2. Estudio del papel de <i>Tfcp2l1</i> en el efecto causado por la hipoxia en senescencia	58
2.1. Efecto de la disminución de la expresión de <i>Tfcp2l1</i>	58
2.2. Efecto del aumento de la expresión de <i>Tfcp2l1</i>	61
3. Estudio de la activación transcripcional de <i>Tfcp2l1</i> en hipoxia	64
4. Estudio de las dianas transcripcionales de <i>Tfcp2l1</i> en hipoxia y normoxia	70
5. Estudio del papel de <i>Tfcp2l1</i> en el efecto causado por la hipoxia en la generación de iPSCs.....	82
5.1. Efecto de la sobreexpresión de <i>Tfcp2l1</i> en reprogramación celular	82
5.2. Efecto de la reducción de la expresión de <i>Tfcp2l1</i> en reprogramación celular	82
5.3. Meta-análisis de la expresión de <i>Tfcp2l1</i> en reprogramación	85
DISCUSIÓN.....	87
CONCLUSIONES.....	101
CONCLUSIONS	105
BIBLIOGRAFÍA.....	109
ANEXO: CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS DURANTE LA ETAPA DE DOCTORADO	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura MM1. Cronología del cultivo de MEFs- <i>Nanog-GFP</i> para la generación de iPSCs.	40
Figura R1. La hipoxia puede retrasar la aparición de senescencia celular <i>in vitro</i>	54
Figura R2. La hipoxia puede retrasar la expresión de marcadores de senescencia celular	55
Figura R3. La hipoxia puede aumentar la expresión de genes relacionados con las propiedades de célula madre	57
Figura R4. La hipoxia puede alterar la expresión de genes relacionados con las propiedades de célula madre	58
Figura R5. La reducción de expresión <i>Tfcp2l1</i> provoca senescencia prematura	59
Figura R6. La reducción de expresión de <i>Tfcp2l1</i> mediante shARN afecta a los niveles de ARNm de genes alterados por la hipoxia.....	60
Figura R7. La sobreexpresión de <i>Tfcp2l1</i> provoca senescencia prematura.	61
Figura R8. La sobreexpresión de <i>Tfcp2l1</i> en normoxia afecta a los niveles de ARNm y proteína de genes alterados por la hipoxia	62
Figura R9. La sobreexpresión de <i>Tfcp2l1</i> en niveles similares a los alcanzados por la hipoxia extiende la vida proliferativa de MEFs cultivados en normoxia	64
Figura R10. DMOG aumenta los niveles de <i>Tfcp2l1</i> y de genes cuya expresión es alterada por la hipoxia.	65
Figura R11. La sobreexpresión de <i>Hif1α-3M</i> activa dianas de la hipoxia en condiciones de normoxia y provoca senescencia prematura	66
Figura R12. <i>Tfcp2l1</i> comparte un TAD junto a <i>Gli2</i> , pero forma su propio subTAD dentro de este.....	67
Figura R13. Existen múltiples posibles promotores y <i>enhancers</i> en las regiones cercanas a <i>Tfcp2l1</i> en el ADN.	68
Figura R14. <i>Tfcp2l1</i> se une a un mayor número de secuencias asociadas a genes en inmortalización (Inm).	70
Figura R15. El motivo de unión al ADN de <i>Tfcp2l1</i> se encuentra enriquecido en los picos comunes (Com) y en los de la muestra de células inmortalizadas (Inm)	71
Figura R16. Número de genes asociados a los picos específicos y comunes de cada muestra.	72
Figura R17. Ejemplo de picos asociados a genes en la muestra senescente (Sen).....	72
Figura R18. Ejemplo de picos asociados a genes comunes a senescencia e inmortalización en la muestra (Com).....	73
Figura R19. Ejemplo de picos asociados a genes en la muestra inmortalizada (Inm)	74

Figura R20. Los picos de <i>Tfcp2l1</i> en células senescentes (Sen) se asocian a genes implicados en diversos procesos biológicos	75
Figura R21. Los picos de <i>Tfcp2l1</i> en células inmortalizadas por la hipoxia (Inm) se asocian a genes implicados en diversos procesos biológicos entre los que destaca la regulación de la proliferación.....	77
Figura R22. <i>Tfcp2l1</i> se une a genes relacionados con la regulación de la proliferación en células inmortalizadas en hipoxia (Inm) de manera específica.	78
Figura R23. Ejemplos de picos asociados a genes relacionados con la regulación de la proliferación en las células inmortalizadas en hipoxia (Inm).....	80
Figura R24. En los MEFs inmortalizados en hipoxia <i>Tfcp2l1</i> se une al ADN cerca de las secuencias de <i>Tgfa</i> , <i>Sox2</i> y <i>Sox9</i> cuya expresión aumenta en estas condiciones.....	81
Figura R25. La sobreexpresión de <i>Tfcp2l1</i> puede replicar el efecto de la hipoxia en reprogramación.	83
Figura R26. La reducción de la expresión de <i>Tfcp2l1</i> puede reducir el efecto de la hipoxia en reprogramación.	84
Figura R27. La expresión de <i>Tfcp2l1</i> correlaciona positivamente con <i>Nanog</i> y negativamente con efectores de la senescencia en el proceso de reprogramación y en hipoxia.	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I 1. Incremento de la vida proliferativa <i>in vitro</i> en distintos modelos de fibroblastos de mamífero.	21
Tabla MM 1. Plásmidos utilizados.....	35
Tabla MM 2. Líneas celulares utilizadas.....	38
Tabla MM 3. Sondas TaqMan	43
Tabla MM 4. Anticuerpos utilizados	45
Tabla MM 5. Cebadores utilizados en CHIP-qPCR.....	49
Tabla R1. Es probable encontrar motivos de unión de Hif1 α al ADN junto a marcas H3K4me3 cerca del gen <i>Tfcp2l1</i>	68
Tabla R2. Es probable encontrar motivos de unión de Hif1 α al ADN junto a marcas H3K27ac cerca del gen <i>Tfcp2l1</i>	69
Tabla R3. Genes asociados a la regulación de la proliferación en las células inmortalizadas en hipoxia (Inm).....	78

ABREVIATURAS

1. 53BP1: proteína 1 de unión al supresor de tumores p53.
2. ADN: ácido desoxirribonucleico.
3. ADP: adenosín difosfato.
4. AMP: adenosín monofosfato.
5. AMPK: proteína quinasa activada por AMP.
6. ARF: marco alternativo de lectura.
7. ARN: ácido ribonucleico.
8. ARNm: ARN mensajero.
9. ATP: adenosín trifosfato.
10. Bax: regulador de la apoptosis asociado a BCL-2 asociado a X
11. BCL-2: regulador de la apoptosis BCL-2
12. CDC2: proteína 2 del control de la división celular.
13. CDKs: quinasas dependientes de ciclina.
14. CIP: cóctel de inhibidores de proteasas.
15. CKIs: inhibidores de CDKs.
16. CSCs: células madre tumorales.
17. CTCs: células de tumor circulantes.
18. DDR: respuesta a daño en el ADN.
19. DNA-SCARS: segmentos de ADN con alteraciones de cromatina que refuerzan la senescencia.
20. DSBs: roturas de doble cadena en el ADN.
21. EMT: transición epitelio-mesénquima
22. EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
23. ER: retículo endoplasmático.
24. ESCs: células madre embrionarias.
25. FIH1: factor inhibidor de HIF1 α .
26. H2AX: variante X de la histona H2A.
27. H3K27: residuo de lisina 27 de la histona H3
28. H3K27ac: residuo de lisina 27 de la histona H3 acetilado.
29. H3K27me2/3: residuo de lisina 27 de la histona H3 dimetilado o trimetilado.
30. H3K4: residuo de lisina 4 de la histona H3.
31. H3K4me3: residuo de lisina 4 de la histona H3 trimetilado.
32. HIFs: factores inducibles por hipoxia, en los que se incluyen las subunidades HIF α (HIF1 α , HIF2 α y HIF3 α) y HIF1 β .
33. HRE: elementos de respuesta a hipoxia.
34. IgG: inmunoglobulina G.
35. iPSCs: células madre pluripotentes inducidas.
36. MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos.

37. MEFs: fibroblastos embrionarios de ratón.
38. mTOR: diana de la rapamicina en mamíferos.
39. mTORC1 y mTORC2: mTOR complejos 1 y 2.
40. NAD⁺: dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada.
41. NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida.
42. NFκB: factor nuclear kappa B.
43. OIS: senescencia inducida por oncogenes.
44. OSKM: factores de Yamanaka *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*.
45. PcG: grupo de proteína Polycomb.
46. PHDs: enzimas con dominio prolil hidroxilasa.
47. PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
48. pRB: proteína del Retinoblastoma.
49. PRC1 y PRC2: complejos de proteínas represoras 1 y 2.
50. RIS: senescencia inducida por reprogramación.
51. ROS: especies reactivas del oxígeno.
52. SADSs: distensión de satélites asociada a senescencia.
53. SAHFs: foci de heterocormatina asociados a senescencia.
54. SASP: fenotipo secretor asociado a senescencia.
55. shARN: "*short hairpin*" ARN, ARN artificial de interferencia.
56. TASC: compartimento de acoplamiento espacial autofágico de mTOR.
57. TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
58. TERT: enzima telomerasa transcriptasa reversa.
59. TIS: senescencia inducida por terapia.
60. VHL: proteína von Hippel-Lindau.
61. WT: fenotipo salvaje.
62. X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido.

INTRODUCCIÓN

1. Senescencia celular

La senescencia es un estado celular caracterizado, principalmente, por la parada proliferativa, cuyo fenotipo asociado la distingue de otros estados celulares en los que se detiene la proliferación como la quiescencia, la diferenciación terminal o el agotamiento celular típico de células madre y linfocitos T¹. Aunque clásicamente se ha definido la parada proliferativa en senescencia como definitiva, algunos autores apoyan la posible recuperación de la proliferación bajo ciertas condiciones genéticas y/o transcriptómicas². El fenotipo senescente presenta características muy variables que se adquieren en múltiples pasos y que dependen del contexto genético y el tipo celular. Sin embargo, entre esta variedad de características destacan los cambios en la estructura de la cromatina y modificaciones epigenéticas específicas, cambios metabólicos, alta actividad β -galactosidasa ácida, un fenotipo de secreción aumentada de citoquinas y quimioquinas, además de la alteración de orgánulos y la morfología citoplasmática, entre otras. La senescencia puede ser inducida a través de diferentes mecanismos intrínsecos y extrínsecos, entre ellos se incluyen el acortamiento telomérico y la respuesta a daño en el ADN, la detección de señales oncogénicas, el daño producido por quimioterápicos y radiación ionizante o el estrés oxidativo^{3,4}.

Ha sido ampliamente demostrado que la senescencia es necesaria en la regulación de diversos procesos fisiológicos. Entre ellos destaca la supresión tumoral, sobre la que se han recogido una gran cantidad de evidencias tanto en modelos *in vivo* como en pacientes^{5,6}. Además de esto, la senescencia participa en el desarrollo de diversas estructuras del embrión, también regula la cicatrización de tejidos y participa en la reprogramación celular implicada en la regeneración tisular⁷. Por otro lado, la aparición de células senescentes correlaciona con el envejecimiento de los tejidos y está implicada en los efectos deletéreos de patologías asociadas a él⁸.

2. Características de la senescencia celular

2.1. Alteraciones de la señalización celular en senescencia

2.1.1. Parada de ciclo celular

El ciclo celular comprende 4 fases conocidas como G1, G2, S y M. La progresión de una fase del ciclo celular a la siguiente está mediada, principalmente, por la acción conjunta de ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Participan 10 ciclinas agrupadas en 4 clases (A, B, D y E) que se sintetizan y degradan de manera específica a lo largo de las distintas fases del ciclo, regulando así la actividad de las CDKs. De estas últimas, 3 tienen función en interfase o fase S (CDK2, CDK4 y CDK6) y 1 tiene función en la mitosis (CDK1, también conocida como CDC2). Por lo general, las células senescentes poseen un contenido de ADN típico de fase G1 (2N). Esto sucede debido a la alta expresión de inhibidores de CDKs (CKIs) pertenecientes a la familia INK4 y la familia CIP/KIP. Estos CKIs inhiben la acción de CDK2, CDK4 y CDK6 y, por tanto, detienen el ciclo celular en G1. Además, durante esta fase del ciclo, existe un punto

de control denominado *punto de restricción* o *punto R*. Aquí se integran las señales intrínsecas y extrínsecas para permitir la transición hacia fase S. Al inducirse senescencia, diferentes factores confluyen para mantener activa a la proteína retinoblastoma (pRB) y bloquear así la transición G1/S. Entre los distintos factores, es muy importante la alta expresión de los CKIs^{9,10}.

2.1.2. Reversibilidad de la senescencia celular

Existen múltiples estudios que apoyan la entrada de nuevo en ciclo por parte de las células senescentes. Por ejemplo, la pérdida puntual de proteínas de la familia de pRB permite el reinicio del ciclo celular de fibroblastos que han alcanzado senescencia inducida por la sobreexpresión de RAS mutado¹¹. En senescencia replicativa, la inactivación de p53 también permite la vuelta a la proliferación si los niveles de p16^{INK4a} son bajos¹². También se ha demostrado que JMJD2C y LSD1, proteínas demetilantes de H3K9, son capaces de promover la proliferación tras la parada causada por la senescencia inducida por oncogenes (OIS)¹³. En esta misma idea se basan los estudios que abogan por la reversibilidad de la senescencia inducida por terapia (TIS) para explicar la entrada como células durmientes de células tumorales que posteriormente puede causar la recaída en pacientes de cáncer, como se ha observado en cáncer de mama, colon, pulmón, próstata o glioblastoma^{14–19}.

2.1.3. Resistencia a apoptosis

Las células senescentes se caracterizan por una señalización en favor de la supervivencia que confiere resistencia a la apoptosis o muerte celular programada. En condiciones normales, ante estreses de diferente naturaleza, como los que producen daño grave en el ADN, se detecta la inviabilidad celular y se activan señales proapoptóticas. Entre estas señales destacan aquellas promovidas por la actividad de p53, como la activación de sus dianas transcripcionales *BAX* o *NOXA*²⁰. Sin embargo, las células senescentes presentan una alta actividad de moléculas con función antiapoptótica o de supervivencia como aquellas de la familia BCL-2, BCL-xL y BCL-w, PI3K o p21^{CIP1}^{3,4,21}. Se ha comprobado utilizando modelos deficientes en *p21^{CIP1}* que su señalización es esencial para la resistencia a apoptosis en senescencia. En ausencia de *p21^{CIP1}*, la acumulación de daño en el ADN provoca la activación de JNK y de caspasas, vía ATM y NFκB, lo cual, permite que se lleve a cabo la apoptosis. Esta señalización en favor de la supervivencia también se ha observado en células tumorales²². Además, *in vivo*, la inhibición específica de las moléculas antiapoptóticas BCL-W y BCL-XL logra eliminar células senescentes en pulmón y en la epidermis²¹.

2.1.4. Cambios en la cromatina

Las células senescentes se caracterizan por acumular daño en el ADN, lo cual tiene consecuencias sobre la estructura de la cromatina. Así, en células senescentes se forman foci nucleares denominados segmentos con alteraciones de cromatina que refuerzan la senescencia (DNA-SCARS) y se mantienen permanentemente en la célula. Aunque contienen proteínas activas de reparación del ADN como CHK2 o p53 al igual que los foci transitorios de reparación de daño en el ADN, difieren de ellos por no contener ADN de simple cadena o ADN en síntesis,

además de asociarse a cuerpos nucleares PML y carecer de proteínas RPA y RAD5. Estos foci pueden promover el fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) y la parada de ciclo celular, para la cual, necesitan de p53 y pRB, aunque su formación es independiente de ambas proteínas²³. También es posible observar en células senescentes foci de heterocromatina asociados a senescencia (SAHFs). Estas estructuras coinciden con los promotores de genes de ciclo celular que responden a factores de transcripción E2F, silenciándolos en colaboración con pRB^{24,25}. Los SAHFs se originan a partir de la reorganización espacial de marcas epigenéticas represoras como metilación de H3K9, HP1 o macroH2A y carecen de la histona “*linker*” H1^{26,27}. Otra alteración de la cromatina observada en senescencia es la distensión de satélites asociada a senescencia (SADSs) que consiste en la descondensación de la heterocromatina constitutiva formada por el ADN satélite pericentromérico. Esta alteración aparece con antelación a los SAHFs en células senescentes y difiere de ellos por conservar marcas epigenéticas canónicas y por ser independiente de rutas de señalización específicas de senescencia²⁸.

2.1.5. Modificaciones epigenéticas en senescencia celular

Las células sufren grandes cambios epigenéticos durante la adquisición del fenotipo senescente. Estas alteraciones tienen como consecuencia cambios en la accesibilidad de la cromatina y, por tanto, afectan a la expresión génica. Entre las modificaciones epigenéticas que sufren mayores variaciones durante la senescencia celular se hallan la metilación del ADN y las modificaciones de histonas²⁹.

La senescencia replicativa está asociada a ADN globalmente hipometilado en sitios CpG, a excepción de algunos de estos sitios que sí se encuentran hipermetilados. Esta hipometilación se asocia a la desregulación del enzima DNMT1 adquirida con el número de replicaciones y está asociada al incremento de p16^{INK4a} y p21^{CIP1}²⁹. Sin embargo, en senescencia prematura, como en la inducida por tratamiento con doxorrubicina, radiación o en sobreexpresión de RAS oncogénico no se observa esta hipometilación del ADN. Se ha sugerido que es debido a que las células no realizan el número de duplicaciones suficientes como para adquirir las modificaciones de metilación encontradas en senescencia replicativa^{30–32}.

Las histonas son modificadas postraduccionalmente en su cola amino-terminal, alterando así la interacción entre nucleosomas y regulando la estructura de la cromatina en último lugar³³. La senescencia replicativa se asocia a la disminución global de histonas y, por tanto, de histonas modificadas. Así, se ha sugerido que el represor Rap1 abandona sus sitios de unión en los extremos cromosómicos para unirse a los genes que codifican las histonas. A su vez, se ha observado una disminución generalizada de las modificaciones de histona H4K16Ac, H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3, y un aumento de H3K9Ac y H4K20me3, junto con p-H2AX. Esta última, se asocia con acortamiento telomérico y colocaliza con la maquinaria de reparación de roturas de doble cadena (DBS)²⁹. Además, también se sabe que en senescencia la histona macroH2A1.1 aumenta la actividad de PARP1, dando lugar al aumento de SASP por la vía PARP/NFκB. En este caso se genera un bucle en pro de la senescencia en el que factores SASP incrementan la expresión de macroH2A1^{34,35}.

La modificación de histonas también puede servir para reclutar enzimas remodeladoras de la cromatina que utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para repositionar los nucleosomas³³. Se han asociado diversos de estos procesos a la senescencia. Por ejemplo, ARID1B, que forma parte del complejo remodelador SWI/SNF, puede provocar daño en el ADN y producir especies reactivas del oxígeno (ROS). De este modo, se aumenta la expresión de p53, p21^{CIP1} y p16^{INK4a} y se inicia la senescencia^{36,37}. Además, el complejo SWI/SNF también facilita el desalojo del complejo represivo 2 (PRC2), que es parte del grupo de proteínas Polycomb (PcG), y así puede dar lugar a la activación de la expresión de los genes codificados por el locus *INK4a/ARF*³⁸.

2.1.6. Cambios metabólicos

A pesar de permanecer en un estado no proliferativo, las células senescentes presentan un alto nivel metabólico. Esto es debido a la alta demanda de energía y de componentes celulares que exige el fenotipo senescente^{3,39,40}. Por un lado, el catabolismo en células senescentes se centra en un alto consumo de glucosa para generar ATP. Se sabe que la glicolisis aumenta ante estímulos oncogénicos, genotóxicos y en senescencia replicativa. Además, la mitocondria disfuncional, que es característica de la senescencia, no sólo afecta a la producción de ATP, sino también directamente al balance redox de la célula y una ratio NAD⁺/NADH baja conduce a la parada proliferativa^{41,42}.

Por otro lado, el anabolismo se centra en la síntesis de proteínas, para el desarrollo del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP), y de lípidos, para llevar a cabo la autofagia y síntesis de orgánulos membranosos. Además, la síntesis de glucógeno también se ha observado aumentada en fibroblastos humanos senescentes y en el envejecimiento de diversos tejidos³⁹. Adicionalmente, los efectos del estrés replicativo también son notables en la síntesis de ADN⁴³.

En cuanto a las rutas de señalización catabólicas alteradas en senescencia, destaca la activación de AMPK y NFκB. Por ejemplo, en el caso de la senescencia inducida por radiación ionizante, la activación de AMPK favorece el flujo glicolítico y activa NFκB, lo cual también promueve la producción de factores SASP. En cambio, se ha observado que en el caso de OIS, es necesaria pRB para la activación de la vía glicolítica. Sin embargo, la producción de lactato en ambos casos da lugar a la activación de NFκB de nuevo y al refuerzo del SASP y del fenotipo senescente⁴⁰. Además, los altos niveles en la ratio AMP/ATP o ADP/ATP que caracterizan a las células senescentes pueden provocar que la activación AMPK sea crónica. Cuando esto sucede, AMPK puede activar a p53 y provocar el inicio de la senescencia⁴⁴. Adicionalmente, los niveles en senescencia de NAD⁺/NADH pueden activar PARP y sirtuinas, capaces de promover también la expresión de NFκB y, por tanto, el SASP⁴⁵.

Entre las rutas anabólicas que aparecen alteradas en el fenotipo senescente, destacan la señalización de GSK3, ATM, SREBP1 y mTOR. GSK3 es un regulador principal de la glucogenogénesis que puede inactivarse al ser fosforilado por AKT. Si GSK3 se encuentra desfosforilado, se activa GS que media la formación de glucógeno a partir de glucosa-6-fosfato.

Se ha demostrado que la inhibición de GSK3 puede dar lugar a senescencia y acumulación de glucógeno³⁹. En el caso de ATM, se sabe que su activación en condiciones de estrés replicativo da lugar a senescencia celular. En estas condiciones se restringe el consumo de glucosa y glutamina para disminuir la producción de dNTP a través de la ruta de las pentosas fosfato⁴³. Por otro lado, SREBP1 es un regulador clave de la lipogénesis y su expresión es alta en células proliferativas para aumentar el número de orgánulos membranosos que repartir en la división celular. Algunas células senescentes también tienen alta expresión de este regulador y sus enzimas diana (*FAS*, *ACC* y *ACL*). Su sobreexpresión conduce al aumento lípidos de membrana y de la masa celular, sin embargo, también provoca la parada proliferativa por el desbalance adquirido al no suceder la mitosis⁴⁶. En la regulación de SREBP1 intervienen mTOR, AMPK y GSK3. Finalmente, en cuanto a la síntesis de proteínas, se sabe que tanto GSK3 como mTOR son capaces de inhibir la traducción mediante la inhibición de EIF4 e EIF2b, respectivamente³⁹.

mTOR es una proteína quinasa con función de sensor de nutrientes que regula el metabolismo y el crecimiento celular y tiene un papel fundamental en senescencia celular. mTOR se puede encontrar formando dos complejos diferentes según las proteínas de andamiaje que lo acompañen. mTORC1 cuyo complejo lo caracteriza la proteína Raptor y mTORC2 en el que destaca Rictor. Se ha demostrado en múltiples estudios que la inhibición de mTORC1 se asocia al incremento de la esperanza de vida y puede aliviar los síntomas de patologías asociadas al envejecimiento (Síndrome de Leigh, enfermedades cardiovasculares, Alzheimer, Parkinson). Esto se ha comprobado en múltiples organismos mediante su inhibición directa con rapamicina y también mediante dieta de restricción calórica⁴⁷. Se ha observado que la señalización de mTORC1 es elevada durante la senescencia replicativa, en OIS y en la inducida por ROS mitocondrial. Además, mTOR se considera responsable de la irreversibilidad de la parada proliferativa en senescencia o *geroconversión*. En modelos de senescencia inducida por *p16^{INK4a}* y por *p21^{CIP1}*, la inactivación de estos CKIs basta para la vuelta a la proliferación, mientras que, si en esas condiciones se activa mTOR, la parada es irreversible. Sin embargo, se ha comprobado que, en ciertos tipos celulares, la parada proliferativa mediada por p53 no se hace irreversible con la activación de mTOR ya que p53 puede inhibir su función en ciertos contextos. Además, mTORC1 también es capaz de promover SASP a través del aumento de IL1 α y de MAPKAPK2^{39,47,48}.

2.1.7. Fenotipo secretor asociado a senescencia

Los cambios genéticos y metabólicos que sufre la célula durante la adquisición del fenotipo senescente llevan a la síntesis y secreción aumentadas de una gran variedad de moléculas. El fenotipo secretor asociado a senescencia, también conocido como *secretoma mensajero senescente*, lo forman el conjunto de citoquinas, quimioquinas y proteasas sintetizadas por las células senescentes. Estas moléculas le sirven a la célula en la comunicación con las células y tejidos de su alrededor. El SASP es un fenotipo heterogéneo y pleiotrópico, que depende del contexto genético, el tipo celular y el microambiente. Por tanto, sus funciones son también diversas y entre ellas se han encontrado aspectos fisiológicos positivos y negativos^{3,49}.

Las funciones principales del SASP son el refuerzo de la parada del ciclo celular de forma autocrina y paracrina y, además, el aumento del fenotipo senescente. En este proceso intervienen moléculas como las interleuquinas IL6 e IL8 o receptores como IL6R y CXCR2 que conforman un bucle de retroalimentación positiva en favor de la senescencia celular. Esta señalización constituye también un mecanismo de supresión tumoral que impide el crecimiento de células no transformadas⁵⁰⁻⁵². Además, las células senescentes pueden tener una función de reclutamiento sobre el sistema inmune que contribuye a la eliminación de células premalignas y senescentes y que se lleva a cabo mediante la secreción de interleuquinas proinflamatorias⁵³. Además de estas funciones, el SASP tiene relevancia en la remodelación de tejido, en la senescencia del desarrollo, en la cicatrización de heridas y en la plasticidad celular⁷.

Sin embargo, el SASP también puede contribuir al desarrollo tumoral a través de la secreción de factores como VEGF, que favorece la angiogénesis, o al reclutar células mieloides inmaduras. Esto último tiene un efecto inmunosupresor que colabora en el desarrollo de algunos tumores como el de próstata o el de hígado⁵⁴⁻⁵⁶. Por otra parte, se relaciona la actividad proinflamatoria del SASP con los efectos deletéreos del envejecimiento debido a la acumulación de células senescentes en los tejidos, en un concepto denominado "*inflammaging*"⁴⁵.

Al igual que sus funciones, la composición y la regulación del SASP también son diversas y contexto-dependientes. No obstante, existen factores comunes que poseen gran relevancia en la regulación de este fenotipo como NFκB, C/EBPB y mTOR, MLLT1, GATA4, p38MAPK e incluso algunos efectores de la respuesta a daño en el ADN (DDR). En el caso de NFκB y C/EBPB se genera un bucle de retroalimentación positivo en el que ambos activan factores clave del SASP como son IL6 e IL8 y, a su vez, estos son capaces de aumentar la actividad de NFκB y C/EBPB^{50,52}. Otra vía central para el control del SASP es la de mTOR, sobre la que convergen múltiples rutas de señalización celular. mTOR puede promover la acción de la interleuquina IL1α que actúa, a su vez, como otro regulador clave en el desarrollo del SASP⁵⁷. Además, la diversidad de moléculas secretadas en el SASP hace que se diferencien subgrupos de factores o secretomas según las vías principales que los regulan. Mientras que los componentes inflamatorios del SASP se rigen al control central de IL1, otro secretoma, el caracterizado por TGFβ, parece depender de la señalización yuxtacrina de NOTCH. Muchos de los factores SASP son proteínas solubles que pueden secretarse directamente al medio extracelular, sin embargo, otros factores son proteínas transmembrana que deben escindir-se e incluso algunos otros se secretan en vesículas tipo exosomas^{3,45,49}.

2.2. Alteraciones estructurales y morfológicas en senescencia celular

2.2.1. Cambios en autofagia y lisosomas

La autofagia es un proceso de señalización celular por el que se lleva cabo la reutilización de componentes citoplasmáticos mediante su incorporación en vacuolas y su degradación en los lisosomas. Existe una elevada actividad autofágica en las células senescentes debido a la gran demanda energética y a la alta cantidad de componentes celulares aberrantes. Además, se cree

que la activación de la autofagia es capaz de iniciar la senescencia^{3,24}. Por ejemplo, se sabe que la inactivación de mTORC1 en condiciones de limitación nutrientes pone en marcha la autofagia para la reutilización de material citoplasmático hacia el metabolismo catabólico⁵⁸. Esto se debe a que mTOR es capaz de formar un compartimento denominado compartimento de acoplamiento espacial autofágico de mTOR (TASCC), el cual es inducido en senescencia iniciada por RAS. La inhibición de mTOR en estas condiciones lleva a la disminución de la síntesis de las proteínas del SASP IL6 e IL8⁵⁹. También se ha observado que ante estímulos oncogénicos se activa la autofagia para la degradación de Lamin1B. Esto puede iniciar la senescencia y evitar la transformación tumoral en células humanas⁶⁰. Recientemente, se ha demostrado que p38MAPK es suficiente para activar la producción de autofagosoma y activar el flujo basal autofágico y esto es capaz de provocar senescencia en células tumorales en preferencia a la apoptosis⁶¹.

Aunque se ha observado que las células necesitan la activación de la autofagia para el correcto desarrollo del SASP, existe un desacople entre la síntesis de proteínas y su degradación, al igual que sucede con otros componentes celulares en senescencia. Esto sumado a otros tipos de estrés frecuentes en senescencia (estrés oxidativo, acumulación de mutaciones, falta de chaperonas) conduce al cúmulo de agregados tóxicos que están formados, principalmente, por lípidos y proteínas unidos covalentemente y que aumentan aún más el fenotipo senescente^{3,39}.

Para mantener la homeostasis, la autofagia debe ser acompañada de una alta actividad lisosomal. Por tanto, en las células senescentes se da un aumento del contenido de los lisosomas y la activación de sus proteínas. Está en discusión si el aumento del contenido de estos orgánulos se debe al incremento en su biogénesis o a su acumulación. Dentro de los lisosomas de las células senescentes se observa una alta actividad del enzima β -galactosidasa. La actividad de este enzima tiene un uso extendido como marcador de senescencia celular, midiéndose gracias al reactivo artificial conocido como X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) a pH ácido. Este enzima se traduce desde uno de los transcritos codificados por el gen *GLB1*. Aunque se conocen mecanismos que regulan su expresión a nivel transcripcional y postraducciona, se desconocen aquellos que establecen su sobreexpresión en senescencia celular^{4,24}.

Aunque existe una alta actividad β -galactosidasa ácida intrínseca a ciertos tipos celulares, como macrófagos maduros de tejido y osteoclastos, es el marcador de senescencia más empleado junto con la sobreexpresión de p16^{INK4a}^{62,63}. Además, existen sólidas evidencias que respaldan la alta actividad β -galactosidasa ácida en células senescentes como un fenómeno fisiológico. Por ejemplo, se ha asociado el envejecimiento de la piel y la acumulación de células senescentes con la actividad β -galactosidasa ácida⁶⁴. También se ha observado actividad β -galactosidasa ácida en OIS, hallada en lesiones premalignas en modelos *in vivo* y en muestras de pacientes⁵. Además, la actividad β -galactosidasa ácida se observa en otros procesos fisiológicos como la reparación de tejido⁶⁵ y la senescencia en desarrollo embrionario^{66,67}.

2.2.2. Mitocondria disfuncional

Las células senescentes se caracterizan por la acumulación de mitocondrias disfuncionales debido, principalmente, a la falta de una actividad mitofágica apropiada. Las mitocondrias de células senescentes sufren múltiples cambios no sólo en funcionalidad y en su estructura, sino también en su dinámica, favoreciendo la fusión respecto a la fisión. Destaca, especialmente, el cambio en el potencial de membrana de las mitocondrias de células senescentes, el cual, es responsable de la fuga de protones y del aumento de ROS. De hecho, se ha sugerido que la relevancia de la mitocondria en senescencia es mayor por la producción de ROS y el consecuente estrés oxidativo, que por su función de aporte energético, la cual, puede ser suplida por la glicolisis^{3,4,68}.

2.2.3. Morfología celular asociada a senescencia celular

Una de las características más evidentes de las células senescentes es la morfología alargada y aplastada que adopta su citoplasma *in vitro*. Se ha demostrado que esta morfología puede ser consecuencia de la sobreexpresión en condiciones de estrés de *CAV1*, gen que codifica la Caveolina-1, un componente de los microdominios ricos en colesterol de la membrana plasmática. En células epiteliales humanas, la exposición excesiva a estrés oxidativo provoca que p38MAPK promueva la activación transcripcional de *CAV1*, mediada por la unión de Sp1 a su promotor, y dando lugar al cambio en la morfología de la célula⁶⁹. A nivel morfológico, también es común observar células senescentes con núcleos irregulares o multinucleadas. Estas células presentan defectos en la lámina nuclear, cuyo componente Lamin-B1, se pierde ante la activación de p53 o pRb en ratones y humanos⁷⁰. Además, se ha comprobado que Lamin-B1 puede emplearse como biomarcador para detección de células dañadas y durante la regeneración de la piel en humanos⁷¹.

3. Mecanismos que desencadenan la senescencia celular

3.1. Senescencia replicativa y daño en el ADN

La senescencia replicativa fue descrita por primera vez décadas atrás, cuando el Dr. Leonard Hayflick observó que el número de duplicaciones de los fibroblastos diploides era limitado⁷². Más tarde, la senescencia replicativa se ha observado también en múltiples tipos celulares incluyendo células endoteliales, queratinocitos, linfocitos, células adrenocorticales, condrocitos o células de músculo liso vascular⁷³.

La senescencia replicativa tiene su fundamento en el acortamiento telomérico. Los telómeros son estructuras formadas por secuencias de nucleótidos TTAGGG repetidas en la región extremo final de los cromosomas y por las proteínas que se asocian a ellas⁷⁴. Estas estructuras ribonucleoproteicas protegen a los cromosomas de su deterioro y de su fusión con cromosomas adyacentes⁷⁵. Además, los telómeros se acortan con cada división celular debido a la incapacidad de las ADN polimerasas de replicar por completo una cadena de ADN⁷⁶. Esto fue demostrado en 1990 en fibroblastos humanos y, posteriormente, se ha detectado *in vivo* en células de hígado, piel, sangre, linfocitos y mucosa del colon^{73,77}. Este problema de replicación

de los extremos se ve compensado por la acción de la telomerasa (TERT), un enzima transcriptasa inversa capaz de añadir repeticiones TTAGGG a los extremos de los cromosomas utilizando una molécula de ARN como molde⁷⁸. La expresión ectópica de *TERT* hace posible la evasión de la senescencia en fibroblastos humanos⁷⁹. Sin embargo, en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) de ratones deficientes en *Tert* no se adelanta la aparición de la senescencia replicativa. Estos ratones deficientes en *Tert* no muestran signos de envejecimiento prematuro hasta después de varias generaciones de entrecruzamientos, cuando los telómeros son críticamente cortos y provocan inestabilidad genómica⁸⁰. Este fenotipo conduce a una esperanza de vida más corta, imposibilita la respuesta a diferentes tipos de estrés y aumenta la frecuencia de aparición de lesiones malignas⁸¹. Sin embargo, los signos de envejecimiento asociados al genotipo de estos ratones pueden mitigarse tras la reactivación de *Tert*⁸².

Las células que expresan el enzima telomerasa varían en mamíferos según la especie. En humanos se expresa en células madre embrionarias, algunas células madre adultas y en pocas células somáticas. En ratones, sin embargo, es posible encontrar actividad telomerasa en muchas células somáticas de tejido adulto, incluidos los fibroblastos. A pesar de esto, y de que los telómeros de ratón son 5-10 veces más largos, su esperanza de vida es 30 veces menor⁸³⁻⁸⁵. Así, el estudio comparativo de múltiples especies de mamíferos relaciona la longitud de los telómeros inversamente al tamaño corporal y positivamente a la actividad telomerasa. Esto podría sugerir una evolución hacia telómeros cortos y telomerasa poco activa que favorece la supresión tumoral⁷³. En humanos, más concretamente, el acortamiento telomérico se ha asociado al estrés y a patologías relacionadas con el envejecimiento, aunque no de manera causal. Por ejemplo, algunas enfermedades genéticas humanas, como la disqueratosis congénita, provocan la aparición de telómeros disfuncionales y tienen asociados síntomas de envejecimiento prematuro como fibrosis pulmonar o cirrosis^{73,86}.

La célula es capaz de detectar el acortamiento telomérico y desencadenar una respuesta a daño en el ADN (DDR) que provoca la parada del ciclo celular con tal de reparar ese daño. Si el daño resulta irreparable, la señalización desemboca en el inicio de la senescencia replicativa⁷⁵. La DDR puede activarse en la célula ante otro tipo de perturbaciones en el ADN que son censados como daños severos, como las roturas de doble cadena (DSBs). Algunas de estas perturbaciones suceden ante estrés oxidativo, estrés oncogénico, radiación ionizante o la quimioterapia. Esta respuesta celular tiene su eje principal en una ruta de señalización que comienza con la unión al ADN de las quinasas ATM o ATR. Estas proteínas fosforilan histonas H2AX en las zonas de daño y atraen al complejo de reparación del ADN. Este complejo también es reclutado por la histona trimetilada H3K9me3. Entre los diversos sustratos de ATM destacan dos quinasas esenciales como las CHK1 y CHK2, proteínas adaptadoras como 53BP1 y el regulador de puntos de control MDC1^{4,87,88}.

3.2. Efectores de la parada proliferativa en senescencia celular

3.2.1. p53

Diferentes estímulos pueden llevar a la estabilización de la proteína p53 mediante la fosforilación de varios de sus residuos y conducir a la parada de ciclo celular. Esta parada proliferativa se lleva a cabo gracias a la activación de $p21^{CIP1}$ y a la interacción con la ruta $p16^{INK4a}/pRB$. $p21^{CIP1}$ bloquea principalmente a CDK2, CDK4 y CDK6, resultando en niveles hipofosforilados de pRB y en la parada proliferativa^{3,89}. La proteína p53 es, además, regulada por ARF. ARF ayuda a mantener los niveles de proteína p53 al secuestrar a HDM2, una proteína que tiene función ubiquitín ligasa y que se encarga de facilitar la degradación de p53⁹⁰. En su función de factor de transcripción puede, no solo iniciar la parada proliferativa ante daño al ADN, sino que activa la reparación del ADN, promueve la apoptosis, la senescencia y cambios en el metabolismo ante diversidad de estímulos endógenos y exógenos⁹¹. La actividad de p53 es imprescindible para el proceso de senescencia replicativa tanto en fibroblastos humanos como de ratón. Sin embargo, no es así en el caso de $p21^{CIP1}$, que es indispensable en fibroblastos humanos, pero no en MEFs⁹². Sin embargo, los ratones deficientes de $p21^{CIP1}$ sí que tienen mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores⁹³. Además, la relevancia de p53 en la tumorigénesis la confirma su alta frecuencia de mutación en la mayoría de tipos de tumores humanos⁹¹.

3.2.2. Inhibidores de CDK

Como se mencionó anteriormente, los CKIs pertenecen a dos familias de proteínas. Por un lado, la familia INK4 está compuesta por $p16^{INK4a}$ (*CDKN2A*), $p15^{INK4b}$ (*CDKN2B*), $p18^{INK4c}$ (*CDKN2C*) y $p19^{INK4d}$ (*CDKN2D*) que se unen específicamente a CDK4 y CDK6 produciendo un cambio alostérico en ellas que impide la unión de las ciclinas de tipo D. Por otro lado, la familia CIP/KIP está formada por $p21^{CIP1}$ (*CDKN1A*), $p27^{KIP1}$ (*CDKN1B*) y $p57^{KIP2}$ (*CDKN1C*) que son capaces de unirse a varios complejos CDK-Ciclina ya formados e inhibirlos. Todas estas proteínas tienen gran importancia en la supresión tumoral debido a su función en la parada proliferativa^{94,95}.

Entre este conjunto de inhibidores del ciclo celular, tiene especial relevancia $p16^{INK4a}$ que, en su relación con pRB, conforma un eje central de la senescencia y la supresión tumoral. La ruta de señalización celular $p16^{INK4a}/pRB$ responde de manera directa a diversos estímulos y de forma indirecta a daño en el ADN y p53, que son también capaces de detener el ciclo celular²⁵. En concreto, pRB ejerce su función de supresión tumoral gracias a su capacidad para unirse e inactivar a la familia de factores de transcripción E2F, los cuales, regulan la transcripción de genes necesarios para la replicación del ADN y el ciclo celular⁹⁶.

Los niveles de expresión de $p16^{INK4a}$ aumentan considerablemente con el número de replicaciones de células *in vitro*, su delección es habitual en células inmortalizadas y la pérdida de su función, por mutación puntual o delección, se encuentra entre las mutaciones más comunes en los tumores humanos^{24,97}. Además, el silenciamiento de $p16^{INK4a}$ a través de la metilación de su promotor ha sido observado en múltiples tipos de tumores humanos⁹⁸.

p16^{INK4a}, *p15^{INK4b}* y *ARF* comparten la misma fracción del genoma. Aunque *p15^{INK4b}* es similar en función y estructura a *p16^{INK4a}*, este primero posee su propio marco abierto de lectura independiente al de los otros dos genes. Sin embargo, *p16^{INK4a}* y *ARF* comparten 2 de sus 3 exones. A pesar de esto, *p16^{INK4a}* y *ARF* no poseen ninguna homología en su secuencia de aminoácidos debido a que ambas proteínas están codificadas en marcos alternativos de lectura. Esto es debido a que comienzan su transcripción en sitios distintos y, además, poseen un primer exón diferente. Al igual que *p16^{INK4a}* y *p15^{INK4b}*, *ARF* posee una importante función en supresión tumoral ya que ayuda a mantener los niveles de proteína p53⁹⁵.

Por todo ello, la regulación del locus *INK4A/ARF* es crucial en la parada del ciclo celular en senescencia. En células proliferativas normales, el locus *INK4a/ARF* se encuentra silenciado gracias a la acción del PcG⁹⁹. De este modo, la alteración del PcG o la pérdida de función de alguno de sus componentes como *CBX7*, *BMI1*, o *EZH2*, conlleva a la pérdida de las modificaciones epigenéticas mencionadas, y, consecuentemente, a la activación de *p16^{INK4a}* y *ARF* e inducción de senescencia. Otros modificadores epigenéticos que actúan sobre el locus *INK4a/ARF* son CTCF, p300, MLL1, JMJD3, o ZRF1^{3,24,99}.

Existen otras capas de regulación sobre el locus *INK4a/ARF* y, entre ellas, también es relevante la regulación mediada por factores de transcripción. En particular, destacan activadores como Sp1, Ets, AP1 y PPAR γ y factores represores como TWIST, YB1 o Id1 y algunos de estos factores podrían actuar de guía para los modificadores epigenéticos que actúan sobre el locus⁹⁹.

3.3. Senescencia inducida por oncogenes

La senescencia puede ser iniciada cuando las señales mitogénicas son excesivas. Esto supone un mecanismo antitumoral que es provocado por la activación de ciertos protooncogenes y también por la pérdida de función de genes supresores tumorales. La primera evidencia de OIS se halló ante la sobreexpresión de una versión oncogénica de *HRAS* (*HRASG12v*) en células normales no inmortalizadas. Estas células iniciaban la parada proliferativa y adquirían un fenotipo indistinguible del de la senescencia celular acompañado de la activación de *p16^{INK4a}* y *ARF/p53*¹⁰⁰. *RAS* es un miembro de la ruta de señalización de la proteína quinasa MAPK, la cual es capaz de activar OIS involucrando en su respuesta a p53 y *p16^{INK4a}*¹⁰¹. Además, otras de las proteínas de esta ruta de señalización en versión mutante hiperactivada, como RAF, MEK, BRAF y muchos protooncogenes como *PI3K*, *AKT*, *MYC*, *ERBB2* o *p38MAPK*, entre otros, también suponen una señal mitogénica y pueden desencadenar la OIS. A su vez, la pérdida de función de genes supresores de tumores como, por ejemplo, *PTEN* o *NFI* posee el mismo efecto sobre la senescencia^{6,24}.

Gran parte de la señalización celular provocada por los oncogenes activados y por las señales de hiperactivación mitogénica provocan daño en el ADN y la consecuente DDR. En células con expresión ectópica de *HRAS* mutado, se observa una fase hiper-replicativa que desemboca en la característica parada de ciclo de la OIS con ADN sólo parcialmente replicado¹⁰². Este estrés replicativo inducido por la activación oncogénica contribuye a la inestabilidad

genómica característica de las células tumorales. Los mecanismos propuestos por lo que esto sucede son múltiples (disminución de nucleótidos o de factores de replicación, aumento o reducción de “*origin firing*”, reducción de ratio de elongación de las horquillas de replicación)¹⁰³⁻¹⁰⁵. Recientemente, un estudio ha identificado y comparado los sitios de origen de replicación generados antes y después de la activación de los oncogenes *CCNE1* y *MYC*. Se localizaron orígenes de replicación dentro de genes altamente transcritos tras la sobreexpresión de ambos oncogenes. Las horquillas de replicación en estos casos colapsaban debido al conflicto entre la transcripción y la replicación y esto se asocia con DSBs y “*chromosomal rearrangement breakpoints*” en el modelo celular mencionado y también en muestras de pacientes de cáncer¹⁰⁵.

Las evidencias de que la OIS es un fenómeno fisiológico son abundantes, recogidas en modelos animales y en tumores de pacientes. Por ejemplo, en nevus melanocítico adquirido y congénito (lesiones benignas derivadas de melanocitos) se ha identificado actividad β -galactosidasa ácida, alta expresión de p16^{INK4a} y ausencia de MIB1 sin actividad proliferativa^{106,107}. Además, en ratones transgénicos que sólo sobreexpresan *BRafV600E* en melanocitos se observó parada proliferativa, mientras que en combinación con la falta de genes supresores tumorales como *PTEN* se generaban melanomas^{108,109}. Igualmente, en pulmón, un modelo de expresión inducible del oncogén *KRas-V12* se empleó para estudiar lesiones neoplásicas. Se pudo observar actividad β -galactosidasa ácida, expresión de p16^{INK4A} e indicios de SAHFs solamente en los múltiples adenomas hallados. Sin embargo, los pocos adenocarcinomas que se generaron no presentaban estos marcadores de senescencia¹¹⁰. Del mismo modo, en un modelo de ratón de pérdida del supresor de tumores *PTEN* se pudo observar marcadores de senescencia en las neoplasias de estadio temprano en próstata, pero no en los tumores malignos más avanzados que se generaron solo tras eliminar también la expresión de *Trp53*¹¹¹. Cuando se expresaba *NRAS* en células linfoides de ratón, se observaban evidencias de OIS. Si a esta sobreexpresión oncogénica se sumaba la mutación de *Suv39h1* (Histona metiltransferasa que media silenciamiento de pRb) o del locus de p53, se producían linfomas¹¹². También en glándula pituitaria de ratón se han hallado evidencias de OIS tras la expresión de *E2F*, lo que interrumpía la proliferación y evitaba la tumorigénesis¹¹³. Además, en humanos, los microadenomas de esta glándula tienen una prevalencia del 10-25%. Se han analizado evidencias que sugieren que la OIS frena un mayor desarrollo de este tipo de lesiones¹¹⁴.

3.4. Senescencia inducida por estrés oxidativo

Existen diferentes teorías que relacionan el estrés oxidativo con la senescencia celular y el envejecimiento. Todas ellas han sido actualizadas frecuentemente desde que el Dr. Denham Harman propusiera en 1956 la teoría del envejecimiento de los radicales libres. Según esta teoría “el envejecimiento debe de estar relacionado con un ataque de los radicales libres, generalmente productos de procesos metabólicos, a los componentes celulares”¹¹⁵. Más tarde, se focalizó esta teoría de radicales libres hacia la mitocondria y se propuso también que sus efectos deletéreos sobre la célula eran fruto de un desbalance en el equilibrio prooxidante-antioxidante en favor de la oxidación¹¹⁶.

Los radicales libres más comunes que se producen en el metabolismo normal de la célula son el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). En concreto, la mitocondria disfuncional se caracteriza por una fuga de electrones que genera O_2^- como producto secundario, especialmente, de las reacciones llevadas a cabo en el complejo I (NADH deshidrogenasa) y en el complejo III (complejo del citocromo bc1). Moléculas de diferente tipo como lípidos, proteínas y ADN se dañan en presencia de estos radicales. Cuando el estrés oxidativo alcanza niveles elevados y esto se prolonga en el tiempo, la célula adquiere un fenotipo similar al senescente. Además, la acumulación de ROS parece contribuir en la inducción de OIS, en TIS y también en la senescencia mediada por $p16^{INK4a}$ ¹¹⁷. ROS puede dañar el ADN de diversas maneras: daño en una única base, uniones covalentes o *cross-linking* intracatenario, aductos ADN-proteína y enlaces intercatenarios¹¹⁸. Además, se ha relacionado a ROS con un aumento del acortamiento de los telómeros¹¹⁹. De este modo, ROS puede inducir DDR y el consecuente inicio de la senescencia. Sin embargo, se ha propuesto también una posible retroalimentación positiva entre la DDR inducida por estrés oxidativo y la propia producción de ROS. Este bucle sería promovido por la activación a largo plazo de $p21^{CIP1}$ y trae como consecuencia el deterioro de las mitocondrias y la consecuente fuga de electrones¹²⁰.

Las proteínas son otra de las principales dianas de ROS en su contribución al estrés oxidativo. ROS tiene un papel importante en la señalización celular que se lleva a cabo mediante ciclos de oxidación-reducción de residuos aminoacídicos de las proteínas, generalmente metionina y cisteína. Sin embargo, existen modificaciones oxidativas que no son reversibles de manera enzimática como la carbonilación. Cuando esto ocurre, y existe un cúmulo excesivo de proteínas oxidadas, la célula debe degradarlas vía proteasoma. No obstante, las proteínas oxidadas y unidas en *cross-linking* inhiben el proteosoma y se acumulan dentro de los lisosomas^{117,121}.

Para evitar el daño producido por ROS, la célula posee distintos mecanismos de protección basados en moléculas antioxidantes. Esta regulación hacia la homeostasis se lleva a cabo por moléculas antioxidantes endógenas como el glutatión y enzimas como superóxido dismutasas, catalasas o tiol peroxidasas. A su vez, la célula puede tomar ventaja de moléculas exógenas como micronutrientes o vitaminas¹¹⁷. Existen evidencias que indican que la falta de enzimas antioxidantes contribuye a la aceleración del envejecimiento. Por ejemplo, ratones deficientes en *PrxIII* tienen una disminución de las capacidades fisiológicas prematura respecto al fenotipo silvestre¹²². La disminución de *PrxI* acelera la aparición de anemias hemolíticas y de tumores en ratón¹²³. En fibroblastos humanos, la expresión de enzimas sulfóxido reductasas disminuye durante la senescencia replicativa¹²⁴. Además, las moléculas antioxidantes no enzimáticas también parecen tener un papel en el retraso de la senescencia. Por ejemplo, el balance glutatión oxidado/reducido crece a favor de la oxidación con la edad en sangre de sujetos sanos y también en células madre de tejido adiposo^{117,125}. Sin embargo, altas dosis, no citotóxicas, de antioxidantes sintéticos provoca senescencia prematura en células madre mesenquimales¹²⁶.

A pesar de todas las evidencias y teorías clásicas, recientemente ha ido creciendo el número de estudios que ponen en entredicho el efecto deletéreo de ROS en senescencia y envejecimiento. Se ha observado en levadura y *C. elegans* que el incremento de ROS y el daño oxidativo no necesariamente acelera el envejecimiento¹²⁷. En ratones, la modificación genética para el aumento de ROS mitocondrial tampoco acelera el envejecimiento¹²⁸ y el incremento de antioxidantes no extiende la esperanza de vida¹²⁹. Ha ganado interés el papel de ROS en señalización celular y homeostasis que puede promover la proliferación y la supervivencia celular en determinadas circunstancias. Por ello, se ha propuesto que aunque ROS interviene en la señalización de daño causado por envejecimiento, quizá su acumulación con la edad en el organismo no tenga por qué implicar un papel causal en el mismo¹³⁰.

3.5. Senescencia inducida por terapia

La senescencia inducida por terapia (TIS) es aquella iniciada en las células tumorales y en otras células de pacientes como consecuencia de un tratamiento de radioterapia, quimioterapia o terapia dirigida contra la enfermedad del cáncer^{88,131}. Existen evidencias de la TIS desde el descubrimiento de la OIS. Varios estudios revelaron la importancia de las vías de señalización de p53 y p16^{INK4a} en la inducción de senescencia en tumores tras el tratamiento, así como su relación con el pronóstico *in vivo*¹³²⁻¹³⁴. Este descubrimiento supuso la anulación del paradigma de la inmortalidad de las células tumorales y la creencia de que no podían adquirir un fenotipo senescente¹³⁵.

La mayoría de los tratamientos contra el cáncer producen daño al ADN en las células tumorales y en las células no transformadas del paciente. Esto desencadena la DDR y puede desembocar en el inicio de la senescencia. En el caso de la radiación ionizante, se ha descrito su capacidad de producir TIS de manera dependiente de dosis y de tipo celular. A nivel molecular, la parada de ciclo celular inducida por la radiación ionizante en terapia depende de p21^{CIP1} y del estado mutacional de p53 como se ha comprobado en tumores de mama, colorrectal y en glioblastoma^{136,137}. Además, la radiación ionizante aumenta la producción de ROS en las células, especialmente ROS mitocondrial, y daña el ADN. También se sabe que la proteína AKT puede contribuir en el incremento de ROS que inicia p53 en la senescencia inducida por radioterapia¹³⁸. *In vivo*, se ha comprobado que la radiación ionizante provoca daño en los progenitores hematopoyéticos de la médula ósea debido al aumento de ROS en estas células¹³⁹.

Múltiples agentes quimioterápicos incluidos en la práctica clínica inducen TIS. Esto incluye fármacos como docetaxel, doxorubicina, vincristina, cisplatino, ciclofosfamida o hidroxiurea^{88,140}. Recientemente, se estudió el efecto de más de 50 compuestos de bajo peso molecular que pueden inducir senescencia, entre los que se encuentran muchos agentes quimioterápicos. Se observó que las células tumorales podían iniciar la senescencia de igual modo que las no transformadas y que no existía una característica fenotípica común para los diferentes modelos y compuestos. Sin embargo, en la mayoría de casos existía alta actividad β -galactosidasa ácida y cambios morfológicos en las células, pero en pocos se hallaron evidencias de SASP¹⁴¹. También se ha comprobado, en ratones que padecen linfomas iniciados por Myc, que el

tratamiento con ciclofosfamida provoca fenotipo senescente con alta expresión de *p53* y *p16^{Ink4a}*. Esto, además, correlacionaba con un mejor pronóstico de supervivencia de los animales¹³³. Además, se ha observado senescencia en biopsias de pacientes de cáncer de mama, pulmón y próstata sometidos a tratamiento de neoadyuvancia, correlacionando con el mejor pronóstico^{6,88}. También existen terapias basadas en inhibidores específicos de moléculas relevantes en el desarrollo de los tumores como las CDKs, NOTCH, CK2, MDM2, JAK2 o SKIP2⁸⁸.

Entre los efectos positivos de la inducción de senescencia en tumores se halla la parada proliferativa y la apoptosis de las células tumorales y la consecuente anulación de la progresión de la enfermedad. También se ha sugerido como beneficiosa la inducción paracrina de la senescencia a células tumorales cercanas¹³¹. Esto se ha intentado demostrar en células tumorales, aunque no todas las líneas tumorales responden al medio condicionado por SASP iniciando también la senescencia¹⁴².

Sin embargo, entre los efectos negativos se sugiere que la TIS inducida por radiación o quimioterapia en células del microambiente tumoral lleva a efectos protumorales. Por ejemplo, en células epiteliales premalignas, la producción de SASP, en concreto IL6 e IL8, da lugar a un fenotipo de malignidad e invasividad¹⁴³. Otro efecto adverso para los pacientes es la salida de las células tumorales de ese estado senescente inducido por la terapia que puede significar la recaída de la enfermedad. Este fenómeno es conocido como “*células durmientes*” y ha sido observado en células de distintos tipos de cáncer como próstata, mama, colon, pulmón o glioblastoma¹⁴⁻¹⁹. Por ejemplo, en varios estudios se producen tumores al implantar células tanto en ratones inmunodeprimidos como en ratones inmunocompetentes tras inducir TIS con etopósido o doxorubicina¹⁴.

4. Implicación de la senescencia celular en procesos fisiológicos y patológicos

4.1. Senescencia celular en desarrollo embrionario

Actualmente, existen evidencias de la presencia de tejido senescente en embriones en desarrollo de los siguientes organismos: humano, ratón, pollo, codorniz, pez cebra, axolote, rana de uñas africana y rata topo desnuda. La mayor parte de estas evidencias se han recabado en embriones de ratón entre los días de gestación 9,5 y 15,5. También se han observado células positivas en actividad β -galactosidasa ácida en embriones en estadios de desarrollo más temprano (día 5,5 de gestación). Sin embargo, no se ha podido confirmar completamente la presencia de senescencia en estos estadios debido a la falta de otras características fenotípicas⁷.

En el embrión de ratón de 13,5 días de gestación, se ha detectado senescencia en el mesonefros o estructura renal y en el saco endolinfático del oído interno. En estas estructuras, la actividad β -galactosidasa ácida iba acompañada de parada proliferativa, de expresión de *p21^{Cip1}* y de factores SASP. La senescencia en estas estructuras depende esencialmente de *p21^{Cip1}* y en su regulación participan las rutas Tgf- β /Smad y PI3K/Foxo, pero es independiente de *p16^{Ink4a}*, Arf, *p53* y daño en el ADN. Además de esto, los ratones deficientes en *p21^{Cip1}* tienen un desarrollo normal, compensando el fenómeno de senescencia con el de apoptosis, pero

presentan alteraciones morfológicas en las extremidades, los riñones y la vagina^{66,67}. En humanos, se han hallado evidencias similares. El mesonefros y el saco endolinfático en embriones de aproximadamente 9 semanas de gestación son positivos para p21^{CIP1} y negativos para el marcador de proliferación Ki67⁶⁶.

Estas células senescentes aparecen de manera transitoria en los mismos tejidos y estadios en diferentes embriones siendo eliminadas, generalmente por apoptosis o, posteriormente, por los macrófagos. Esto evidencia que la senescencia en el desarrollo embrionario no es un mecanismo general de respuesta al daño, sino que es un proceso fisiológico altamente regulado⁷.

4.2. Senescencia celular en cicatrización

Múltiples estudios han demostrado la importancia de la senescencia en el proceso de cicatrización de heridas en diferentes tejidos como el hígado, la piel, el corazón y el pulmón. En hígado, las células estrelladas o células de Ito producen fibrosis que contribuye a la cicatrización de tejido dañado. Estas células responden al daño proliferando y secretando la matriz extracelular que convierte el tejido en fibrótico. Sin embargo, al mismo tiempo también se detectan otras células estrelladas con fenotipo senescente. La inhibición de la senescencia con modelos de ratón deficientes en p53 e *INK4a/Arf* en estas condiciones de daño, lleva a la fibrosis excesiva del hígado de ratón¹⁴⁴. En la piel, se ha demostrado que la proteína CCN1 es secretada por células senescentes en tejido dañado. CCN1 es capaz de aumentar el daño en el ADN e incrementar los niveles de ROS y la actividad de p53 y de la ruta p16^{INK4A}/pRB. Esto desemboca en la senescencia de algunas células del tejido dañado y, en modelos deficientes en *Ccn1*, la ausencia de células senescentes provoca una fibrosis excesiva¹⁴⁵. También en la piel se ha empleado un modelo de ratón que permite la visualización de células senescentes y su eliminación. Cuando se produce la herida, estas células secretan PDGF-AA, que promueve la diferenciación de miofibroblastos que contribuyen en el cierre de la herida. La eliminación selectiva de las células senescentes dificulta la cicatrización en este modelo⁶⁵.

Otros estudios también evidencian que la cicatrización está mediada, al menos en parte, por la senescencia. En el corazón infartado, con falta de oxígeno, se conoce la presencia de células senescentes. En estas condiciones se observa un aumento de p53 y de la secreción de citoquinas y de colágeno que también se detecta en fibroblastos cardíacos en hipoxia. La inhibición *in vivo* de p53 en condiciones de hipoxia disminuye la fibrosis y la infiltración de macrófagos, pero no la secreción de colágeno¹⁴⁶. Por otro lado, la fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad grave en la cual se han observado células senescentes en tejido pulmonar y cuya severidad correlaciona con los niveles de expresión de p16^{INK4a}. La eliminación *in vivo* de células senescentes con altos niveles de expresión de p16^{INK4a} mediante modelos genéticos o el uso de fármacos dirigidos contra ellas, denominados *senolíticos*, aumenta la salud del pulmón, aunque no disminuye la fibrosis¹⁴⁷.

4.3. Relación entre la senescencia celular y el envejecimiento del organismo

En 2013, López-Otín et al. revisaron las características asociadas al envejecimiento del organismo y lo definieron como una disminución de la integridad fisiológica con pérdida funcional y ganancia de la vulnerabilidad a la muerte. Entre las nueve características comunes del envejecimiento que se definieron se encuentra la senescencia celular¹²⁷. Ya en 1995, Dimri et al. observaron por primera vez, que la actividad β -galactosidasa ácida correlacionaba positivamente con el envejecimiento del tejido de piel⁶⁴. En 1997, Serrano et al. describieron por primera vez la senescencia celular como primera respuesta a activación oncogénica en células normales¹⁰⁰. Posteriormente, surgieron múltiples evidencias de la relevancia de la senescencia como mecanismo de supresión tumoral *in vivo*¹⁰⁶⁻¹¹⁴. Sin embargo, pronto se sumarían a esos estudios, aquellos que demuestran la contribución de la senescencia, especialmente del SASP, como factor que favorece la progresión tumoral, la recaída y la metástasis, características de la enfermedad del cáncer que correlacionan positivamente con el envejecimiento del organismo¹⁴⁸. Además, actualmente se conoce que tanto la acumulación de células senescentes en los tejidos durante el envejecimiento como la función proinflamatoria del SASP se asocian con el conjunto de efectos deletéreos que produce la activación crónica del sistema inmune durante el envejecimiento. Este fenómeno es conocido como “*inflammaging*”^{45,149}

Se ha demostrado que ciertos efectores de la senescencia incrementan su expresión con el envejecimiento como los genes del locus *INK4a/ARF*¹⁵⁰⁻¹⁵⁴. Por ejemplo, las células- β de los islotes pancreáticos incrementan la expresión de *p16^{INK4a}* con el envejecimiento, limitando su capacidad regenerativa¹⁵². Además, en las células satélite de músculo envejecido, se pierde la represión del locus de *p16^{INK4a}*, contribuyendo a la pérdida de capacidad regenerativa¹⁵⁵. En un modelo de ratón diseñado para inducir apoptosis en las células que expresan *p16^{INK4a}*, disminuía la aparición de tumores y el deterioro asociado a la edad de órganos como el riñón o el corazón cuando se eliminaban las células que lo expresaban¹⁵⁶. Hasta la fecha, se ha demostrado que la eliminación de células que expresan *p16^{INK4a}* *in vivo* mejora los síntomas de diversas enfermedades asociadas al envejecimiento como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la osteoporosis, la arteriosclerosis y la osteoartritis⁷.

5. Hipoxia y senescencia celular

5.1. Mecanismos de adaptación fisiológica a niveles bajos de oxígeno

Aunque los niveles de oxígeno de nuestra atmósfera sean de entorno al 20%, la disponibilidad de este elemento no es tal en nuestro organismo. El oxígeno debe distribuirse desde el sistema respiratorio hacia todos los tejidos a través del flujo sanguíneo y, por tanto, todas las células no están expuestas a él del mismo modo. Por ejemplo, en el cerebro humano se detecta una concentración de oxígeno cercana al 4%, similar a la media del músculo esquelético o el hígado. El corazón presenta unos valores del 3,3% y los pulmones, pese a ser los órganos de captación de oxígeno, son nutridos por concentraciones del 5,6%. Órganos como el intestino delgado o los riñones presentan concentraciones mayores al 8% y a la piel, sin embargo, sólo llega oxígeno al 1%¹⁵⁷.

En mamíferos existe una respuesta al descenso de los niveles de oxígeno a nivel sistémico y también una respuesta a nivel molecular. La respuesta fisiológica completa consiste en reflejos agudos de hiperventilación y activación simpática para incorporar más oxígeno y distribuirlo por el organismo¹⁵⁸. Para llevar a cabo esta función existen órganos especializados formados por células sensibles a oxígeno como el cuerpo carotídeo^{159,160}. Cualquier circunstancia o patología que suponga una interrupción en la captación y distribución del oxígeno puede desencadenar esta respuesta. Por ejemplo, la altitud geográfica supone un descenso de la concentración de oxígeno atmosférico y desencadena una respuesta sistémica de adaptación¹⁶¹.

Por otro lado, a nivel patológico, fallos respiratorios, de flujo sanguíneo o en los niveles de hemoglobina también pueden arrancar la respuesta a hipoxia. Algunas de las enfermedades capaces de activar los mecanismos fisiológicos de la respuesta a hipoxia son la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la apnea del sueño, la fibrosis pulmonar, la cardiopatía isquémica o el fallo cardíaco crónico. Además, se ha visto que otros trastornos y patologías como la hipertensión, la diabetes, algunas enfermedades renales y hepáticas están también relacionados con la respuesta a hipoxia.^{158,162}

Como se ha mencionado, también existen mecanismos de adaptación a los niveles bajos de oxígeno a nivel molecular. El más relevante es el llevado a cabo por los factores inducibles por hipoxia (HIFs). Esta ruta molecular puede activarse en todas las células y su funcionamiento depende de la estabilización de las subunidades HIF α (HIF1 α , HIF2 α o HIF3 α) en hipoxia¹⁶³. Cuando esto sucede, los componentes HIF α dimerizan con HIF1 β , también conocido como ARNT, y el conjunto es traslocado al núcleo. Una vez allí, el heterodímero se une a elementos de respuesta a hipoxia (HRE) (G/ACGTG) del ADN y promueven así la transcripción de los genes que las contienen^{164,165}.

La vía de regulación más relevante de las proteínas HIF α es postraducciona y la llevan a cabo los enzimas con dominio prolil-hidroxilasa (PHDs) que son sensibles a los niveles de oxígeno. Existen 4 isoformas de estos enzimas, de las cuales PHD2 es la más importante y cuyo rango de activación es óptimo en normoxia e hipoxia moderada. Las PHDs hidrolizan 1 o 2 residuos de prolina bien conservados en las proteínas HIF α , haciendo a estas proteínas afines a la ubiquitinización mediada por la proteína von Hippel-Lindau (VHL). Esta última modificación marca a las HIF α para la degradación vía proteasoma. Además, el factor inhibidor de HIF1 α (FIH1), otra proteína sensible a oxígeno, también hidroxila residuos de HIF α . En este caso, sin embargo, las modificaciones son en residuos de asparagina e impiden la unión de HIF α a sus coactivadores transcripcionales p300/CBP. FIH1 es activa a niveles de oxígeno más bajos que las PHDs y se encarga de inhibir esencialmente a HIF1 α , ya que se ha observado que HIF2 α es, en comparación, resistente a su acción^{165,166}.

Existen notables diferencias funcionales entre las isoformas HIF1 α y HIF2 α . Mientras que HIF1 α se considera una proteína ubicua, la actividad de HIF2 α es específica de distintos tipos celulares como cardiomiocitos, células endoteliales, hepatocitos, células gliales o intersticiales de riñón. Además, se responsabiliza a HIF1 α de la respuesta a hipoxia aguda y a HIF2 α de la

respuesta a hipoxia crónica y a la provocada por la altura. Ambas proteínas comparten algunas dianas transcripcionales, tales como el canal transportador *GLUT1* o *VEGF*, pero regulan otras de manera específica como *LDHA* o *PGK1* en el caso de HIF1 α y *EPO*, *MMP9* u *OCT4* en el caso de HIF2 α . Estas especificidades dependen tanto del contexto celular como de la concentración de oxígeno¹⁶⁷. Además, existe la tercera subunidad HIF α , denominada HIF3 α y cuya expresión en tejidos adultos se localiza en el timo, el cerebro, los pulmones, el corazón y los riñones. Esta isoforma presenta múltiples “*splicing*” alternativos y muchos de ellos carecen del dominio transactivador que se encuentra en las subunidades HIF1 α y HIF2 α . Debido a esto, se ha atribuido a HIF3 α una función inhibidora de la transcripción dependiente de HIF. Particularmente, uno de los productos de “*splicing*”, denominado IPAS, puede unirse a HIF1 α y formar un heterodímero incapaz de activar la transcripción de genes que contienen HRE^{166,168}.

5.2. Relación entre la respuesta molecular a hipoxia y senescencia celular

La hipoxia es una característica de los tumores localmente avanzados, cuya falta de vascularización priva de oxígeno a las células. Además, se sabe que la hipoxia facilita la progresión tumoral y es un marcador de mal pronóstico en pacientes^{169,170}. Sin embargo, aún queda por aclarar si la hipoxia funciona como un estrés capaz de inducir senescencia en células normales, o bien, facilita la inmortalización previa a la transformación maligna contribuyendo a la tumorigénesis. A este respecto, existen diversos estudios que describen cómo concentraciones de oxígeno diferentes, especialmente de bajos niveles de oxígeno, pueden alterar la vida proliferativa de las células. En el caso de fibroblastos humanos se consigue un aumento la vida proliferativa de vida alrededor del 20%, mientras que en fibroblastos bovinos el aumento alcanza el 80% y en los de ratón hasta el 500%^{171–174} (**Tabla I 1**).

Tabla I 1. Incremento de la vida proliferativa *in vitro* en distintos modelos de fibroblastos de mamífero.

Modelo Celular	Concentración de O ₂	Incremento de vida proliferativa	Referencia
IMR90, WI38	2 y 10%	25%	Packer et al. Nature, 1977
IMR90	1, 6 y 12%	22%	Saito et al. Exp. Cell Research, 1995
Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)	3%	500%	Parrinello et al. Nature Cell Biology, 2003
Fibroblastos fetales bovinos (BFF)	2%	80%	Betts et al. Biogerontology, 2008

En concreto, el aumento en la proliferación de MEFs cultivados en hipoxia respecto a normoxia ha sido justificado debido a la diferencia de daño oxidativo acumulado. Los MEFs cultivados en una atmósfera del 20% O₂ acumulaban más daño que en 3% de O₂ y más que fibroblastos primarios humanos sometidos a las mismas condiciones experimentales. Los MEFs proliferaban en hipoxia a pesar de conservar intacta la vía p19^{Arf}/p53, esencial para su

inmortalización¹⁷⁵, y con niveles altos de expresión de *p16^{INK4a}*. Además de esto, MEFs deficientes en diferentes proteínas implicadas en la reparación del ADN detenían la proliferación con una gran acumulación de daño en el ADN cuando eran cultivadas en 3% O₂. No sucedía así cuando se suprimía la actividad telomerasa en ellos. Por tanto, se ha sugerido que la acumulación de daño en el ADN es la que induce senescencia de los MEFs en normoxia y que la alteración en la vía *p19^{Arf}/p53* en estas condiciones de oxígeno hace insensibles a las células a este daño, inmortalizándolas. También se ha sugerido la existencia de una respuesta mutagénica o adaptativa adquirida en hipoxia que permite prolongar la vida proliferativa a pesar de la actividad de *p19^{Arf}/p53* y *pRb/p16^{INK4a}*. Esta adaptación solo se mantiene en normoxia en una fracción de los MEFs expuestos durante más tiempo a hipoxia.

Por otro lado, también se sugiere que las células humanas, que inician la senescencia replicativa debido al acortamiento telomérico¹⁷⁶, tienen mayor capacidad para prevenir o reparar el daño oxidativo y, por eso, la diferencia entre la proliferación en normoxia e hipoxia es mucho más baja. Esta diferencia fisiológica entre humano y ratón podría definir también la diferencia en la incidencia de cáncer y la velocidad de envejecimiento de ambas especies¹⁷³.

Adicionalmente, también se ha propuesto que el aumento de la glicolisis contribuye a la disminución de daño oxidativo y, así, puede facilitar la inmortalización celular. El aumento de expresión de *PGM* puede evitar la senescencia replicativa en MEFs, así como la senescencia inducida por *Ras*. Esto es debido al aumento del flujo glicolítico¹⁷⁷.

Alternativamente, se ha intentado explicar esta extensión de la vida proliferativa celular mediante la activación de distintas rutas señalización, especialmente, la mediada por los factores HIF α . Por ejemplo, se ha observado la acción de HIF1 α y HIF2 α sobre distintas dianas transcripcionales entre las que se incluyen *p21^{Cip1}* y *c-MYC*^{178,179}. También se ha sugerido la activación transcripcional de *hTERT* por parte de HIF1 α , para lo que se cree que es necesaria la presencia de ROS mitocondrial¹⁸⁰. Además de todo esto, se ha descrito la inhibición de p53 de manera dependiente e independiente a los factores HIF α ¹⁸¹ y se ha observado supresión de la geroconversión de manera independiente a los factores HIF α y a p53¹⁸².

Entre los mecanismos propuestos que promueven la senescencia vía HIF1 α destacan la parada de ciclo por la activación *p21^{Cip1}* y *p27^{Kip1}*^{183–185} o por la inhibición de *CDC25A*¹⁸⁶. A su vez, la hipoxia tiene relación con el SASP y, por tanto, con la inducción autocrina y paracrina en la senescencia. En este sentido, se ha observado la inducción transcripcional por parte de HIF1 α de múltiples genes relevantes en SASP como *IL8*, *CXCR2*, *GRO α* , *IL6* o *PAI1*¹⁸⁷. De manera independiente a los factores HIF α , se ha observado inducción de senescencia en diferentes contextos. En anoxia, diferentes vías de señalización inducen la parada de ciclo sin la intervención de HIF1 α ¹⁸⁷. En células con pérdida de la proteína VHL se induce senescencia debido a la acción de p400 y p27^{Kip1} de forma independiente a los factores HIF α ¹⁸⁸. También existen evidencias en hipoxia sobre la aparición de senescencia en células de melanoma de ratón relacionada con alta expresión de *BCL-2*¹⁸⁹.

6. Hipoxia y capacidades de célula madre

6.1. Hipoxia y células madre embrionarias y adultas

La hipoxia ha sido también asociada a las células madre. Las primeras evidencias halladas se relacionan con el desarrollo del organismo, ya que los embriones están expuestos a un estado parcial de hipoxia durante la gestación¹⁹⁰. Asimismo, se ha demostrado que tanto las células madre embrionarias como las somáticas residen en nichos hipóxicos. En estos nichos se crea un microambiente que contiene niveles de oxígeno incluso más bajos que los órganos y tejidos donde se encuentran (1-8% O₂)¹⁹¹.

En el caso de las células madre embrionarias (ESCs) pueden mantenerse *in vitro* de manera indefinida cuando son cultivadas en unas condiciones concretas. Estas condiciones específicas de cultivo intentan mantener activas las principales rutas moleculares de pluripotencia y autorrenovación. En las ESCs es esencial la actividad de los factores de transcripción Oct3/4, Sox2 y Nanog que constituyen el núcleo del circuito de pluripotencia. Oct3/4 es capaz de unirse al ADN y controlar la expresión de múltiples genes relacionados con la pluripotencia. Para ello, puede actuar como heterodímero con Sox2 y regula la transcripción de genes como *Lefty1*, *Fgf4* o los propios *Oct3/4*, *Sox2* y *Nanog*. Además, Oct3/4 se une a “*enhancers*” (regiones reguladoras del ADN que pueden incrementar la transcripción de genes asociados a ellas cuando se les unen proteínas) de genes de pluripotencia y su expresión en ESCs está fielmente regulada ya que niveles muy altos, o muy bajos de esta proteína conducen a la diferenciación. Por su parte, Nanog actúa coordinadamente con Oct3/4 y Sox2, pero sus niveles fluctúan en las poblaciones de ESCs. Entre sus dianas transcripcionales se hallan genes relacionados con pluripotencia como *Esrrb*, *Rif1*, *Foxd3* y *Rest*. Además de estos 3 factores de transcripción del núcleo del circuito de pluripotencia, otras proteínas se han descrito con un papel principal en el mantenimiento de las capacidades de las ESCs como son SMAD1 o STAT3 y algunos coordinadores de su actividad reguladora como Klf4, Esrrb, c-Myc y Tfcp2l1. A un nivel más general, la acción de todas estas proteínas recalca en la activación de las rutas de señalización celular LIF/Stat3, Wnt/ β -Catenina, FGF/ERK, TGF/SMAD y PKC¹⁹².

Múltiples estudios han demostrado la ventaja de cultivar ESCs y otros tipos de células madre en condiciones de hipoxia para mantener la pluripotencia y la capacidad de renovación de las ESCs. Así, se sabe que la capacidad de autorrenovación, la pluripotencia y la expresión de muchos marcadores y efectores de célula madre, como *Nanog*, *Oct3/4* o *Sox2*, están favorecidas por la hipoxia, de manera dependiente o independiente a los factores HIF α . Por ejemplo, se sabe que la baja concentración de oxígeno ayuda a la supervivencia de las células de la cresta neural o las células madre hematopoyéticas y que previene la diferenciación de las ESCs. A pesar de todas las evidencias generadas, existe gran controversia en cuanto a la influencia de la hipoxia en la capacidad de diferenciación o desdiferenciación de estas células. Esto es debido, probablemente, a la influencia que ejercen parámetros como el estadio de maduración de las células madre, la duración del cultivo en hipoxia y el nivel de oxígeno empleados en los estudios^{193–196}.

6.2. Hipoxia y células madre pluripotentes inducidas (iPSCs)

Las células de mamífero pueden ser reprogramadas a células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) mediante la transducción de los factores de transcripción Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc, también conocidos como *factores de Yamanaka*^{197,198}. Sin embargo, la aplicación de este recurso biológico a la terapia celular en pacientes es, actualmente, limitado. Esto es debido a la baja eficiencia de generación de las iPSCs y el riesgo oncogénico que implican los protocolos de reprogramación. Este riesgo lo genera la activación del protooncogén *c-Myc* y el uso de virus que puede alterar el genoma al insertar construcciones exógenas de manera aleatoria en él^{199,200}. Aunque se ha demostrado que la hipoxia aumenta la eficiencia de reprogramación y reduce el número de factores de transcripción necesarios, no se conocen los mecanismos por los que es capaz de producir este efecto en la reprogramación²⁰¹. Existen estudios que proponen diferentes efectores moleculares como responsables, sin embargo, la discusión ha sido especialmente fijada en los principales reguladores de la respuesta a hipoxia, HIF1 α y HIF2 α . Entre los mecanismos descritos destaca el cambio de metabolismo mitocondrial oxidativo hacia la glicolisis, que es común a células madre e iPSCs. Para esta reprogramación metabólica parece necesaria la actividad de los factores HIF1 α y HIF2 α , lo cual, tiene como consecuencia un aumento de la eficiencia de reprogramación y de la pluripotencia. No obstante, parece que la activación de cada factor HIF α es específico de cada etapa de reprogramación ya que la estabilización de HIF2 α en etapas finales resulta en la inhibición de la generación de iPSCs^{196,202–204}.

En un primer momento, se concibió la senescencia exclusivamente como una barrera a la reprogramación celular. Esto se determinó debido a la activación de sus principales vías efectoras (p53, p16^{INK4a}, p21^{CIP1}, DDR y remodelación del locus *INK4a/ARF*) ante la sobreexpresión de los factores de Yamanaka. Otra evidencia importante fue la detección del silenciamiento completo del locus *INK4a/ARF* tanto en iPSCs maduras como ESCs. Se ha comprobado que la inhibición de esos efectores de la senescencia es capaz de aumentar la eficiencia de reprogramación en fibroblastos humanos y de ratón, aunque implica riesgo oncogénico^{205,206}.

Posteriormente, sin embargo, se ha observado que la senescencia favorece la eficiencia de reprogramación *in vivo*. Esto sucede a través de la función paracrina del SASP. Cuando se sobreexpresan los factores de Yamanaka, una gran parte de las células de un tejido activan la barrera de la senescencia y sólo algunas células permiten la reprogramación. Las células senescentes inician entonces la secreción de múltiples factores del SASP, entre los cuales, IL6 parece tener un papel esencial. Son la secreción de esta interleuquina y la activación de sus dianas moleculares las que aumentan la eficiencia de reprogramación de las células no senescentes del tejido. Para que este fenómeno suceda, se ha descrito que es necesaria la función del locus *INK4a* iniciando la respuesta senescente y produciendo IL6. En cambio, se ha demostrado que no son necesarios p53, *Arf* ni *p21^{Cip1}* en este proceso. Este fenómeno de aumento de la reprogramación *in vivo* se observa en la senescencia iniciada por daño en tejidos o el envejecimiento^{207–209}.

Recientemente, se han añadido evidencias de la relación entre la senescencia y la reprogramación. Así, se ha demostrado que la sobreexpresión interrumpida y cíclica de OSKM interviene en la remodelación epigenética asociada al envejecimiento en modelos murinos²¹⁰. También se ha descrito que la senescencia inducida por tratamiento quimioterápico, mediada por p53 y el marcador epigenético H3k9Me3, contribuye a la adquisición de características de células madre en células tumorales *in vivo*²¹¹. Además, se ha observado que el SASP favorece la plasticidad celular y la regeneración tisular, ya que al incorporar células senescentes en hígado de ratón aumentan los marcadores de célula madre específicos de este tejido²¹².

6.3. Hipoxia y células madre tumorales

Los tumores son entidades heterogéneas que están compuestas por células con distinta identidad, entre ellas las células madre tumorales (CSCs). Las CSCs tienen capacidad de autorrenovación y diferenciación en otras células tumorales y se cree que son capaces de iniciar el tumor. Aunque tienen capacidades similares a las células madre normales, los mecanismos que controlan estas capacidades en las CSCs están desregulados, pudiendo generar y expandir así el tumor²¹³. En 1997 se identificaron por primera vez células CD34+ CD38- de pacientes con leucemia mieloide aguda como las únicas con capacidad de regenerar enfermedad en ratones²¹⁴. Desde entonces se han aislado CSCs en tumores de mama, colon, cerebro y muchos otros tipos¹⁶⁹.

Las CSCs no son una entidad fija en la heterogeneidad que forma el tumor, sino que se consideran un estado celular. Células dentro del tumor se diferencian y desdiferencian hacia este estado o para salir de él y el microambiente tumoral juega un papel esencial en ello. Por ejemplo, se ha demostrado que las CSCs pueden influir en fibroblastos cercanos para transformarlos en los denominados fibroblastos asociados al cáncer (CAFs). Estos CAFs, a su vez, promueven las vías WNT y NOTCH para contribuir al mantenimiento de las CSCs^{215,216}. Las células madre mesenquimales del estroma promueven el mantenimiento de CSCs a través de la activación de la ruta de señalización de NFκB, la secreción de CXCL12, Il6 e IL8. A su vez, las CSCs pueden modular el microambiente a través de TGFβ para imitar las condiciones de nicho de célula madre, así como promover la transición epitelio-mesénquima (EMT) y modificar nichos distales mediante la secreción de factores como VEGFA, TGFβ, TNFα y LOX.

La hipoxia es parte del microambiente tumoral y tiene una gran relevancia en tumores localmente avanzados, cuya vascularización no permite la llegada de oxígeno y nutrientes a todas las células. Esta falta de oxígeno desencadena una respuesta de supervivencia. La respuesta celular a hipoxia contribuye a la progresión tumoral, la angiogénesis, la reprogramación metabólica, modula la respuesta inmune, favorece la metástasis y genera resistencia a terapia. Todas estas consecuencias hacen que la hipoxia correlacione clínicamente con la agresividad y el mal pronóstico de la enfermedad y que los mediadores de su respuesta a nivel molecular se hayan considerado como diana terapéutica^{169,170}.

En la respuesta a esta condición del microambiente participan distintas rutas moleculares, como se ha mencionado anteriormente, pero la más estudiada es la ejecutada por los factores HIF α . También se sabe que en tumores que preservan condiciones normales de oxígeno algunos oncogenes como AKT y la pérdida de supresores tumorales como PTEN, PML o TSC también pueden activar la traducción de los factores HIF α ¹⁶⁹. Ha sido demostrado que la hipoxia puede promover la dediferenciación y el mantenimiento de las propiedades de CSCs. Entre otros genes promovidos por la hipoxia, destaca la contribución a este fenómeno de *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *KLF4* y la ruta de señalización NOTCH, así como los modificadores epigenéticos *BMI1* o *SIRT1*^{170,217-219}. Además, parece que HIF1 α también puede contrarrestar el efecto de c-MYC, parando el ciclo celular y manteniendo la identidad CSCs ¹⁸³.

Se ha observado una relación directa entre la hipoxia y el estado durmiente de las CSCs. En las regiones hipóxicas necrosadas del tumor, las células presentan un fenotipo dediferenciado y de estado durmiente, mientras que no lo presentan en las zonas próximas a vasculatura¹⁶. De este modo, se ha propuesto que la hipoxia puede activar el estado durmiente para aumentar la supervivencia ante estrés en las CSCs. Por ejemplo, en células de glioblastoma, la hipoxia activa *PP2A* para mediar el programa de estado durmiente induciendo parada de ciclo celular G1/S¹⁹. En próstata, HIF1 α puede activar la expresión de *CXCR4* y *NDRG1*, que es regulado por n-MYC para inducir un estado durmiente^{17,18}. Además, *HIGD1A*, una diana transcripcional de HIF1 α también puede promover el estado durmiente a través de la producción de ROS¹⁵.

También ha sido demostrada una relación entre la señalización mediada por hipoxia y por ROS. Ambos activan la señalización de estrés de las CSCs a través de las rutas moleculares TGF β y TNF α para promover la supervivencia y el mantenimiento de la identidad de célula madre tumoral, además de promover EMT. A su vez, TGF β puede estabilizar los factores HIF α . También se ha descrito que HIF1 α aumenta la síntesis de glutatión en la respuesta a estrés inducido por quimioterapia, lo cual provoca la adquisición del fenotipo CSCs¹⁶⁹.

Se ha propuesto que la hipoxia puede alterar la población de CSCs en el tumor de dos formas diferentes: promoviendo la dediferenciación de células del tumor o limitando la diferenciación de las CSCs. Por ejemplo, en carcinoma primario de mama, la hipoxia incrementa la población de células CD44⁺/CD24⁻ y aumenta la ALDH⁺ a través de HIF1 α y la ruta de señalización AKT/ β -catenina²²⁰. Sin embargo, parece que es PHD3 quien activa NF κ B de manera independiente a los factores HIF α y aumenta la población de células CD44⁺/CD24⁻ en cáncer de mama ER-negativo en hipoxia²²¹.

Ambas isoformas, HIF1 α y HIF2 α , tienen funciones importantes en la respuesta a hipoxia y en la adquisición de propiedades de célula madre en tumores. Sin embargo, parece que los tumores tienen preferencia por la isoforma HIF2 α . En líneas celulares de glioma, existe una subpoblación de células con mayores capacidades de migración. Estas células tienen una alta expresión de *SOX2* y *OCT3/4*, que parece estar inducida por HIF2 α ²²². También en gliomas, se ha observado que el marcador de membrana CD44 libera su parte citoplásmica. Este fragmento

intracelular se une a HIF2 α para aumentar la expresión de genes relacionados con las capacidades de célula madre²²³. En un modelo de leucemia inducida por *MYC*, *NANOG* y *SOX2* facilitan la unión de *MYC* al promotor de *HIF2 α* y este último mantiene el estado inhibiendo p53 y la producción de ROS²²⁴. Además de todo esto, se ha descrito que HIF2 α también activa la expresión de *LIF* y se ha encontrado una alta correlación entre la expresión de ambos en pacientes de cáncer colorrectal²²⁵.

Se ha comprobado que la EMT proporciona una mayor agresividad al crecimiento tumoral ya que las células suelen adquirir propiedades de CSCs, motilidad, capacidad de invasión y diseminación, además de resistencia a la senescencia, a distintas terapias y a la eliminación por el sistema inmune²²⁶. La hipoxia favorece la metástasis aumentando la expresión de genes relacionados con EMT cuya expresión es, además, frecuente en las CSCs. A través de HIF1 α , la hipoxia puede activar la transcripción de *SNAI1*, *ZEB1*, *TWIST1* o *TCF3*^{227,228}. En cáncer de mama, por ejemplo, la hipoxia activa ZEB1 e inhibe MYB para promover EMT²²⁹. Además, la expresión de genes EMT es necesaria para la aparición de las células de tumor circulantes (CTCs). Estas células pueden originar metástasis y poseen características de CSCs. Se han hallado CTCs de distintos tipos de tumor que expresan los marcadores de CSCs en el torrente sanguíneo de pacientes. Por ejemplo, CTCs de hepatocarcinoma presentan los marcadores CD45⁻ ICAM1⁺, en cáncer de próstata las CTCs son CD133⁺ y en carcinoma de mama, ALDH⁺. Además, en muchos casos las CTCs halladas en pacientes presentan expresión de *OCT3/4*, *SOX2* y *NANOG*¹⁶⁹. La hipoxia, además, puede modular la secreción de vesículas al incrementar la expresión de la GTPasa asociada a endosoma RAB22A y el marcador de exosoma CD63. Se sabe que estos exosomas en hipoxia suelen contener moléculas como VEGFR2, TNF α 1, β -catenina, AKT o EGFR que contribuyen a la progresión tumoral, la angiogénesis, la inmunosupresión, la invasión y la metástasis^{230–232}.

Los tumores presentan una alta actividad glicolítica que suple a la fosforilación oxidativa, incluso en condiciones normales de oxígeno y a pesar de ser mucho menos eficiente. Este fenómeno se conoce como *efecto Warburg* y tiene como consecuencia un alto consumo de glucosa²³³. Esto supone una ventaja en hipoxia que se refuerza, además, por la respuesta adaptativa mediada por la vía de señalización de HIF al inducir la expresión de enzimas clave de la glicolisis e inhibir el metabolismo mitocondrial. HIF1 α puede promover la activación de *PDK1* impidiendo la conversión de piruvato en acetil-CoA y bloqueando el flujo hacia el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA)²³⁴. También puede activar la transcripción de *LDHA* que convierte piruvato en lactato y también restringe el flujo hacia acetil-CoA. Además de esto, HIF1 α promueve la transcripción de *PKM2*, el cual lleva a cabo el último paso de la glicolisis y también funciona como coactivador de HIF1 α para promover la vía glicolítica y el crecimiento tumoral¹⁷⁰. Se ha demostrado que las células transformadas expresan otras isoformas de enzimas clave de la glicolisis respecto a las células normales y HIF1 α aumenta la expresión de ellas. Por ejemplo, HIF1 α induce la transcripción de *HK2* y de *ENO1* y esto ayuda a inhibir la apoptosis y promover la migración celular. Además, HIF1 α también puede inducir la expresión de los transportadores de glucosa *GLUT*^{235,236}. Estos transportadores se han encontrado sobreexpresados en CSCs de

glioblastoma, de cáncer de ovario y de páncreas y son capaces de promover la autorrenovación y la capacidad de iniciación tumoral²³⁷.

La hipoxia también se ha relacionado con la inducción de modificaciones epigenéticas que promueven la progresión tumoral. Por ejemplo, se ha demostrado que la hipoxia puede modular la actividad de TET, la cual induce la metilación *de novo* en la secuencia de genes asociados a EMT como *INSIG1*^{178,238}. La hipoxia también es capaz de modular la acción de modificadores de histonas como HDAC3 y WAD5 que median EMT en cáncer de cabeza y cuello y en células de tumor de mama²³⁹. Además, existen miRNAs como miR-21, miR-200 o miR-210 que se expresan en hipoxia y que regulan EMT²⁴⁰⁻²⁴³. También se sabe que los factores HIF α intervienen en la regulación de la expresión de *ZNF127* y *ALKBH5* los cuales pueden desmetilar el extremo 3'-UTR de los ARNm de *KLF4* y *NANOG* incrementando así su expresión en tumores de mama²⁴⁴.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es el estudio del efecto de la hipoxia sobre la senescencia y la inmortalización celular. Para llevarlo a cabo, se definieron los siguientes objetivos específicos:

1. Comparación de la extensión de la vida proliferativa y la aparición de características asociadas a la senescencia en fibroblastos primarios cultivados en condiciones de hipoxia y normoxia.
2. Identificación de los cambios transcripcionales responsables del aumento de la vida proliferativa y la evasión de la senescencia en hipoxia.
3. Estudio funcional de los genes responsables del aumento de la vida proliferativa y la evasión de la senescencia en hipoxia.
4. Estudio de los de los genes responsables del aumento de la vida proliferativa y la evasión de la senescencia en hipoxia como posibles responsables del efecto de la hipoxia sobre la reprogramación celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos biológicos utilizados

1.1. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en esta tesis se describen en la **Tabla MM 1**.

Tabla MM 1. Plásmidos utilizados.

Plásmido	Secuencia	Resistencia en Eucariotas	Procedencia
pLKO.1-Scramble shRNA		Puromicina	Qi-Long Ying
pLKO.1-m <i>Tfcp2l1</i> shRNA#1	GCAGGAATGTGAGGCCAAAGA	Puromicina	Qi-Long Ying
pLKO.1-m <i>Tfcp2l1</i> shRNA#2	GCTCTTCAATGCCATCAAAGG	Puromicina	Qi-Long Ying
pLenti-CMV-MCS-GFP-SV	GFP	Puromicina	Addgene #73582
pLenti-CMV- <i>Tfcp2l1</i>	<i>Tfcp2l1</i>	Puromicina	Origene (PS100081)
pLenti-CMV- <i>rtTA3</i> (w756-1)	<i>rtTA3</i>	Blasticidina	Addgene #26429
pLenti-CMVtight-DEST (w769-1)	-	Higromicina	Addgene #26433
pENTR/D-TOPO	-	-	ThermoFisher
pLenti-CMVtight- <i>Tfcp2l1</i>	<i>Tfcp2l1</i>	Higromicina	Amancio Carnero
pcDNA3-m <i>Hif1α</i> -Myc (P402A/P577A/N813A)	<i>mHif1α</i> -Myc (P402A/P577A/N813A)	-	Addgene #44028
pLenti-CMV-DEST (w118-1)	-	Puromicina	Addgene #17452
pLenti-CMV- <i>mHif1α</i> -Myc (P402A/P577A/N813A)	<i>mHif1α</i> -Myc (P402A/P577A/N813A)	Puromicina	Amancio Carnero
pMXs-gw	-	-	Shinya Yamanaka
pMXs- <i>DsRed</i>	<i>DsRed</i>	-	Shinya Yamanaka
pMXs- <i>Oct3/4</i>	<i>Oct3/4</i>	-	Shinya Yamanaka
pMXs- <i>Sox2</i>	<i>Sox2</i>	-	Shinya Yamanaka
pMXs- <i>Klf4</i>	<i>Klf4</i>	-	Shinya Yamanaka
pMXs- <i>c-Myc</i>	<i>c-Myc</i>	-	Shinya Yamanaka
pMXs- <i>Tfcp2l1</i>	<i>Tfcp2l1</i>	-	Yoshinori Yoshida
psPAX2	CAG/POL	-	Addgene #12260
pMD2G	VSV-G	-	Addgene #12259

1.2. Cepas bacterianas

Los plásmidos utilizados se propagaron en la cepa de *E.coli* DH5α y *E.coli* Stbl3 (Invitrogen), con excepciones en el protocolo de clonación Gateway. Se crecieron en medio LB (10 g/l de tripton, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl pH 7,0) a 37°C, con agitación, durante 16h. Todos los plásmidos incluían ampicilina como resistencia bacteriana y se utilizó en el medio de selección, con excepciones en el protocolo de clonación Gateway.

1.3. Antibióticos

Para realizar la selección de las células en cultivo se empleó puromicina (Nucliber), blasticidina (Merck), higromicina (Life Technologies) y ampicilina (Merck).

1.4. Tratamientos

Para los tratamientos se utilizaron los siguientes compuestos: dimetiloxalilglicina, (DMOG) 6 mM (Frontier scientific), Doxiciclina 100, 500 y 1.000 ng/μl (Merck).

2. Técnicas básicas de biología molecular

2.1. Transformación de células quimiocompetentes

A 100 μl de bacterias quimiocompetentes se les añadió una cantidad apropiada de ADN (habitualmente 100 ng de plásmido purificado). La mezcla de bacterias y ADN se incubó durante 30 minutos en hielo y después se dio un choque térmico a 42°C en un termobloque durante 45 segundos. A continuación, se mantuvieron las células en hielo durante 2 minutos y se añadieron 900 μl de medio SOC (20 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) a temperatura ambiente. Se incubaron 1 hora a 37°C en agitación. Después se centrifugaron durante 2 minutos a 8.000 rpm y se resuspendieron en 100 μl de medio SOC. Se extendió el cultivo en placas de LB-agar con el antibiótico de selección apropiado y se incubaron a 37°C durante 16 horas.

2.2. Extracción de ADN plasmídico

El protocolo se basa en una lisis alcalina seguida de la precipitación y purificación del ADN en una columna de intercambio iónico (sílice-dietilaminoetanol). El ADN se une a la columna en condiciones apropiadas de pH y baja concentración de sales, los contaminantes se eliminan en un lavado con tampón de fuerza iónica intermedia y el ADN se eluye en un tampón de alta concentración de sales. Por último, el ADN se precipita con isopropanol para concentrarlo y eliminar sales. En todos los casos (maxi o midi según el volumen de cultivo) utilizamos el kit JetStar2.0 Plasmid purification (Genomed) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Brevemente, se creció el cultivo líquido en medio selectivo (LB con el antibiótico apropiado según el plásmido) durante 12-16 h a 37°C, con agitación. El volumen de cultivo dependía de si era una maxi o midi (250 o 100 ml respectivamente). Las células se recuperaron por centrifugación durante 5 minutos y se resuspendieron en la solución de resuspensión (Tris HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, ARNasa A 100 μg/ml). Después se añadió la solución de lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1%), mezclando por inversión e incubando 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se neutralizó al añadir acetato potásico 3M pH 5,5, mezclando inmediatamente. Después se centrifugó durante 10 minutos y el sobrenadante se vertió en una columna previamente equilibrada, dejándolo caer por gravedad. Después, la columna se lavó dos veces con tampón de lavado (NaCl 1 M, MOPS 50 mM pH 7,0, 15% isopropanol) y el ADN se eluyó con tampón de elución (NaCl 1,25 M, MOPS 50 mM pH 8,5, 15% isopropanol). A continuación, el ADN se precipitó por adición de isopropanol y centrifugación durante 30 minutos a 4°C. Se lavó con etanol 70% y se centrifugó durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, se secó el pellet de ADN obtenido al aire y se resuspendió en un volumen apropiado de agua destilada libre de nucleasas.

Todas las centrifugaciones de este protocolo se realizaron en una centrífuga Evolution RC6 plus a una velocidad de 12.000 g.

2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se preparó una mezcla que contenía 0,2 mM de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmol de cada uno de los cebadores, 2 mM de MgCl₂, 1 U de polimerasa Taq y la cantidad adecuada de ADN molde (entre 30-100 ng), todo ello diluido en tampón de reacción contenido en el kit (Promega). Las reacciones se realizaron en termocicladores Bioer XP Cyclus. Las condiciones de reacción fueron específicas para cada caso, pero se siguió un programa estándar de partida: 1 minuto a 95°C, 35 ciclos de amplificación (1 minuto a 95°C, 2 minutos a 55°C, 2 minutos a 72°C) y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

2.4. Reacciones de digestión sobre el ADN

Se preparó una mezcla constituida por 1 µg de ADN plasmídico, 12 U de las enzimas de restricción EcoRI y NotI (New England Biolabs), 3 µg de BSA acetilado y el tampón apropiado para las enzimas de restricción en un volumen total de 30 µl. La mezcla se incubó 1 hora a 37°C. Adicionalmente, se realizaba una inactivación de la enzima mediante un choque térmico de 15 minutos a 65°C cuando el enzima lo requería. Por último, se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

2.5. Clonación mediante la tecnología de recombinación Gateway

2.5.1. Clonación de productos de PCR

Para permitir el clonaje direccional el cebador "*forward*" contenía la secuencia CACC seguido de ATG. De este modo, se permitió que el codón de inicio se hallase en el contexto de una secuencia Kozak. El protocolo de PCR empleado fue el detallado anteriormente, realizando modificaciones en los ciclos exclusivamente cuando las características de los cebadores lo requerían. La correcta amplificación de los fragmentos deseados se comprobó mediante reacción de restricción.

2.5.2. Reacción TOPO

Para introducir el fragmento de interés en el vector de entrada, se llevó a cabo una reacción con el vector pENTR/D-TOPO (ThermoFisher Scientific). Se emplearon de 1 a 10 ng de producto de PCR, 1 µl de solución salina provista por el kit, 1 µl de vector y se completó hasta 5 µl con agua estéril. Seguidamente, se incubó la reacción durante 5 minutos a temperatura ambiente y se procedió a la transformación de bacterias quimiocompetentes *E.coli One Shot Mach1* (ThermoFisher Scientific). Se crecieron las bacterias en placas con medio LB/agar y se extrajo ADN. La correcta inserción y orientación del fragmento de interés se comprobó mediante PCR y reacciones de restricción.

2.5.3. Reacción de recombinación LR

Los vectores de destino Gateway se amplificaron en bacterias *ccdB* resistentes *E.coli ccdB Survival 2* (ThermoFisher). Posteriormente, el gen de interés se clonó en el vector de destino Gateway seleccionado mediante la reacción de recombinación LR. Para ello, se mezclaron 50-300 ng de vector de entrada pENTR/D-TOPO conteniendo el fragmento de interés clonado con 300 ng del vector de destino Gateway, 1 µl de enzima LR Clonasa II (ThermoFisher Scientific) y 1 µl de agua estéril. Por último, se transformaron bacterias quimiocompetentes con µl del producto de reacción. Los clones que crecieron en placas con medio LB/agar y el antibiótico de selección adecuado fueron analizados mediante PCR y las reacciones de restricción adecuadas.

3. Cultivos celulares

3.1. Líneas celulares

En la **Tabla MM 2** se describen las características de las líneas celulares utilizadas en este trabajo. Se incluye el medio de cultivo en el que se crecieron, el origen y el tipo celular que representan.

Tabla MM 2. Líneas celulares utilizadas.

Línea Celular	Especie	Tipo celular	Medio de cultivo	Crecimiento	Origen
MEFs-WT	Ratón	Fibroblasto	DMEM	Adherente	Primario; Amancio Carnero
MEFs-Nanog-GFP	Ratón	Fibroblasto	DMEM	Adherente	Primario; Yoshinori Yoshida
HEK-293-T	Humana	Tejido renal embrionario	DMEM	Adherente	ATCC
Plat-E	Humana	Tejido renal embrionario	DMEM	Adherente	Cell biolabs, INC.
MSTO SNL Feeder Layer-PuroR-HygroR	Ratón	Fibroblasto	Medio MSTO	Adherente	Yoshinori Yoshida

WT: fenotipo silvestre. ATCC: colección americana de cultivos tipo.

3.2. Cultivo y conservación de las líneas celulares

Todas las líneas, con excepciones en el protocolo de iPSCs, se cultivaron en medio DMEM con glutamina estable, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Life Technologies), 40 µg/ml de penicilina, 40 µg/ml de estreptomycin (Merck). Las células se crecieron en placas de 10 centímetros (Falcon) y se subcultivaron 1:3 - 1:12, según la línea celular, cada 3-4 días mediante tratamiento con tripsina/EDTA 0,25% (Life Technologies). Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ al 20% de O₂ o al 3% de O₂ en el caso de las condiciones de hipoxia. Esto se consiguió utilizando un sensor y regulador de O₂ y ajustando su concentración mediante la inyección de nitrógeno (ThermoFisher Scientific). Todas las manipulaciones se hicieron en una campana de flujo laminar de Clase II Bio-II-A (nivel de seguridad biológica 2; Telstar).

Para su almacenamiento a largo plazo, las células se conservaron en un contenedor de nitrógeno líquido, en criotubos de 2 ml, en su medio de cultivo normal o FBS, con 8% de DMSO.

Para periodos de almacenamiento más cortos las células se conservaron a -80°C . Para descongelar un vial, se sumergió en un baño de agua a 37°C durante 2 minutos; se centrifugó el contenido en 5 ml de medio y las células se resuspendieron en su medio de cultivo habitual.

3.3. Generación de MEFs

Los MEFs se generaron a partir de embriones de ratones de 13,5 días. Se sacrificó a la hembra preñada a los 13,5 días de dar tapón mucoso, y se extrajo el útero con todos los embriones en su interior. A partir de este momento se trabajó en esterilidad, en campana de flujo laminar. Se procedió a la separación de cada uno de los embriones, los cuales, tras retirar los órganos diferenciados (cabeza y tejidos rojos), se recogieron individualmente en placas de 10 cm donde se disgregaron con un bisturí estéril. Seguidamente, los fragmentos de tejido se sometieron a una digestión enzimática primero con tripsina 2,5% (Invitrogen) y después con una solución de enzima colagenasa tipo IV (Merck) diluida en medio DMEM y agua. Por último, el tejido disgregado se sembró en placas o flascos y se incubó a 37°C como se detalló para el resto de células anteriormente.

3.4. Infección lentiviral

3.4.1. Transfección células HEK-293-T mediante reactivo polietilenimina (PEI)

A 24 horas de la transfección, se sembraron las células HEK-293T con tal de que su confluencia alcanzase el 70-80%. Se mezclaron en 900 μl de medio de cultivo DMEM, 80 μl de solución PEI 1mg/ml, 10 μg del ADN de interés a transducir, 8 μg de vector psPAX2 (que contiene los genes *GAG* y *POL*) y 2 μg de vector pMD2G (que contiene el gen *VSV-G*) para la producción de las partículas lentivirales. Posteriormente, se incubó la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente y se añadió a las células.

3.4.2. Producción de virus e infección/transducción

Se cambió el medio de las células HEK-293T 16 horas después de la transfección, añadiendo 6 ml de DMEM fresco a cada placa. Tras 24 horas a 37°C , se recogió ese medio conteniendo las partículas lentivirales producidas y se pasó por un filtro de acetato de celulosa de 0,45 μM (VWR) para evitar la contaminación de las células a infectar. Se realizó una dilución 1:4 de este sobrenadante con DMEM. Este medio fue suplementado con 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de polibreno (Merck). Para la infección y transducción, se reemplazó el medio de cultivo de las células receptoras por medio nuevo con el sobrenadante lentiviral y las placas fueron incubadas a 37°C durante 6 horas. Después, se cambió el medio y se mantuvieron 24 horas a 37°C , momento en el que se comenzó la selección con el antibiótico apropiado.

3.5. Selección de células infectadas

Tras 24 horas de incubación se tripsinizaron las células, se dividieron 1:4 y se comenzó la selección con el antibiótico apropiado. Este se mantuvo durante el tiempo necesario para que se produjera la muerte de las células sin infectar. Una vez finalizada la selección, para el mantenimiento, se redujo la concentración del antibiótico a la mitad.

3.6. Generación de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs)

Para la generación de iPSCs se utilizaron MEFs-*Nanog-GFP*. Estos MEFs procedían de ratones transgénicos que poseían un “cassette” reportero para la expresión de *Nanog* (GFP-IRES-Puro introducido en la región no traducida 5' del gen *Nanog*¹⁹⁸).

Antes de comenzar con el cultivo de MEFs-*Nanog-GFP*, se sembraron $3,6 \times 10^6$ células Plat-E en placas de 10 cm de diámetro y se cultivaron durante 24 horas. Se llevó a cabo la transfección de las células Plat-E (variación de las HEK-293T que contienen cassettes env-IRES-puroR y gag-pol-IRES-bsR con un promotor EF1- α ¹⁹⁸) para producir retrovirus realizando la siguiente mezcla 300 μ l de OPTI-MEM (Invitrogen) y 37 μ l de Fugene 6 (Promega). Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 9 μ g de plámidos pMXS (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* y *DsRed*, este último como control de transfección). Se mezcló con los componentes anteriores e incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente se añadió la mezcla total a las células.

A continuación, se indica la cronología del protocolo tomando de referencia el cultivo de los MEFs (Figura MM 1):



Figura MM1. Cronología del cultivo de MEFs-*Nanog-GFP* para la generación de iPSCs.

Día -1: 24 horas después de la transfección se cambió el medio de las células productoras de virus y se produjeron virus durante toda la noche. Además, se sembraron 10^5 MEFs-*Nanog-GFP* en placa de 6 pocillos (Pase inferior a 3).

Día 0: el medio de las células productoras de retrovirus se recogió y filtró utilizando un filtro acetato-celulosa de 0.45 μ m. Se añadió polibreno a concentración final 4 μ g/ml. Se realizaron mezclas a partes iguales de virus para los 4 factores de Yamanaka y se añadieron a los MEFs-*Nanog-GFP*. Se incubaron durante 24 horas para la transducción y se cambió el medio.

Día 4: 10^4 MEFs-*Nanog-GFP* infectados se sembraron en placas con una capa de células de sustento o “feeder layer” de células MSTO SNL-*PuroR-HygroR* inactivadas con mitomicina-C ($2,6 \times 10^6$ células por placa).

Día 5: se añadió medio de cultivo de células madre embrionarias (medio ES) que consistía en DMEM suplementado con 15% FBS, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 10^{-4} M, 2-mercaptoetanol 10^{-4} M y 50 U, 50 mg/ml de una solución penicilina y estreptomicina¹⁹⁸. Además, se comenzó el tratamiento con hipoxia, cultivando los MEFs transducidos en un incubador con 3% O_2 y siguiendo las indicaciones descritas previamente para el cultivo de iPSCs en hipoxia²⁰¹.

Día 14: se finalizó el tratamiento con hipoxia y comenzó la selección con puromicina de los MEFs *Nanog-GFP⁺*.

Día 21: se realizó el conteo de colonias *Nanog-GFP⁺* con microscopio de fluorescencia.

4. Ensayos celulares

4.1. Protocolo 3T3 modificado para el cultivo de MEFs

Justo tras el explante de los embriones de ratón explicado anteriormente, los MEFs se incubaron en normoxia o hipoxia a 37°C hasta obtener el cultivo puro de fibroblastos. Este periodo de incubación duró 3 días en los cultivos de normoxia y 1 día en los cultivos de hipoxia. A partir de ese momento, se contaban las células cada 3 días y se ampliaban sembrando 1×10^6 células vivas por placa de 10 cm. En cada pase se recogían muestras de proteína y ARN. Durante la etapa senescente se cambiaba el medio a las células cada 3 días.

4.2. Actividad β -galactosidasa ácida

Las células senescentes y control se fijaron con glutaraldehído 0,5%, se lavaron 2 veces con $MgCl_2$ 1mM en PBS, se incubaron con una solución de tinción que contenía solución KC 20X (0,82 g de $K_3Fe(CN)_6$, 1,05 g de $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ en 25 ml de PBS) 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) y $MgCl_2$ 1mM en PBS a pH 5.5 durante 3h a 37°C y se lavaron con agua 2 veces. Las muestras ya fijadas y teñidas se guardaron a 4°C y en oscuridad hasta el análisis. El porcentaje de células con actividad β -galactosidasa ácida se cuantificó al microscopio.

4.3. Tratamientos de MEFs

Para los tratamientos se sembraron 10^6 MEFs en placas de 10 cm de diámetro y tras 24 horas se añadió alguno de los siguientes compuestos: dimetiloxalilglicina (DMOG) 6 mM (Frontier scientific), doxiciclina 100, 500 y 1.000 ng/ μ l (Merck). Pasado el tiempo indicado para cada experimento se fijaron células para la medición de actividad β -galactosidasa ácida o se extrajeron proteína y ARN.

5. Técnicas de análisis de expresión a nivel de ARN

5.1. Extracción de ARN total

El ARN total de líneas celulares se purificó con el kit de Promega ReliaPrep™ según las indicaciones del fabricante para 5×10^5 - 2×10^6 células. A las células en monocapa, lavadas con PBS, se les añadió 1 ml de PBS y utilizando un rascador se extrajo el lisado celular, se pasó a un tubo de 1,5 ml y se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 1000 rpm. A continuación, se descartó el sobrenadante y se homogeneizó el pellet con la solución BL+TG (que contiene 1-tioglicerol) para lisar las células. Acto seguido se añadió isopropanol y se mezcló la solución con un vórtex. Posteriormente se transfirió el lisado celular a una columna colocada en un tubo de 1,5 ml y se centrifugó durante 30 segundos a 14.000 rpm. Se descartó el líquido del tubo, se añadió la solución de lavado de ARN a la columna y se centrifugó de nuevo durante 30 segundos

a 14.000 rpm. A continuación, se vació el tubo colector y se realizó un tratamiento con ADNasa I durante 15 minutos a 25°C. Una vez finalizado el tratamiento, se añadió la solución de lavado de la columna, se centrifugó durante 15 segundos a 14.000 rpm y se eliminó el líquido del tubo colector. A continuación, se realizaron dos lavados de la columna con la solución de lavado de ARN mediante centrifugaciones de 30 segundos y 2 minutos a 14.000 rpm. Finalmente, se eliminó el tubo colector, se colocó la columna en un tubo de 1,5 ml limpio, se añadió agua libre de nucleasas a la columna y se centrifugó durante 1 minuto a 14.000 rpm para eluir el ARN. La concentración de ARN fue cuantificada en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific).

5.2. Transcripción reversa

La transcripción reversa se realizó con el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher Scientific). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se mezclaron, en hielo, 2 µl de tampón de retrotranscripción 10X, 0,8 µl de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) 25X, 2 µl de cebadores de secuencia aleatoria (random primers) 10X, 1 µl de transcriptasa reversa y 4,2 µl de agua libre de nucleasas. Esta mezcla de 10 µl de volumen total se adicionó a un tubo de PCR que contenía 10 µl con 3 µg de ARN total diluidos en agua libre de nucleasas para completar el volumen de la reacción. Se mezcló el volumen de reacción en un vórtex durante unos segundos y se centrifugó brevemente. A continuación, se introdujo el tubo de PCR en un termociclador para llevar a cabo la reacción de transcripción reversa. La reacción consta de los siguientes pasos: 10 minutos a 25°C, 37 minutos a 120°C y 5 minutos a 85°C. Una vez finalizada la reacción se guardó el ADN complementario (ADNc) a -20°C hasta su uso.

5.3. PCR cuantitativa a tiempo real

La detección de cambios en la expresión génica se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real con ADNc procedente de la transcripción reversa como material genético de partida (qPCR). Para llevar a cabo la PCR cuantitativa a tiempo real se añadieron las siguientes cantidades por pocillo en placas de 384 pocillos (Applied biosystem): 2 µl de ADNc (dilución 1/10 del producto de la reacción de transcriptasa reversa), 5 µl de mezcla para qPCR GoTaq® (Promega) 2X y 0,5 µl de ensayo TaqMan 20X (Applied biosystem), que contiene los cebadores y la sonda para el ARNm de interés. Las distintas sondas TaqMan utilizadas en esta tesis se describen en la **Tabla MM 3**. La qPCR se realizó en el termociclador ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). El programa de PCR consistió en 10 minutos a 95°C seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

El análisis de los cambios relativos en la expresión génica se realizó con el método comparativo de ciclo umbral ($\Delta\Delta Ct$) y con el programa RQ manager (Applied Biosystem). Para normalizar las muestras se usó *Actb* como control endógeno. Cada reacción se hizo por triplicado y se realizaron al menos 3 experimentos independientes para cada gen analizado. Se introdujo una muestra de control negativo (sin ADNc) en cada experimento.

Tabla MM 3. Sondas TaqMan

Gen	Sonda	Gen	Sonda
<i>Actb</i>	Mm02619580_g1	<i>Ldha</i>	Mm01612132_g1
<i>Bax</i>	Mm00432051_m1	<i>Myc</i>	Mm00487804_m1
<i>Bmi1</i>	Mm03053308_g1	<i>Nanog</i>	Mm02019550_s1
<i>p21^{CIP1}</i>	Mm04205640_g1	<i>Oct3/4</i>	Mm03053917_g1
<i>p16^{INK4a}/Arf</i>	Mm00494449_m1	<i>Rest</i>	Mm00803268_m1
<i>p15^{INK4b}</i>	Mm00483241_m1	<i>Sox2</i>	Mm03053810_s1
<i>Esrrb</i>	Mm00442411_m1	<i>Sox9</i>	Mm00448840_m1
<i>Gbx2</i>	Mm00494578_m1	<i>Stat3</i>	Mm0129775_m1
<i>Hes1</i>	Mm01342805_m1	<i>Tbx3</i>	Mm01195726_m1
<i>Hey</i>	Mm00468865_m1	<i>Tgfa</i>	Mm00446232_m1
<i>Klf2</i>	Mm00500486_g1	<i>Tfcp2l1</i>	Mm00470119_m1
<i>Klf4</i>	Mm00516104_m1	<i>Vegfa</i>	Mm00437306_m1

5.4. PCR “array”

Se analizó la diferencia en expresión para un conjunto de genes característicos de célula madre y de diferenciación en muestras de MEFs-WT tomadas en distintos puntos del experimento 3T3. Para ello, se utilizó la tarjeta de PCR “array” (matriz de genes prediseñada) de célula madre pluripotente de Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific 4385363) y se siguieron los siguientes pasos:

5.4.1. Cuantificación de ARNm y transcripción reversa

La cantidad y la calidad del ARNm se midió por fluorimetría utilizando Qubit RNA Assay Kit (ThermoFisher Scientific) en un fluorímetro Qubit (ThermoFisher Scientific). A continuación, se realizó el protocolo de transcripción reversa descrito anteriormente.

5.4.2. PCR cuantitativa a tiempo real

Las tarjetas de PCR *array* utilizadas consistían en placas de 384 pocillos para 4 muestras distintas. Para preparar las muestras para la PCR cuantitativa a tiempo real, se mezclaron en tubos de 1,5 ml 1 µg de ADNc sintetizado en el paso anterior con Taqman Fast Advanced Master Mix (ThermoFisher Scientific) hasta llegar a 100 µl. A continuación, se cargó la mezcla de una muestra por cada pocillo siguiendo el protocolo de carga indicado por el fabricante. Finalmente, se introdujo la placa en el termociclador ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) seleccionado el modo “Cuantificación Absoluta”. El programa de PCR consistió en 10 minutos a 95°C seguidos por 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

5.4.3. Análisis de los resultados

Se exportaron estos datos a la plataforma en línea de ThermoFisher Scientific donde se calculó el ciclo umbral de cada pocillo (Ct). Se comprobó que los controles positivos, negativos y endógenos del *array* eran correctos antes de realizar el análisis. Por un lado, se analizaron los genes expresados diferencialmente relativizando la expresión a la muestra de MEFs-WT

proliferativos en normoxia y los resultados se representaron a modo de diagrama de Venn utilizando la herramienta online del grupo de Bioinformática y Genómica evolutiva de la Universidad de Gante (Bélgica) (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Además, los datos no relativizados se analizaron calculando z-score sobre los valores de $2^{-\Delta C_t}$ para luego ordenar los genes de menor a mayor según la expresión de la muestra de MEFs-WT normoxia proliferativo. Finalmente, se representaron los datos como mapa de calor o “*heatmap*” utilizando el software Multi Experiment Viewer.

6. Técnicas de análisis de expresión a nivel de proteína

6.1. Extracción de proteína total

Las células se lavaron con PBS y se añadió sobre ellas un volumen apropiado de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, NP-40 1%, desoxicolato de sodio 1%, SDS 1%, Na_3VO_4 1mM, EDTA 0,5M pH 8,0, cóctel de inhibidores de fosfatasas (Merck) y cóctel de inhibidores de proteasas (CIP) (Merck). Se mantuvieron 10 minutos en hielo, en agitación, y se recogieron los lisados en tubos de 1,5 ml. A continuación, se sonicaron las muestras durante 3 ciclos de 10 segundos al 40% de potencia. Posteriormente, los restos de debris celular se eliminaron por centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante (extracto proteico) se guardó en alícuotas a -20°C.

6.2. Western blot

La inmunodetección de proteínas se realizó de acuerdo con un protocolo estándar. En primer lugar, se determinó la cantidad de proteína mediante el ensayo de Bradford (Biorad), se disolvieron 30 μg de muestra en tampón de carga (Tris-HCl 62.5 mM pH 6,8, glicerol 10%, SDS 1%, 2-mercaptoethanol 5%, azul de bromofenol 0.0025% (Merck) y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida 8-12% (concentración dependiente del tamaño de las proteínas a detectar) en presencia de SDS, utilizando el sistema Mini-Protean Tetra Cell (Biorad). El tampón de electroforesis utilizado contenía Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1, pH 8,3. A continuación, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Protran 0,2 μm), utilizando el equipo Mini Trans-Blot Cell (BioRad). La transferencia se realizó a 400 mA durante 2 horas en tampón de transferencia (TrisHCl 25 mM, glicina 192 mM, 20% metanol, pH 8,3). Las membranas se bloquearon durante 2 horas en agitación. El tampón de bloqueo contenía PBS, 0.1% Tween20 y 3% de BSA. Posteriormente, se incubaron toda la noche con la dilución adecuada de anticuerpo primario en tampón de bloqueo y agitación. Los anticuerpos utilizados en la tesis se detallan en la **Tabla MM 4**. Al día siguiente, se retiró el exceso de anticuerpo mediante 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tween20 0,1% en agitación. Finalmente, se incubaron las membranas durante una hora con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa diluido en PBS-Tween20 0,1% y se retiró el exceso de anticuerpo mediante 3 lavados con PBS-Tween 20 0,1% en agitación. La detección se realizó mediante una reacción quimioluminiscente (ECL, Amersham) y la visualización con el equipo Chemidoc Touch (Biorad).

Tabla MM 4. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Proveedor	Referencia	Dilución
p16 ^{INK4a} (policlonal de conejo)	Santa Cruz	sc-1207	1:500
p21 ^{CIP1} (monoclonal de conejo)	Abcam	ab109520	1:1000
p-H2AX (Ser139) (monoclonal de ratón)	Millipore	05-636	1:1000
p-p53(Ser15) (policlonal de conejo)	Abcam	ab1431	1:1000
Hif-1 α (monoclonal de ratón)	BD Transduction Laboratories	610958	1:1000
α -Tubulina (monoclonal de ratón)	Sigma Aldrich	T9026	1:5000
Sox2 (policlonal de conejo)	Abcam	ab97959	1:1000
Nanog (monoclonal de ratón)	Santa Cruz	sc-293121	1:500
cMyc-tag (monoclonal de ratón)	Origene	TA150014	1:1000
Oct3/4 (monoclonal de ratón)	Santa Cruz	sc-5279	1:500
Tfcp2l1 (policlonal de conejo)	Sigma Aldrich	AV31918	1:1000
Tfcp2l1 (policlonal de cabra)	Novus Biologicals	AF5726	1:1000
Conejo anti-ratón HRP (policlonal)	Abcam	ab97046	1:5000
Cabra anti-conejo HRP (policlonal)	Abcam	ab97051	1:5000
Conejo anti-cabra HRP (policlonal)	Abcam	ab97100	1:5000

6.3. Cuantificación de bandas de western blot

Para cuantificar las bandas de proteínas se usó el programa Image lab 5.1 de Biorad. Se seleccionó cada banda de forma individual, se restó el fondo inespecífico a cada banda cuantificada y siempre se refirió el valor a un control de carga de la misma membrana, α -tubulina.

7. Inmunoprecipitación de la cromatina

7.1. ChIP-Seq (“ChIPmentation”)

7.1.1. Fijación, inmunoprecipitación y preparación de las librerías de secuenciación

ChIPmentation es un protocolo que combina la inmunoprecipitación de la cromatina acoplada a secuenciación (ChIP-seq) y la preparación de la librería de secuenciación con la transposasa Tn5 (“TAGmentation”), usada originalmente en la técnica ATAC-seq gracias a su capacidad de fragmentar cromatina en conformación accesible y añadir pequeños fragmentos o adaptadores de ADN a dichos fragmentos^{245,246}.

Para llevarlo a cabo en MEFs, en primer lugar, se fijaron 24 millones de células con formaldehído al 1% en una solución 200 mM de tampón fosfato. La reacción de fijación se realizó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para detener esta reacción se añadió glicina 125 mM y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras esto, se lavaron las células con PBS frío y se retiraron de la placa de cultivo utilizando el PBS frío al que se añadieron CIP y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Merck) para finalmente centrifugarlas a 4°C.

Las células se homogenizaron en 500 μ l de tampón de lisis celular (Tris-HCl pH 7.5 10 mM, NaCl 10 mM, NP-40 0.3% y CIP) en rotación durante 30 minutos a 4°C. Tras esto, se

Materiales y métodos

centrifugó durante 5 minutos a 2500 g a 4°C. Los pellets recogidos se lavaron con 500 µl de tampón de lisis celular y se centrifugaron de nuevo durante 5 minutos a 2.500 g a 4°C. A continuación, se resuspendió el pellet en 667 µl de tampón de lisis nuclear (Tris-HCl pH 7.5 50 mM, EDTA 10 mM, SDS 1% y CIP) y se incubó en hielo durante 5 minutos. El lisado nuclear recogido se diluyó añadiendo 1.333 µl de tampón de dilución de ChIP (Tris-HCl pH 7.5 16,7 mM, EDTA 1,2 mM, NaCl 167 mM, SDS 0,01% y Triton-X100 1,1%). Después, la cromatina se sonicó en un sonicador Covaris M220 (10% del ciclo de trabajo, PIP 75 W, 100 “cycles/burst”, 10 minutos) y se centrifugaron durante 5 minutos a 18.000 g a 4°C. El sobrenadante recuperado contenía cromatina soluble y fue utilizada en el ChIP o congelada a -80°C tras la comprobación del tamaño de los fragmentos generados en la sonicación. Se retiraron 20 µl de la solución de cromatina sonicada que se utilizaron como control “*INPUT*” y se guardaron a 4°C. Se tomaron también 200 µl de muestra que se incubaron con 2 µg de anti-Tfcp2l1 (Novus Biologicals) en rotación a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se añadió a las muestras 20 µl de bolitas magnéticas “protein G Dynabeads” (Invitrogen), que fueron previamente lavadas dos veces con tampón de dilución de ChIP y resuspendidas en 50 µl del mismo tampón. La cromatina inmunoprecipitada se incubó entonces con bolitas magnéticas lavadas durante 1 hora en rotación a 4°C. Tras esto, se lavó dos veces con tampón de lavado 1 (Tris-HCl pH 7.5 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, SDS 1%, Triton-X100 1%), tampón de lavado 2 (Tris-HCl pH 7.5 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 500 mM, SDS 0.1%, Triton-X100 1%), tampón de lavado 3 (Tris-HCl pH 7.5 10 mM, EDTA 1 mM, LiCl 250 mM, NP-40 1%, Na-desoxicolato 1%) y Tris-HCl pH 8.0 10 mM, usando una gradilla magnética en frío (Invitrogen). Después, las bolitas magnéticas se resuspendieron en 25 µl de mezcla de reacción de “TAGmentation” (Tris-HCl pH 8.0 10mM, MgCl₂ 5mM, 10% w/v dimetilformamida), se le añadió 1 µl de enzima Tn5 y se incubó 1 minuto a 37°C. Se retiró el sobrenadante de la reacción de “TAGmentation” utilizando una gradilla magnética en frío. Las bolitas fueron lavadas de nuevo 2 veces con tampón de lavado 1 y TE 1x. Entonces, para resuspender la solución, se incubó 2 veces durante 15 minutos en 100 µl de tampón de elución (NaHCO₃ pH 8.8 50 mM, SDS 1%). Los 200 µl de cromatina resultante se incubaron a 65°C durante 6 horas con 10 µl de NaCl 4M y 1 µl de proteinasa K 10 mg/ml para deshacer los enlaces covalentes de la fijación. Finalmente, el ADN fue purificado utilizando el Kit “Minelute PCR Purification Kit” (Qiagen) y se eluyó en 20 µl.

Se generaron las librerías de secuenciación mediante amplificación por PCR, para lo que utilizó “NEBNext High-Fidelity 2X PCR Master Mix” (NEB) y los oligonucleótidos usados en Buenrostro et al. 2013²⁴⁶ con códigos de barras que permiten la combinación de varios experimentos en un mismo carril de secuenciación. La librería resultante fue agrupada y secuenciada en un secuenciador “Hi-Seq 4000 pair-end lane” lo que produjo alrededor de 20M de lecturas “pair-end” de 49 pares de bases.

7.1.2. Análisis de los resultados de secuenciación del ChIP-Seq

Las lecturas se alinearon o mapearon con el genoma de ratón de referencia “*Mouse Dec. 2011 (GRCm38/mm10)*” usando “*Bowtie*”²⁴⁷. La conversión de los archivos “*SAM*” de alineamiento a archivos “*BAM*” se llevó a cabo con el paquete “*Samtools*”²⁴⁸. La conversión de archivos “*BAM*” a “*BED*”, el análisis de picos y los solapamientos y mezclas se realizaron con el paquete *Bedtools*²⁴⁹. Para la conversión de archivos “*BED*” a “*BigWig*” se utilizó la herramienta “*genomecov*” de “*Bedtools*” y “*wigToBigWig*” de la UCSC. Los “*heatmaps*” y perfiles promedio se generaron utilizando las herramientas “*compute-Matrix*”, “*plotHeatmap*”, y “*plotProfile*” del paquete “*Deeptools 2.0 toolkit*”²⁵⁰. La identificación de picos o “*Peak calling*” se realizó con el algoritmo “*MACS2*”²⁵¹ con q-valor<0.01.

El análisis de enriquecimientos de motivos de factores de transcripción se llevó a cabo utilizando el “*script*” “*FindMotifsGenome.pl*” del software “*Homer*”²⁵². Para la asociación de genes a los picos, se usó la herramienta “*GREAT*”²⁵³ con la regla de asociación “basal más extensión” y parámetros estándar de distancia al sitio de inicio de la transcripción del gen (5 Kb aguas arriba, 1 Kb aguas abajo, 1Mb de extensión máxima).

Para el análisis funcional de los genes asociados a picos en el experimento de *ChIPmentation* utilizamos la herramienta “*Enrichr*”^{254,255}. Mediante esta herramienta, se calcularon los enriquecimientos de términos ontológicos “*Biological Process*” de “*Gene Ontology*” (GO)^{256,257}. Los 20 términos más representativos según su p-valor se clasificaron mediante la herramienta “*CateGOrizer*” en sus términos superiores o ancestrales. Posteriormente, se englobaron estos términos superiores en categorías que definían los procesos biológicos generales de los que formaban parte y se estudió el porcentaje de genes incluidos en ellos respecto al total estudiado. Finalmente, los resultados se representaron a modo de diagrama de Venn utilizando la herramienta online del grupo de Bioinformática y Genómica evolutiva de la Universidad de Gante (Bélgica) (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

7.2. ChIP-qPCR de validación

Los picos asociados a genes en las muestras del experimento de ChIP-Seq se validaron mediante ChIP-qPCR. El procedimiento fue el siguiente:

Se fijaron 24 millones de células añadiendo 900 µl de una solución tampón (Hepes pH 8, 50mM, NaCl 0,1mM, EDTA pH8, 1 mM, EGTA 0,5 mM y formaldehído 11%) a 10 ml de medio de cultivo. La reacción de fijación se realizó a 37°C durante 10 minutos. Para detener esta reacción se añadió de nuevo al medio de cultivo glicina 125 mM y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras esto, se lavaron las células con PBS frío y se retiraron de la placa de cultivo utilizando PBS frío al que se añadieron CIP y PMSF 100 mM para, finalmente, centrifugarlas en frío.

Las células recogidas anteriormente se resuspendieron en tampón de lisis celular (Pipes pH8 5mM, KCl 85 mM, NP-40 0,5%) al que se añadieron CIP y PMSF y se incubaron en hielo

Materiales y métodos

durante 10 minutos. Posteriormente, las células se centrifugaron para después resuspenderlas en tampón de lisis nuclear (SDS 1%, EDTA 10 mM, Tris-HCl pH 8,1 50 mM) al que se añadieron CIP y PMSF. En este mismo tampón se sonicaron las células ya lisadas utilizando un Bioruptor (Diagenode) con ciclos de 30 segundos de sonicación y 30 segundos de pausa durante 15 minutos en frío. El extracto de cromatina sonicada se retiró del resto de componentes celulares mediante centrifugación. Para comprobar el tamaño de los fragmentos de ADN generados se purificó este material mediante protocolo estándar de precipitación con etanol y sales.

Se inmunoprecipitaron 200 μ l del extracto de cromatina en 800 μ l de tampón (SDS 0,01%, Tritón X-100 1,1%, EDTA 1,2 mM, Tris-HCl pH 8,1 16,7 mM, NaCl 167 mM) con CIP, PMSF y los anticuerpos contra las proteínas de interés. Se utilizaron los anticuerpos anti-Tfcp2l1 (Novus Biologicals) y anti-RNA polimerasa II (POLR2A, ThermoFisher Scientific) como control positivo. Las mezclas se incubaron 16 horas a 4°C.

Después de la incubación, se añadieron bolitas magnéticas "*ChIP-Grade Protein G Magnetic Beads*" (Cell Signaling) a la mezcla de cromatina y anticuerpo y se incubaron durante 2 horas a 4°C. Tras esto, se realizó un lavado con un tampón de lavado con baja concentración en sales (SDS 0,1%, Tritón x-100 1%, EDTA 2mM, Tris-HCl pH8,1 20 mM, NaCl 150 mM), con un tampón de lavado de alta concentración en sales (SDS 0,1%, Tritón x-100 1%, EDTA 2mM, Tris-HCl pH8,1 20 mM, NaCl 500 mM) y un tampón de lavado con LiCl (LiCl 0,25 M, NP-40 1%, NaDoc 1%, EDTA 1%, Tris-HCl pH8,1 10 mM) utilizando una gradilla magnética (ThermoFisher Scientific). Después, se procedió a retirar las bolitas magnéticas tras lavar con tampón TE y TE-SDS 1% y hacer incubaciones de la mezcla a 65°C.

En último lugar, se purificó el ADN de la cromatina inmunoprecipitada mediante un protocolo estándar de precipitación con etanol y sales. Este ADN se sometió a qPCR utilizando cebadores diseñados en el laboratorio para las regiones donde se localizaban los picos del experimento de ChIP-Seq. Para el diseño de los cebadores, se localizaron los picos diana con el *UCSC Genome Browser* y se usó su secuencia de ADN. También se utilizaron cebadores contra una región no codificante del genoma ("*Gene desert*", control negativo en todas las muestras) y contra el primer exón de α -tubulina (control positivo en muestra inmunoprecipitada con POLR2A) (**Tabla MM 5**). La qPCR se realizó en el termociclador ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). El programa de PCR consistió en un paso inicial de 30 segundos a 95°C seguidos por 40 ciclos de 5 segundos a 95°C y 35 segundos a 55°C. Finalmente, una última fase de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 55°C y un último paso de 15 segundos a 95°C. El análisis de amplificación se realizó con el software "*SDS 2.4*" (Applied Biosystems) para obtener la cuantificación absoluta. Los datos de Ct se analizaron mediante el método cuantificación relativa cuyo resultado (expresado en porcentaje de ADN de la muestra respecto al control negativo *INPUT*) se representó relativizando la muestra inmunoprecipitada con anti-Tfcp2l1 a la inmunoprecipitada con IgG (inmunoglobulina G).

Tabla MM 5. Cebadores utilizados en ChIP-qPCR.

Gen o región diana	Localización en el genoma	Secuencia del cebador (5'-3')
<i>Sox2</i>	chr3:34172891-34173202	Fw: ACCAGGGCTGTGTTAAATGC Rv: GAGTGAGCAGGGGAAGGAAC
<i>Sox9</i> pico 1	chr11:112778911-112779210	Fw: TTTTGGAGCAGGGAGGGTTG Rv: gtgtgtgtgtGTAGAGGG
<i>Sox9</i> pico 2	chr11:113040573-113040872	Fw: GGCAACAAACCTGATACGCA Rv: CGAGTTCTAGGGTGGTCTGG
<i>Tgfa</i>	chr6:86285454-86285782	Fw: CATCCACTGGTGCTGCTAAG Rv: GGTCTCAGTGTAGTCCAGG
<i>Gene Desert</i>		Fw: CACTTCTTATAGGACCCTTTG Rv: CTGTCTACCTGTTCTTTACATTCT
α - <i>Tubulina</i>		Fw: GCACCAATCACCACTCTCCT Rv: AGGCGGTCGATGTAAGAGAA

Localización en el genoma: se muestra el rango de localización del pico diana para el genoma de referencia “*Mouse Dec. 2011 (GRCm38/mm10)*”

8. Análisis bioinformáticos de datos públicos

8.1. Análisis de regiones reguladoras asociadas a *Tfcp2l1*

En primer lugar, se visualizó la estructura 3D de la cromatina en el locus de *Tfcp2l1* utilizando datos de HiC (captura de conformación de cromatina a nivel del genoma completo) en el navegador “WashU Epigenome Browser” procedentes del repositorio público ENCODE (GSE74055)²⁵⁸.

A continuación, se analizaron las posibles regiones reguladoras (promotores y *enhancers* activos) en dicho locus usando datos de ChIP-seq de las modificaciones de histonas H3K4me3 y H3K27ac (GSE49847)^{259,260} que se visualizaron en el UCSC Genome Browser. Se seleccionaron los picos de estas marcas de histonas que, en base a los datos de HiC, podrían contactar con el promotor de *Tfcp2l1* para regular su expresión. Finalmente, estas secuencias se introdujeron en la herramienta “*Jaspar*”²⁶¹ donde se realizó la búsqueda de los motivos de unión al ADN de Hif1 α , Arnt (también conocido como Hif1 β) y el dímero formado por Arnt-Hif1 α , obteniéndose sus valores de predicción y considerándose sólo los más significativos (superiores a 8).

8.2. Meta-análisis de expresión de iPSCs

Se estudiaron experimentos de “*Microarray*” o micro-matrices de expresión génica realizados previamente por el grupo de investigación del Dr. Shinya Yamanaka con “*SurePrint G3 Mouse Gene Expression 8x60 Kit*” (Agilent Technology) en un escáner “*Microarray Scanner*

Materiales y métodos

System” (Agilent Technology). Finalmente, los datos se analizaron utilizando “*GeneSpring*” (Agilent Technology).

RESULTADOS

1. Efecto de la hipoxia sobre la senescencia celular

1.1. Efecto de la hipoxia sobre el crecimiento y la aparición de características de senescencia celular

Para comenzar el estudio del efecto de la hipoxia sobre la senescencia celular comparamos la proliferación y entrada en senescencia de MEFs en dos condiciones diferentes de oxígeno, normoxia (20% O₂) e hipoxia (3% O₂). Para ello, en primer lugar, explantamos embriones de ratón en día de gestación 13,5 y los cultivamos hasta alcanzar el cultivo puro de MEFs en normoxia (normoxia inicial). Este proceso se realizó durante 3 días. A continuación, seguimos el crecimiento y la aparición de características de la senescencia celular realizando un protocolo 3T3 (**Figuras R1 A y B**). Observamos que los MEFs cultivados exclusivamente en normoxia crecían hasta los 30 días, deteniendo en este momento su crecimiento; momento en el que se observaba en ellos un fenotipo morfológico senescente y alta actividad β -galactosidasa ácida (**Figuras R1 A, C y D**). Además de esto, se observó que sólo el 50% de los embriones explantados en normoxia que luego seguían el protocolo 3T3 en hipoxia, mantenían su proliferación más allá de los 60 días. Sin embargo, el otro 50% de esos MEFs tenía una esperanza de vida similar a aquellos cultivados exclusivamente en normoxia, entrando en senescencia de la misma manera (**Figura R1 A**).

A continuación, modificamos ligeramente el protocolo realizando la extracción y explante de embriones y la generación del cultivo de MEFs también en hipoxia (hipoxia inicial). En este caso, se podía obtener el cultivo puro en 1 solo día. Posteriormente, realizamos el protocolo 3T3 en hipoxia o normoxia. Un 75% de los los embriones de hipoxia inicial que seguían el protocolo 3T3 en normoxia, tenían extensión de vida proliferativa más allá de los 60 días. En cambio, el otro 25% sólo mantenían su crecimiento hasta 45 días (**Figura R1 B**), entrando en senescencia. En cambio, todos los MEFs cultivados sólo en hipoxia crecían más allá de los 60 días sin observar el fenotipo senescente (**Figuras R1 B, C y D**).

Para comprobar la duración de la extensión de la vida proliferativa, varios de los cultivos se mantuvieron durante 6 meses, no observando en ese tiempo parada proliferativa ni entrada en senescencia.

Debido a la variabilidad, decidimos trabajar con MEFs cultivados exclusivamente en hipoxia y MEFs cultivados exclusivamente en normoxia para comparar su crecimiento y características asociadas a senescencia.

Para estudiar el efecto fisiológico de la hipoxia en la senescencia celular, se analizaron muestras de ARN y proteína de los MEFs a los 24, 36, 48 y 60 días de cultivo. Como control del efecto de la hipoxia, se verificó la activación de Hif1 α indirectamente, midiendo los niveles de ARNm de dos de sus dianas transcripcionales, *Ldha* y *Vegfa*¹⁶⁷. Ambos genes resultaron sobreexpresados en hipoxia respecto a normoxia en todos los puntos del experimento (**Figura R2 A**).

Resultados

A continuación, estudiamos la expresión de efectores de la parada proliferativa en senescencia. Los niveles transcripcionales de los CKIs $p21^{Cip1}$, $p16^{INK4a}$ y $p15^{Ink4b}$ disminuían con el tiempo de cultivo en hipoxia y eran siempre significativamente menores a los del control proliferativo en normoxia (día 24) (**Figura R2 A**). También observamos una reducción de los niveles de proteína con el tiempo en hipoxia en $p21^{Cip1}$ y $p16^{INK4a}$ (**Figura R2 B**).

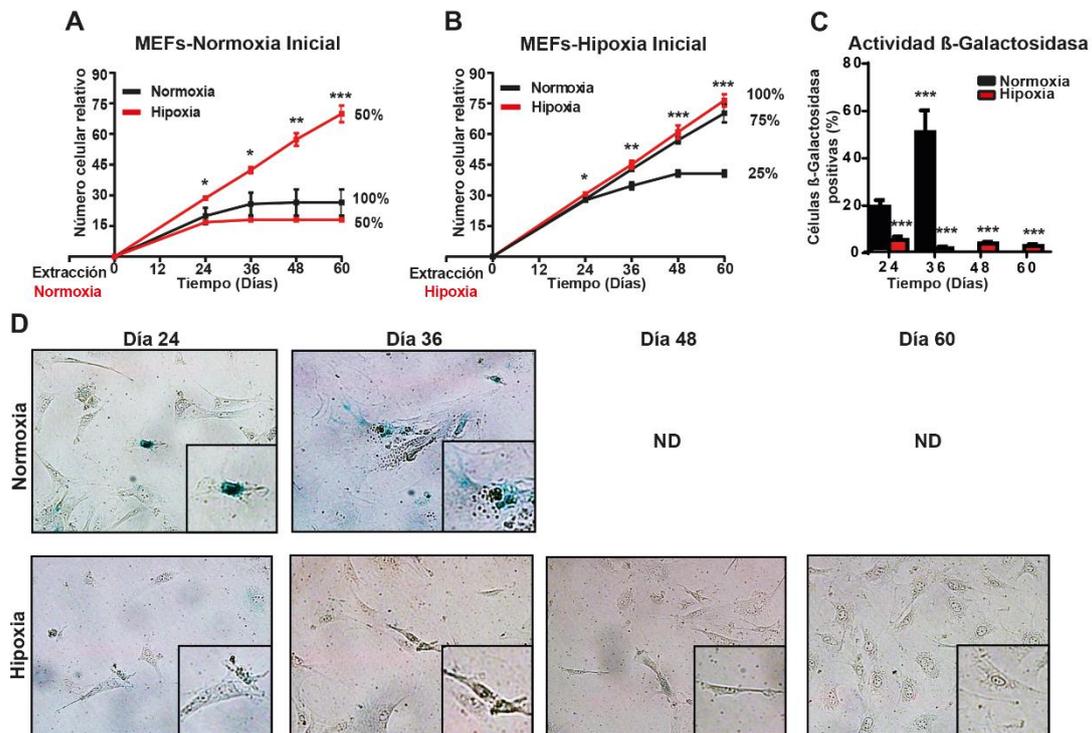


Figura R1. La hipoxia puede retrasar la aparición de senescencia celular *in vitro*. **A) Crecimiento de MEFs cultivados en normoxia inicial.** MEFs se extrajeron y cultivaron inmediatamente en normoxia para su amplificación, se observó su crecimiento posteriormente en normoxia e hipoxia. **B) Crecimiento de MEFs cultivados en hipoxia inicial.** MEFs se extrajeron y cultivaron inmediatamente en hipoxia para su amplificación, se observó su crecimiento posteriormente en normoxia e hipoxia. **C) Porcentaje de células positivas para actividad β-galactosidasa ácida.** Se cuantificó la actividad β-galactosidasa ácida en células cultivadas exclusivamente en hipoxia o en normoxia realizando tinción con reactivo X-Gal. **D) Morfología celular senescente y tinción X-Gal.** Se observó la morfología citoplásmica en las células empleadas para cuantificar la actividad β-galactosidasa ácida. Para el análisis estadístico se utilizó el test t-Student en el caso del estudio de crecimiento. Para el estudio de la actividad β-galactosidasa ácida se empleó el test Anova (One way) para comparar cada condición al control proliferativo de normoxia (24 días). Las gráficas muestran la media de, al menos, 3 repeticiones independientes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). ND: no determinado.

Para comparar la actividad de p53 en hipoxia y normoxia, medimos los niveles de proteína p-p53 (Ser15) que es la forma activa de p53 cuando se produce estrés celular^{262,263}. Pudimos observar una mayor cantidad de esta proteína fosforilada en normoxia en comparación con hipoxia. Sin embargo, los niveles de p-p53 (Ser15) aumentaban con el tiempo en hipoxia. Esto coincidía con los niveles de la histona modificada p-H2AX (Ser139) que eran mayores en hipoxia que en normoxia y que sugieren un posible estrés replicativo²⁶⁴ (**Figura R2 B**). También se midieron los niveles de la diana transcripcional de p53, Bax^{20} . La expresión de este gen también disminuía con el tiempo en hipoxia, aunque al inicio del experimento los niveles eran mayores que en normoxia. Esto, junto a la disminución de expresión de $p21^{Cip1}$, mencionada anteriormente, sugieren una menor activación transcripcional de p53 en hipoxia a pesar de una mayor fosforilación en el residuo S15 (**Figura R2 A**).

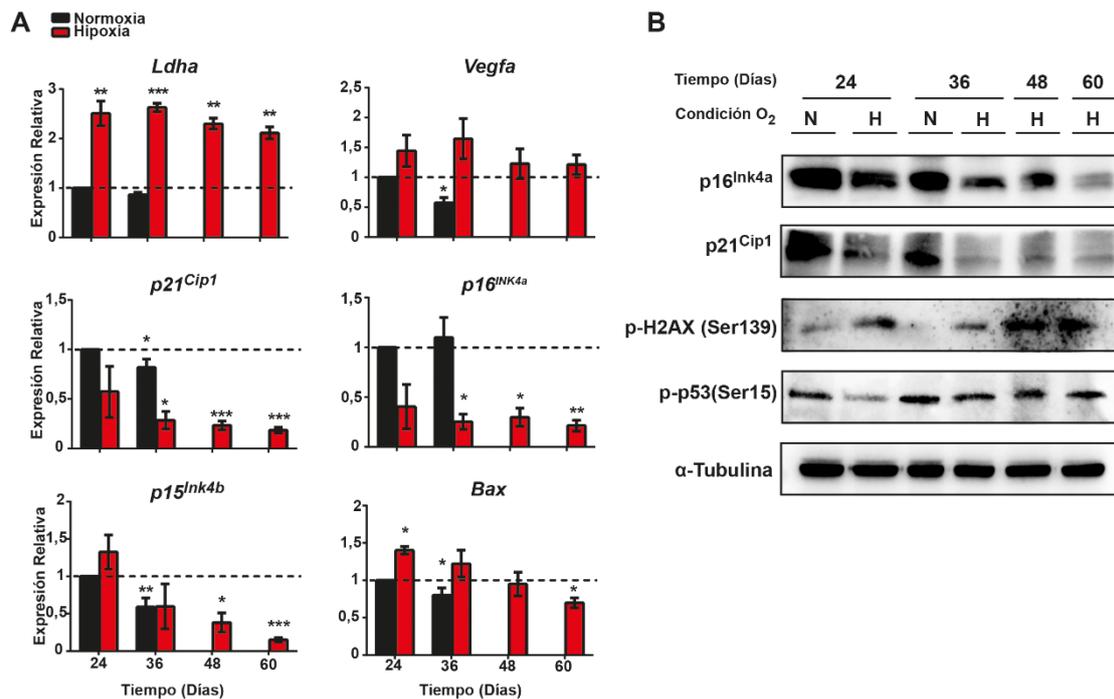


Figura R2. La hipoxia puede retrasar la expresión de marcadores de senescencia celular. A) Análisis transcripcional de genes relacionados con la hipoxia o la senescencia celular. Se analizaron mediante qRT-PCR los niveles de ARNm de *Ldha*, *Vegfa*, *p21^{Cip1}*, *p16^{INK4a}*, *p15^{INK4b}* y *Bax* de MEFs cultivados exclusivamente en normoxia o en hipoxia. Los niveles de expresión se normalizaron usando como referencia la muestra de control proliferativo de normoxia (día 24). **B) Análisis de los niveles de proteínas relacionadas con la senescencia celular.** Se compararon mediante western blot los niveles de proteína de p16^{INK4a}, p21^{Cip1}, p-y-H2AX, p-p53 (Ser15) usando α -tubulina como control de carga. Para el análisis estadístico en los niveles de ARNm se utilizó el test t-Student. Las gráficas muestran la media de, al menos, 3 repeticiones independientes medidas en triplicado (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

1.2. Efecto de la hipoxia sobre la expresión de genes relacionados con las propiedades de células madre

El cultivo de hipoxia produce extensión de la vida proliferativa de fibroblastos diferenciados, asemejando el potencial replicativo ilimitado de las células madre. Por tanto, medimos si los cultivos en hipoxia podrían aumentar las características de células madre de estas células proporcionándoles así este potencial replicativo ilimitado.

Para ello, realizamos PCR *array* con una matriz de genes prediseñada. Este PCR *array* incluía sondas específicas para genes marcadores de células diferenciadas, células indiferenciadas, células madre y genes relacionados con las propiedades de células madre. Para el análisis resumimos estos grupos de genes en 2 categorías: diferenciación y desdiferenciación/células madre. Este último incluía marcadores de células indiferenciadas, y genes relacionados con las propiedades de células madre.

Estudiamos con este *array* muestras de células cultivadas exclusivamente en normoxia o en hipoxia que fueron recogidas en 2 puntos distintos de nuestro cultivo 3T3. El primer punto fue tomado al inicio del experimento cuando las células en normoxia aún tenían capacidad proliferativa normal. Llamamos a estas muestras Norm-Pro e Hip-Pro. El segundo punto experimental fue tomado cuando las células de normoxia alcanzaron la senescencia replicativa. En este punto las células cultivadas en hipoxia mantenían la capacidad proliferativa. Llamamos

Resultados

a estas muestras Norm-Sen e Hip-Inm, respectivamente. En el análisis, utilizamos como control de referencia para la expresión la muestra Norm-Pro y encontramos distintos perfiles de expresión (**Figura R3 A**).

Hallamos sobreexpresión de 6 genes en Norm-Pro respecto a las demás muestras. 4 de estos genes se incluían en la categoría de diferenciación (*Cdh5*, *Gata4*, *Eomes* e *Isl1*) y 2 de ellos en la categoría de desdiferenciación/células madre (*Sfrp2* y *Eras*). En la muestra Norm-Sen, encontramos otros 6 genes sobreexpresados respecto al resto de las otras muestras. 5 de estos genes entraban en la categoría de diferenciación (*Ins2*, *Nppa*, *Fn1*, *Myf5* y *Ddx4*) y sólo uno en el conjunto de desdiferenciación/células madre (*Ga1*). Los resultados indicaban una sobreexpresión común de 5 genes en las 2 muestras de normoxia respecto a las de hipoxia (*Bxdc2*, *Foxa2*, *Commd3*, *Cd9*, *Fgf5*) de los cuales sólo uno se consideraba del grupo de desdiferenciación/células madre (*Foxa2*).

En Hip-Pro se halló sobreexpresión de 14 genes respecto a las demás muestras. 6 pertenecían a la categoría de desdiferenciación/células madre (*Sox2*, *Zfp42*, *Podxl*, *Gdf3*, *Lin28*, *Kit*) y 8 a diferenciación (*Krt1*, *Syp*, *Lama1*, *Gfap*, *Col2a1*, *Gcm1*, *Pecam1*, *Runx2*). Por su lado, la muestra Hip-Inm sólo presentó un aumento de expresión en 2 genes respecto a las demás, ambos de desdiferenciación/células madre (*Tfcp2l1* y *Rest*). Ambas muestras de hipoxia tenían en común la sobreexpresión de 2 genes, 1 de ellos considerado de diferenciación (*Iapp*) y el otro de desdiferenciación/células madre (*Gbx2*).

Por último, las 3 muestras con capacidad proliferativa (Norm-Pro, Hip-Pro e Hip-Inm) no presentaban sobreexpresión común de ningún gen, mientras que las muestras tomadas al inicio del experimento (Norm-Pro e Hip-Pro) sobreexpresaban 4 genes respecto a las demás, todos del grupo de diferenciación (*Des*, *Flt1*, *Sycp3*, *Col1a1*).

En conjunto, en normoxia observamos una mayor sobreexpresión de genes de la categoría de diferenciación. En cambio, en las muestras de hipoxia se observó una mayor sobreexpresión de genes de la categoría de desdiferenciación/células madre (**Figura R3 B**). Tras este análisis, decidimos validar la expresión de los genes con altos niveles en Hip-Inm respecto al resto de muestras. Esto podría proporcionarnos posibles candidatos reguladores del mantenimiento de la capacidad proliferativa y del escape de la senescencia en hipoxia. Pudimos demostrar que *Tfcp2l1* presentaba mayores niveles de ARNm y de proteína en hipoxia respecto a normoxia a lo largo de todo nuestro experimento 3T3. Sin embargo, encontramos una gran variabilidad para la expresión de *Rest* entre los diferentes cultivos (**Figura R3 C**). Debido a su homogeneidad en la expresión durante el cultivo en hipoxia y a su función conocida en desarrollo, nos centramos en el estudio de *Tfcp2l1*.

Resultados

los niveles sobreexpresados en hipoxia disminuyen con el tiempo. En cuanto a *cMyc*, se observa una disminución de la expresión en normoxia, sin embargo, su expresión se mantiene en el tiempo en todos los puntos (**Figura R4 A**). A nivel de proteína, observamos un patrón de expresión similar al hallado en ARNm. Se muestran los resultados de Western Blot para Sox2, Oct3/4 y Nanog (**Figura R4 B**).

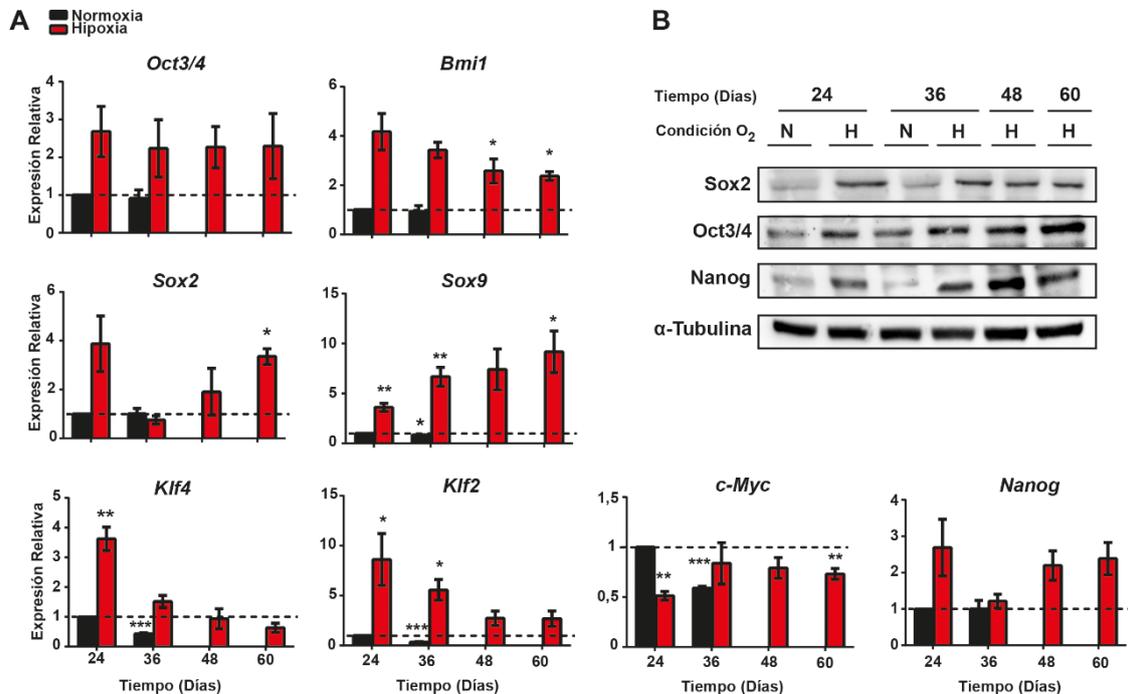


Figura R4. La hipoxia puede alterar la expresión de genes relacionados con las propiedades de célula madre. A) Análisis transcripcional de genes relacionados con las propiedades de célula madre. Se analizaron mediante qRT-PCR los niveles de ARNm de *Oct3/4*, *Bmi1*, *Sox2*, *Sox9*, *Klf4*, *Klf2*, *c-Myc* y *Nanog* de MEFs cultivados exclusivamente en normoxia o en hipoxia. Los niveles de expresión se normalizaron usando como referencia la muestra de control proliferativo de normoxia (día 24). **B) Análisis de los niveles de proteínas relacionadas con las propiedades de célula madre.** Se compararon mediante Western Blot los niveles de proteína de Sox2, Oct3/4 y Nanog usando α -tubulina como control de carga. Para el análisis estadístico en los niveles de ARNm se utilizó el test t-Student. Las gráficas muestran la media de, al menos, 3 repeticiones independientes medidas por triplicado (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

2. Estudio del papel de *Tfcp2l1* en el efecto causado por la hipoxia en senescencia

Para estudiar la causalidad y relevancia de *Tfcp2l1* en el efecto de la hipoxia en senescencia decidimos modificar sus niveles de expresión en MEFs cultivados exclusivamente en hipoxia o exclusivamente en normoxia.

2.1. Efecto de la disminución de la expresión de *Tfcp2l1*

En primer lugar, indujimos la expresión de dos moléculas distintas de shARN contra el ARNm de *Tfcp2l1* (Sh#1 y Sh#2). Comparamos el crecimiento celular relativo de MEFs que expresaban estas moléculas con el de MEFs que expresaban una molécula control o “scramble” (Sc). Pudimos observar que, tanto en normoxia como en hipoxia, el crecimiento de los MEFs-Sh#1 y MEFs-Sh#2 se reducía significativamente respecto a los MEFs-Sc (**Figuras R5 A y B**). El crecimiento de los MEFs-Sc se correspondía al de MEFs-WT en cada condición de oxígeno. Además, pudimos observar que el crecimiento de los MEFs-Sh#1 y MEFs-Sh#2 en hipoxia se

reducía hasta alcanzar niveles similares al crecimiento de los MEFs Sc de normoxia. (**Figuras R5 A y B**). En ambos casos, MEFs-Sh#1 y MEFs-Sh#2, el comportamiento era idéntico. La reducción proliferativa en los MEFs-Sh#1 y MEFs-Sh#2 fue acompañada del incremento de actividad β -galactosidasa ácida y de la adquisición una morfología típica senescente tanto en hipoxia como en normoxia (**Figuras R5 C y D**). Estos resultados sugieren que *Tfcp2l1* podría ser esencial en el mantenimiento de la capacidad proliferativa en células normales y que la disminución de su expresión activa la senescencia.

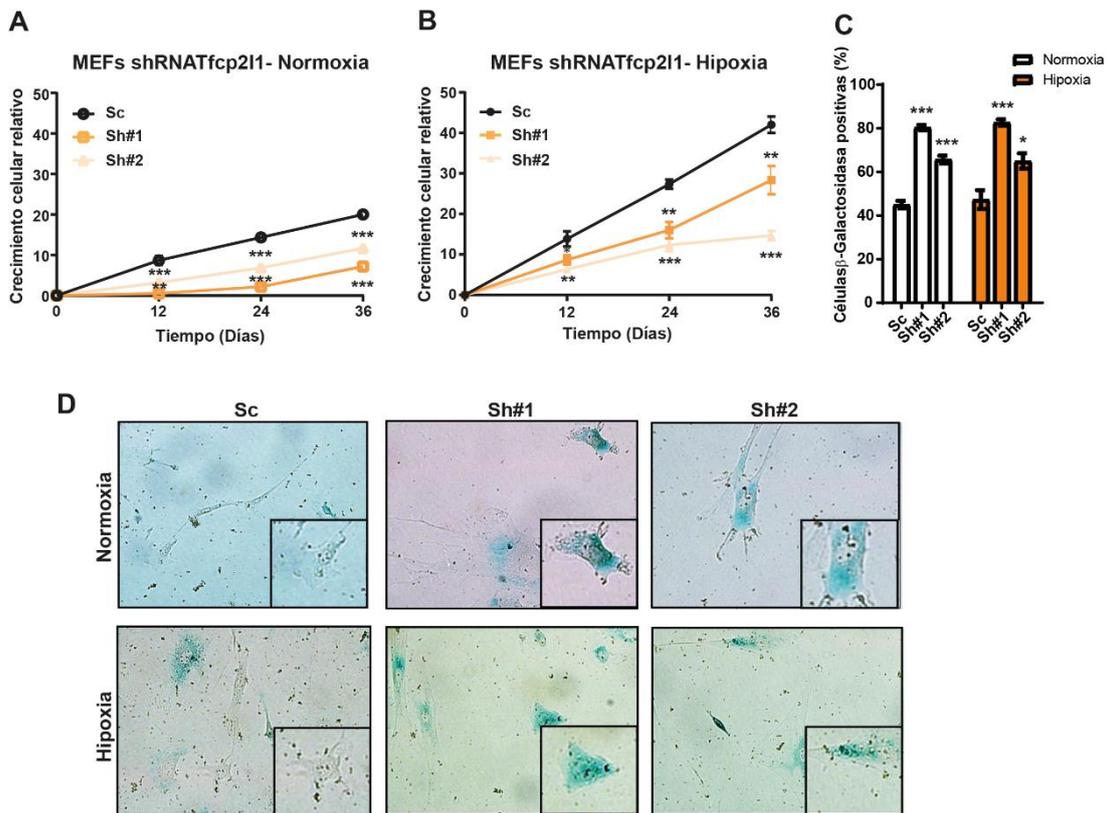


Figura R5. La reducción de expresión *Tfcp2l1* provoca senescencia prematura. A y B) Crecimiento celular relativo de MEFs-Sc, MEFs-Sh#1 y MEFs-Sh#2 en normoxia e hipoxia. MEFs fueron cultivados en hipoxia o normoxia e infectados con lentivirus para obtener la expresión de las moléculas de shARN, tras la selección de las células se sometieron a protocolo 3T3. **C) Actividad β -galactosidasa ácida en normoxia e hipoxia.** MEFs infectados y seleccionados fueron fijados a los 3 días de comenzar el protocolo 3T3 para su posterior tinción con reactivo X-Gal. **D) Morfología celular senescente y tinción X-Gal.** Se observó la morfología citoplasmática en las células empleadas para cuantificar la actividad β -galactosidasa ácida. Para el análisis estadístico se utilizó el test t-Student en el caso del estudio de crecimiento. En el estudio de la actividad β -galactosidasa ácida se utilizó el test Anova (One way) para comparar cada muestra de Sh al Sc de la misma condición de oxígeno. Las gráficas muestran la media de, al menos, 3 repeticiones independientes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

A continuación, estudiamos no solo el efecto celular sino también el efecto de los shARN sobre la transcripción de genes alterados en hipoxia. A nivel de ARNm, la expresión de *Tfcp2l1* resultó ser significativamente menor en ambos shARN respecto a su control en cada condición de oxígeno, (**Figura R6 A**). También observamos que la reducción de los niveles de *Tfcp2l1* era mayor con la expresión de Sh#1, lo que coincidía con una actividad β -galactosidasa ácida algo mayor (**Figura R5 C**).

Resultados

Como control, hallamos sobreexpresión de las dianas transcripcionales de Hif1 α , *Vegfa* y *Ldha*, en los MEFs-Sc de hipoxia respecto a los de normoxia. Además, observamos sobreexpresión de *Ldha* en los MEFs-Sh #1 y #2 tanto en hipoxia como en normoxia. En cuanto a los principales efectores de la parada proliferativa de senescencia, observamos que la expresión de p16^{INK4a} aumentaba con la expresión de los shARN en hipoxia y normoxia, mientras que sólo observamos esta tendencia para p21^{Cip1} en MEFs-Sh#2. Por último, estudiamos la expresión de genes relacionados con las propiedades de célula madre y no encontramos diferencias notables ni en hipoxia ni en normoxia (**Figura 6B**). Así, la reducción en la expresión de *Tfcp2l1* podría tener un efecto directo en los efectores de la senescencia mientras que no hallamos evidencias de disminución en los genes relacionados con las propiedades de célula madre.

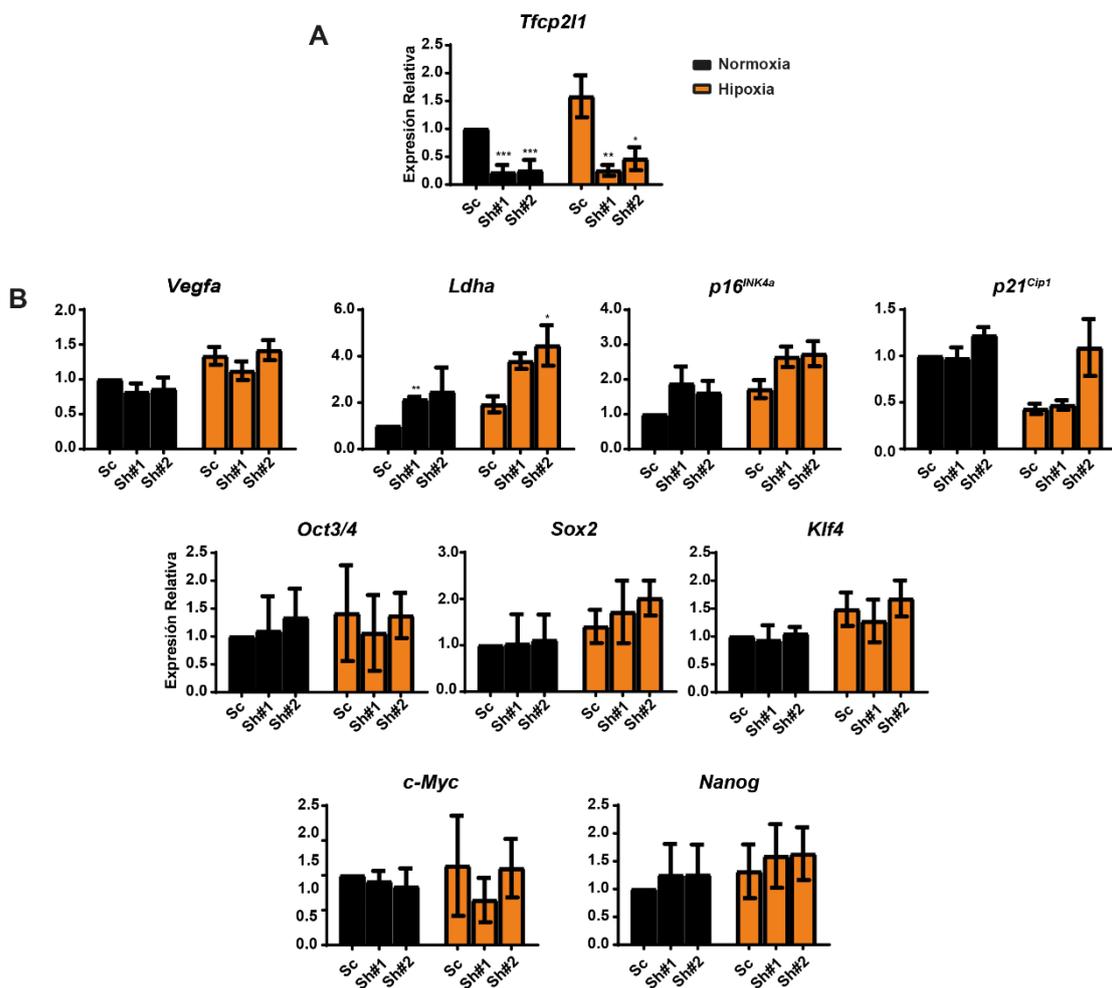


Figura R6. La reducción de expresión de *Tfcp2l1* mediante shARN afecta a los niveles de ARNm de genes alterados por la hipoxia. A) Niveles de ARNm de *Tfcp2l1*. Se analizó la expresión de *Tfcp2l1* en muestras de ARN y proteína de MEFs infectados y seleccionados tras los primeros 3 días de protocolo 3T3. **B) Niveles de ARNm de genes de expresión alterada por la hipoxia en MEFs.** Se analizó la expresión de los genes *Ldha*, *Vegfa*, *p16^{INK4a}*, *p21^{Cip1}*, *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* y *Nanog* en muestras a los 3 primeros días de protocolo 3T3 en hipoxia y normoxia. Los niveles de ARNm se relativizaron a la expresión de MEFs-Sc de normoxia. Para el análisis estadístico en los niveles de ARNm se utilizó el test t-Student. Las gráficas muestran la media de, al menos, 3 repeticiones independientes medidas en triplicado (*p<0,05; **p<0,01; ***<0,001).

2.2. Efecto del aumento de la expresión de *Tfcp2l1*

Para comprobar si la expresión ectópica de *Tfcp2l1* podría imitar el efecto de la hipoxia en senescencia decidimos sobreexpresar su ADNc en MEFs (MEFs-*Tfcp2l1*) cultivados tanto en normoxia como hipoxia para su control. En primer lugar, observamos que el crecimiento de MEFs infectados con un vector control (MEFs-Vector) fue mayor en hipoxia que en normoxia. Sin embargo, los MEFs-*Tfcp2l1* detuvieron su crecimiento tras la selección de las células transducidas con el plásmido de expresión en ambas condiciones de oxígeno (**Figura R7 A**). Estas células adquirieron entonces una acusada morfología característica de senescencia y alta actividad β -galactosidasa ácida (**Figura R7 B y C**).

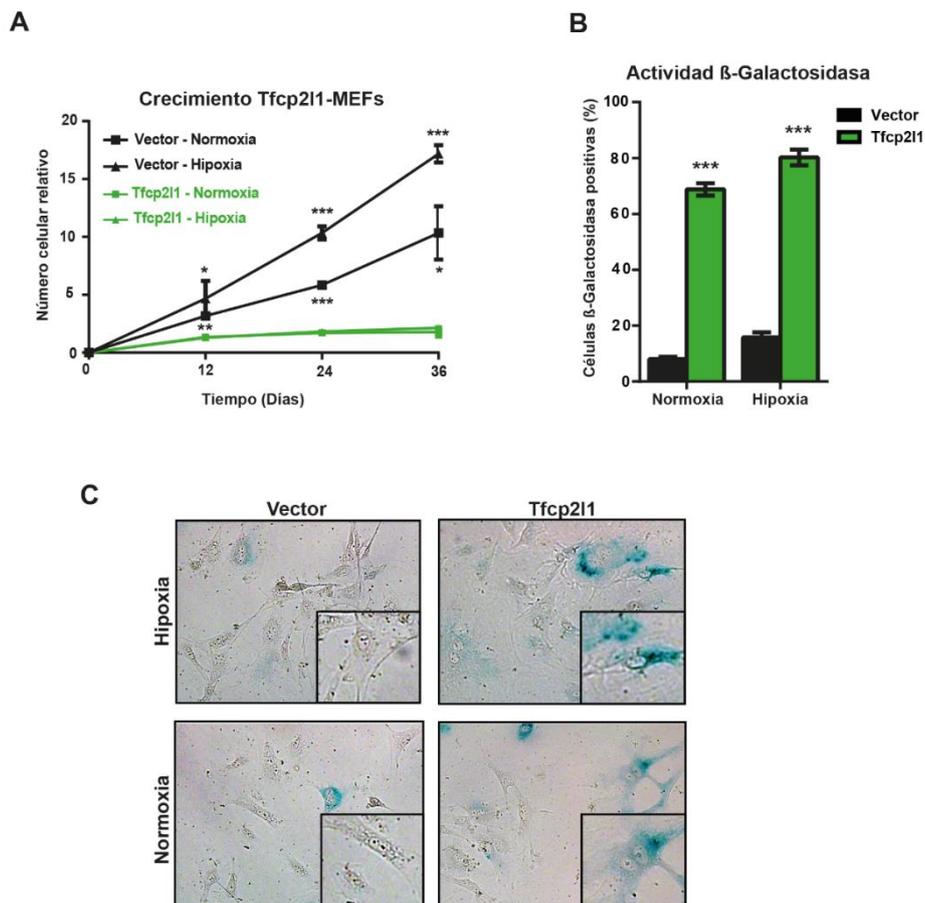


Figura R7. La sobreexpresión de *Tfcp2l1* provoca senescencia prematura. A) Crecimiento celular relativo de MEFs-Vector y MEFs-*Tfcp2l1* en normoxia e hipoxia. MEFs fueron cultivados en hipoxia o normoxia e infectados con lentivirus para la transducción de un vector control o la expresión de ADNc de *Tfcp2l1*, tras la selección de las células que incorporaron los vectores, se sometieron a protocolo 3T3. **B) Actividad β -galactosidasa ácida en normoxia e hipoxia.** MEFs infectados y seleccionados fueron fijados a los 3 días de comenzar el protocolo 3T3 para su posterior tinción con reactivo X-Gal. **D) Morfología celular senescente y tinción X-Gal.** Se observó la morfología citoplasmática en las células empleadas para cuantificar la actividad β -galactosidasa ácida. Para el análisis estadístico se utilizó el test t-Student en el caso del estudio de crecimiento y el test Anova (One way) para el estudio de la actividad β -galactosidasa ácida. Las gráficas muestran la media de, al menos, 3 repeticiones independientes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Resultados

Posteriormente, comprobamos el aumento de los niveles de proteína Tfc211 en MEFs-*Tfc211* respecto a MEFs-Vector. Esto iba acompañado de altos niveles de los CKIs, p16^{Ink4a} y p21^{Cip1} en las células que detuvieron su crecimiento (**Figura R8 A**). Además, estudiamos los niveles de ARNm de *Tfc211* y observamos una sobreexpresión más de 1000 veces superior a la obtenida en los MEFs-Vector (**Figura R8 B**). Esta alta sobreexpresión es unas 100 veces mayor a la hallada en hipoxia respecto a normoxia en el experimento 3T3 con MEFs-WT (**Figura R3 C**). Por último, estudiamos los niveles de ARNm de diferentes genes que previamente habíamos encontrado sobreexpresados en hipoxia. Así, en MEFs-*Tfc211* de normoxia encontramos sobreexpresión de p16^{Ink4a} y p21^{Cip1}, al igual que a nivel proteico, y también de los genes relacionados con las propiedades de células madre *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* y *Nanog*. En el caso de c-Myc, observamos una pequeña disminución de la expresión al igual que en experimentos con MEFs-WT en hipoxia (**Figura R4**). Por último, hallamos sobreexpresión también en genes involucrados en la ruta de señalización de Tfc211 en el mantenimiento de la pluripotencia de mESCs^{265,266}. Estos son *Esrrb*, *Tbx3* y *Klf2*, así como *Hes1* y *Hey1*, de la vía de Notch, que es regulada por Tfc211 en el desarrollo²⁶⁷ (**Figura 8C**). Estos resultados sugerían que los niveles de expresión de *Tfc211* suprafisiológicos podrían actuar como oncogénicos induciendo una señal de OIS en MEFs independientemente de los niveles de oxígeno.

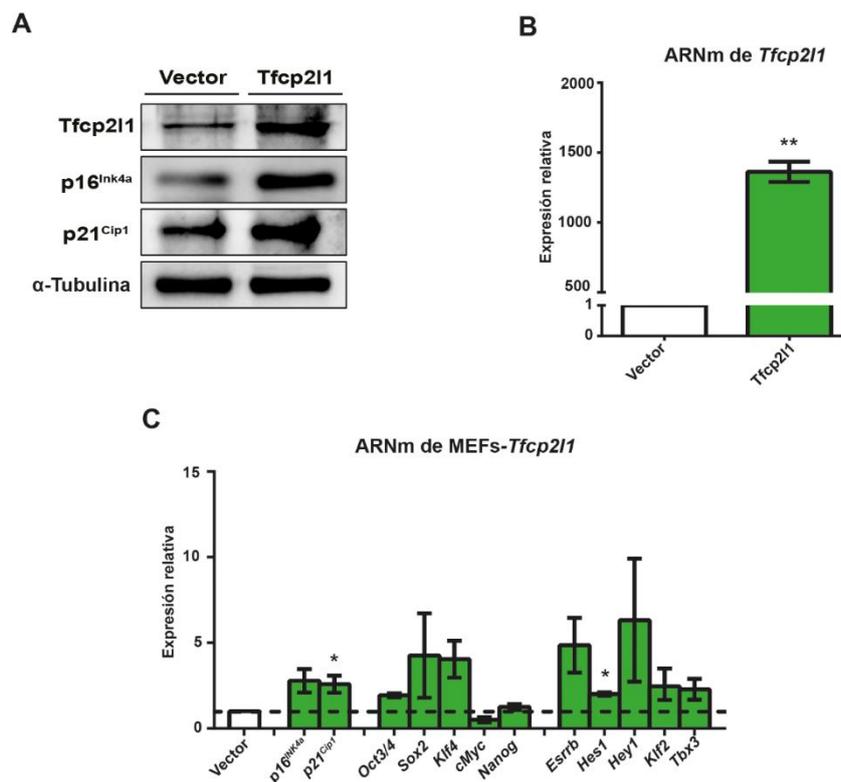


Figura R8. La sobreexpresión de *Tfc211* en normoxia afecta a los niveles de ARNm y proteína de genes alterados por la hipoxia. A) Niveles de proteína de Tfc211 y CKIs. Se analizaron los niveles de proteína de Tfc211, p16^{Ink4a} y p21^{Cip1} en muestras MEFs infectados y seleccionados tras los primeros 3 días de protocolo 3T3-modificado. **B) Niveles de ARNm de Tfc211.** Se analizó los niveles de ARNm Tfc211 en muestras a los 3 primeros días de protocolo 3T3-modificado. **C) Niveles de ARNm de CKIs, genes relacionados con las propiedades de células madre y genes relacionados con la ruta de señalización de Tfc211 en mESCs.** Se midieron por qRT-PCR los niveles de expresión de los genes p16^{Ink4a}, p21^{Cip1}, Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc y Nanog, Esrrb, Hes1, Hey1, Klf2 y Tbx3. Para el análisis estadístico en los niveles de ARNm se utilizó el test t-Student. Las gráficas muestran la media de, al menos, 3 repeticiones independientes medidas por triplicado (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

A continuación, utilizamos un sistema de expresión inducible por doxiciclina para expresar *Tfcp2l1* a niveles similares a los obtenidos en el cultivo de hipoxia en MEFs cultivados exclusivamente en normoxia (MEFs-*Tfcp2l1*-Inducible). Cultivamos los fibroblastos añadiendo doxiciclina al medio de cultivo a distintas concentraciones (100, 500 y 1000 ng/μl) y comparamos su crecimiento respecto al control sin doxiciclina en un experimento 3T3. Observamos un aumento de la proliferación y una extensión de la vida proliferativa en normoxia sólo de los MEFs-*Tfcp2l1*-Inducible cultivados con 500 ng/μl de doxiciclina. El resto de los cultivos de fibroblastos no crecieron más allá de los 20 días (**Figura R9 A**).

Obtuvimos un incremento en los niveles de ARNm de *Tfcp2l1* con el aumento de concentración de doxiciclina. Pudimos observar un incremento en la expresión de genes relacionados a las propiedades de célula madre en los días 3 y 6 en los MEFs-*Tfcp2l1*-Inducible cultivados con 500 ng/μl de doxiciclina. Estos genes fueron *Oct3/4*, *c-Myc*, *Nanog*, *Sox2*, *Sox9*, *Bmi1* y *Klf2*. Pero esta sobreexpresión se reducía en el día 15 (**Figura R9 B**). También se obtuvo esta sobreexpresión en *Stat3* y *Tbx3*, cuyo aumento se prolongó hasta el día 15. En el caso de *Gbx2* sólo hubo incremento en los niveles de ARNm con doxiciclina en el día 9 (**Figura R9 C**). Además, medimos la expresión transcripcional de los CKIs *p21^{Cip1}* y *p16^{INK4a}*. En el caso de *p21^{Cip1}* se observó un incremento de la expresión con la adición de doxiciclina que aumentó con el tiempo en cultivo. Sin embargo, no observamos diferencias en los niveles de ARNm de *p16^{INK4a}*, a excepción de una disminución en la muestra cultivada con doxiciclina a 500 ng/μl en el día 15. Por último, observamos un incremento en los niveles de expresión de *Bax*, que se igualaron a los del control en el día 15 (**Figura R9 D**).

Estos datos demuestran que sólo los niveles de expresión de *Tfcp2l1* similares a los inducidos por la hipoxia pueden aumentar la vida proliferativa de los MEFs, mientras que la reducción de su expresión o el aumento en niveles muy superiores desembocan en senescencia. Además, estos niveles óptimos simulados en el experimento con la adición de doxiciclina a 500 ng/μl, logran promover la expresión de genes que hemos visto sobreexpresados en nuestros cultivos de MEFs en hipoxia y disminuyen la expresión de *p16^{INK4a}* para permitir la extensión de la vida proliferativa.

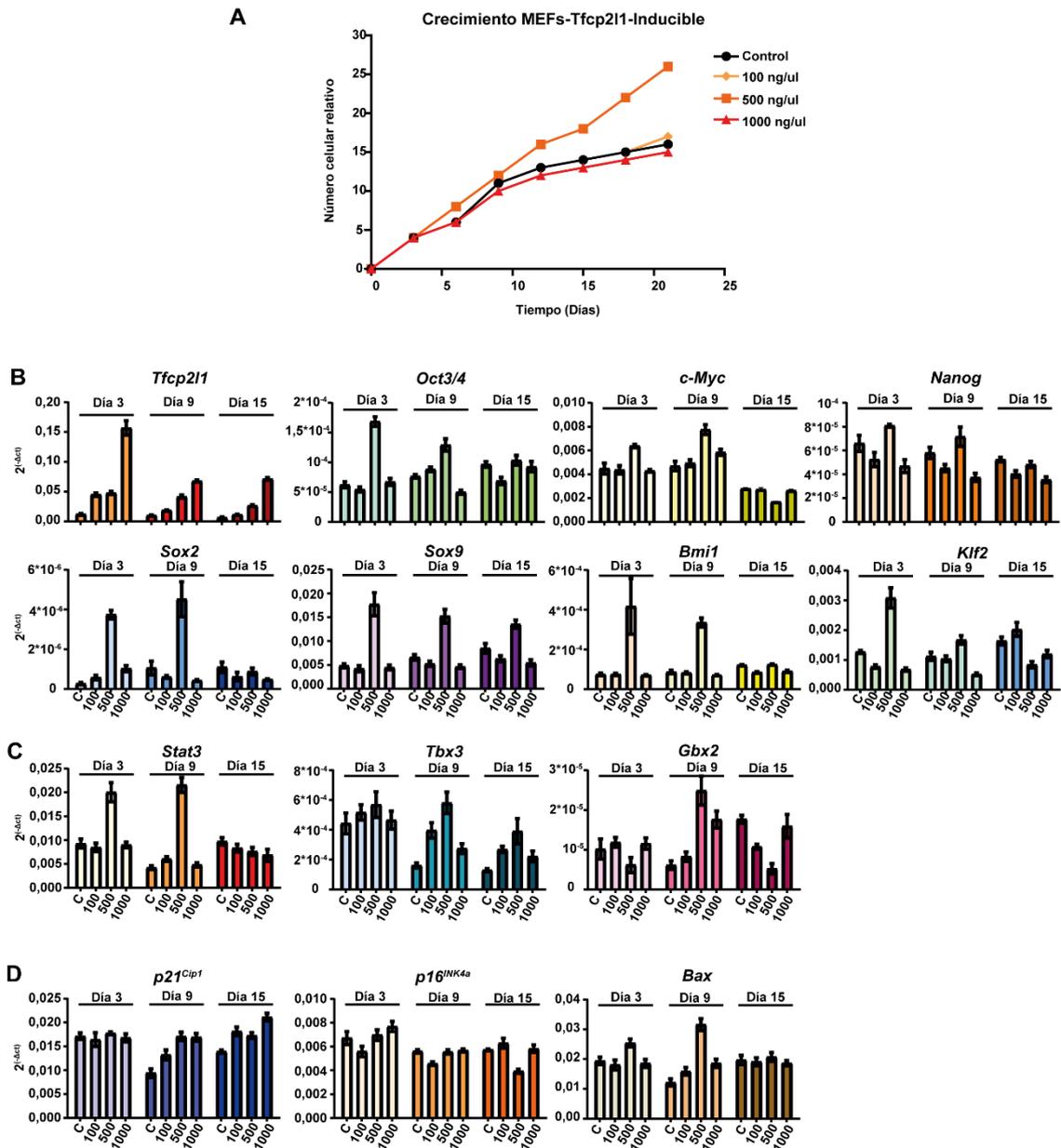


Figura R9. La sobreexpresión de *Tfc211* en niveles similares a los alcanzados por la hipoxia extiende la vida proliferativa de MEFs cultivados en normoxia. **A)** Crecimiento celular relativo de MEFs-*Tfc211*-inducible en normoxia tratados con doxiciclina. MEFs fueron cultivados normoxia e infectados con lentivirus para la transducción de un vector de expresión de ADNc de *Tfc211* y un vector con el transactivador sensible a doxiciclina, tras la selección de las células que incorporaron los vectores, se sometieron a protocolo 3T3. Se les añadió doxiciclina cada 3 días a las concentraciones de 100, 500 y 1000 ng/ul. **B)** Niveles de ARNm de *Tfc211* y genes relacionados con las propiedades de células madre. Se analizaron los niveles de ARNm *Tfc211*, *Oct3/4*, *c-Myc*, *Nanog*, *Sox2*, *Sox9*, *Bmi1* y *Klf2* en muestras a los 3, 9 y 15 días de protocolo 3T3. **C)** Niveles de ARNm genes relacionados con la ruta de señalización de *Tfc211* en mESCs. Se midieron por qRT-PCR los niveles de expresión de los genes *Stat3*, *Tbx3* y *Gbx2*. **D)** Niveles de ARNm de CKIs y *Bax*. Se midieron por qRT-PCR los niveles de expresión de los genes p16^{INK4a}, p21^{Cip1} y *Bax* en muestras a los 3, 9 y 15 días de protocolo 3T3.

3. Estudio de la activación transcripcional de *Tfc211* en hipoxia

A continuación, estudiamos cómo se induce la expresión de *Tfc211* en hipoxia. En primer lugar, añadimos DMOG, un inhibidor específico de las PHDs, al medio de cultivo de células en normoxia. Estas proteínas se encargan de hidroxilar residuos de los factores Hif α , marcándolos para su posterior ubiquitinización mediada por Vhl y su degradación vía proteasoma¹⁶⁶. Como control de activación de las rutas de señalización en hipoxia, verificamos los niveles de *Ldha*,

diana transcripcional directa de Hif1 α , comprobando que los niveles de ARNm se elevaban significativamente por encima de los del control y los de hipoxia. Pudimos observar un aumento de los niveles de proteína de Tfc211 en los MEFs tratados (DMOG), que se elevaban por encima de los niveles de MEFs cultivados en normoxia (Control), similares a los de MEFs cultivados en hipoxia (Hipoxia) (**Figura R10 A**). A nivel de ARNm, observamos el mismo patrón de expresión de *Tfc211*. También pudimos observar sobreexpresión en algunos genes relacionados con las propiedades de célula madre en los MEFs tratados con DMOG, como los factores de Yamanaka *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* y *Nanog*, aunque detectamos cierta variabilidad en las muestras tratadas con DMOG para este último gen. (**Figura R10 B**).

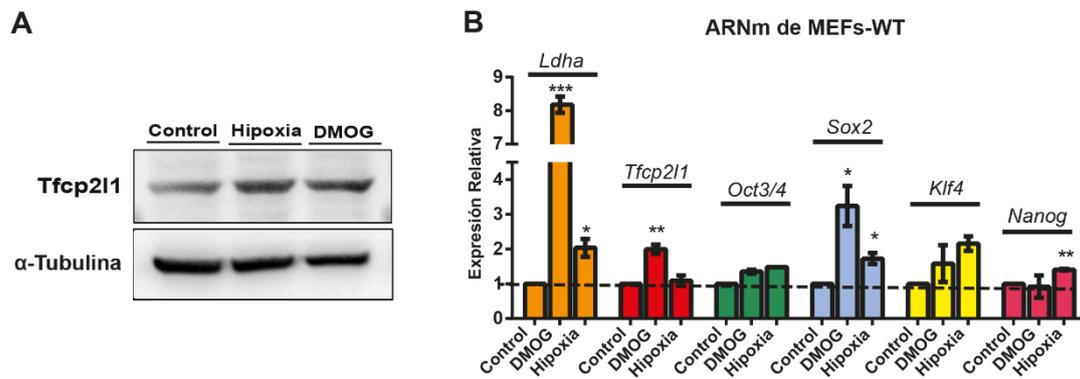


Figura R10. DMOG aumenta los niveles de *Tfc211* y de genes cuya expresión es alterada por la hipoxia. A) Niveles de proteína de *Tfc211* en MEFs tratados con DMOG. Se trataron MEFs con DMOG durante 24 horas tras las que se realizó extracto total de proteínas y se comparó con MEFs cultivados en normoxia y MEFs cultivados en hipoxia. **B) Niveles de ARNm en MEFs tratados con DMOG.** Se trataron MEFs con DMOG durante 24 horas y se trajeron muestras de ARN. Se midió la expresión transcripcional por qRT-PCR de los genes *Ldha*, *Tfc211*, *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* y *Nanog*. Para el análisis estadístico en los niveles de ARNm se utilizó el test t-Student. Las gráficas muestran la media de, al menos, 3 repeticiones independientes medidas por triplicado (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Para determinar si la sobreexpresión de *Tfc211* podría estar causada directa o indirectamente por Hif1 α , decidimos sobreexpresar esta proteína en normoxia. Para ello, utilizamos una versión mutante del ADNc de Hif1 α , cuya traducción resulta en la sustitución de 3 aminoácidos (Pro402, Pro577 y Asp813 por 3 residuos Ala). Esto reemplaza los residuos diana de las PHDs por otros que no son capaces de hidroxilar. De este modo, se confiere estabilidad a la proteína en presencia de oxígeno, simulando una activación constitutiva²⁶⁸.

En primer lugar, llevamos a cabo la infección lentiviral de los vectores control (Vector) y el ADNc de Hif1 α triplemente mutado (*Hif1 α -3M*) y la selección de las células transducidas en normoxia. En primer lugar, observamos la parada proliferativa de las células y la adquisición de alta actividad β -galactosidasa ácida en MEFs-*Hif1 α -3M* (**Figura R11 A**). Comprobamos la sobreexpresión de Hif1 α mediante western blot, detectando los niveles de proteína Hif1 α , así como los de la etiqueta que incluye el ADNc del vector transducido (Myc-Tag) y de *Tfc211*. Detectamos sobreexpresión en todos los casos en MEFs-*Hif1 α -3M* (**Figura R11 B**).

A continuación, medimos los niveles de ARNm de diferentes genes cuya expresión observamos alterada previamente en hipoxia. En los MEFs-*Hif1 α -3M* se producía una sobreexpresión de las dianas de Hif1 α , *Vegfa* y *Ldha*. Esto se correspondía con una correcta

Resultados

actividad transcripcional de Hif1 α en las células. Encontramos también mayores niveles de *Tfcp2l1* en MEFs-*Hif1 α -3M*, confirmando la inducción por hipoxia de la expresión de *Tfcp2l1*. En cuanto a genes efectores de senescencia, pudimos observar un incremento de la expresión de los CKIs, *p16^{INK4a}* y *p21^{Cip1}*. Además de la sobreexpresión de *Tfcp2l1* en MEFs-*Hif1 α -3M* respecto a MEFs-Vector, se produjo un incremento de los niveles de ARNm de *Oct3/4*, *Klf4* y *c-Myc*. También estudiamos la expresión de genes de la ruta de señalización de *Tfcp2l1* en mESCs y pudimos observar un incremento en *Esrrb*, *Stat3*, *Tbx3* y *Gbx2* (**Figura R11 C**).

Estos datos en su conjunto también sugieren que la activación constitutiva de Hif1 α , mediante la sobreexpresión de una forma mutante, podría desencadenar, al igual que *Tfcp2l1*, una señal de OIS que disminuiría la capacidad proliferativa manteniendo activos los CKIs, a pesar de la activación de ciertas señales de pluripotencia.

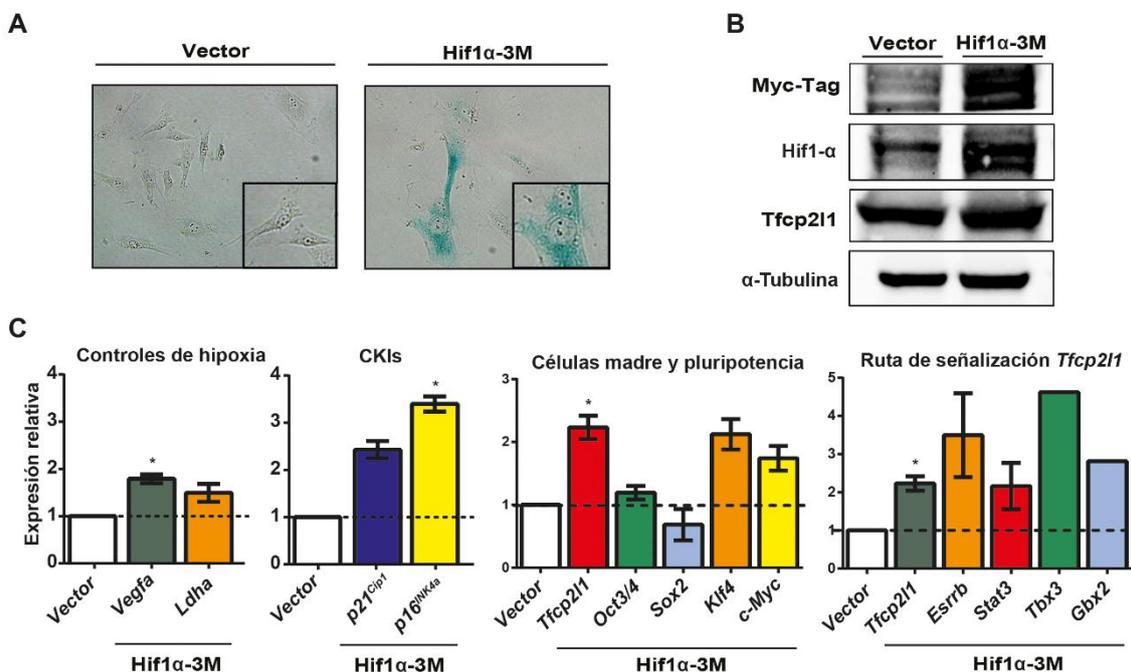


Figura R11. La sobreexpresión de *Hif1 α -3M* activa dianas de la hipoxia en condiciones de normoxia y provoca senescencia prematura. A) Morfología celular senescente y tinción X-Gal. Se observó la morfología citoplásmatica en MEFs infectados y seleccionados que fueron fijados para su tinción con reactivo X-Gal. B) Niveles de proteína Hif1 α y Tfcp2l1 inducidos por la sobreexpresión de Hif1 α -3M. Se cuantificaron mediante wetern blot los niveles de proteína de Hif1 α y la etiqueta Myc-Tag en MEFs-Hif1 α -3M respecto a MEFs-Vector. También se midieron los niveles de Tfcp2l1. C) Niveles de ARNm de controles de activación de la hipoxia, CKIs, genes relacionados con las propiedades de células madre y la pluripotencia, y genes de la ruta de señalización de Tfcp2l1 inducidos por la expresión de Hif1 α -3M. Se midió la expresión transcripcional mediante qRT-PCR de los genes *Vegfa*, *Ldha*, *p16^{INK4a}*, *p21^{Cip1}*, *Tfcp2l1*, *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*, *Esrrb*, *Stat3*, *Tbx3* y *Gbx2*. Para el análisis estadístico en los niveles de ARNm se utilizó el test t-Student. Las gráficas muestran la media de, al menos, 3 repeticiones independientes medidas por triplicado (*p<0,05; **p<0,01; *<0,001).**

Los datos de activación de *Tfcp2l1* por el mutante activo Hif1 α -3M sugieren que Hif1 α puede ser el factor de transcripción que active la expresión de *Tfcp2l1* uniéndose a su promotor o un *enhancer*.

Para ello, decidimos estudiar la posible interacción entre Hif1 α y regiones reguladoras cercanas al gen *Tfcp2l1* en el ADN. En primer lugar, observamos la proximidad a *Tfcp2l1* de otro

gen con función relevante en desarrollo, *Gli2*. Para determinar qué regiones potencialmente reguladoras podrían actuar sobre *Tfcp2l1* y no sobre *Gli2* u otro gen cercano, realizamos un estudio de los dominios del ADN asociados topológicamente (TADs). Para ello, hicimos un análisis *HiC* de datos públicos procedentes de células ES-E14²⁵⁸. Tanto *Tfcp2l1* como *Gli2* pertenecen a un mismo TAD que, a su vez, está dividido en varios subTADs, de forma que ambos están ocupando subTADs diferentes. Esto restringe la búsqueda de potenciales elementos reguladores específicos de *Tfcp2l1* a una región más concreta.

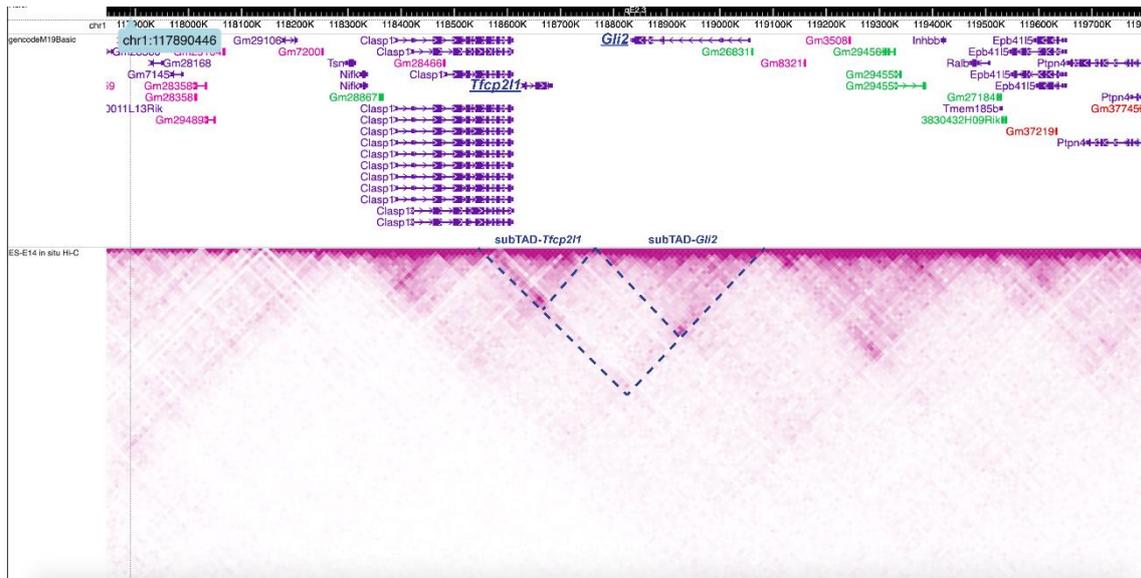


Figura R12. *Tfcp2l1* comparte un TAD junto a *Gli2*, pero forma su propio subTAD dentro de este. Se muestran los resultados de *HiC* para TADs cercanos a *Tfcp2l1* en MEFs. Los datos se obtuvieron desde el repositorio público *ENCODE* (GSE74055), fueron visualizados con *WashU Epigenome Browser* y se señalaron los subTADs encontrados.

A continuación, estudiamos la existencia de posibles elementos reguladores en las regiones cercanas a la secuencia de *Tfcp2l1* en el ADN. Para ello, se analizaron datos de ChIP-seq públicos para las modificaciones de histonas H3K27ac (que marca *enhancers* y promotores activos) e H3K4me3 (que marca promotores activos, pero no *enhancers*)²⁶⁰ en fibroblastos derivados de embriones en día de desarrollo 13,5²⁵⁹. Para ambos marcadores, observamos un alto número de picos en las regiones cercanas a *Gli2* y entre los genes *Tsn* y *SNORA17*, así como en las proximidades de *Tfcp2l1*, aunque estos picos eran menos pronunciados, indicando, posiblemente, una menor actividad reguladora (**Figura R13**).

Resultados

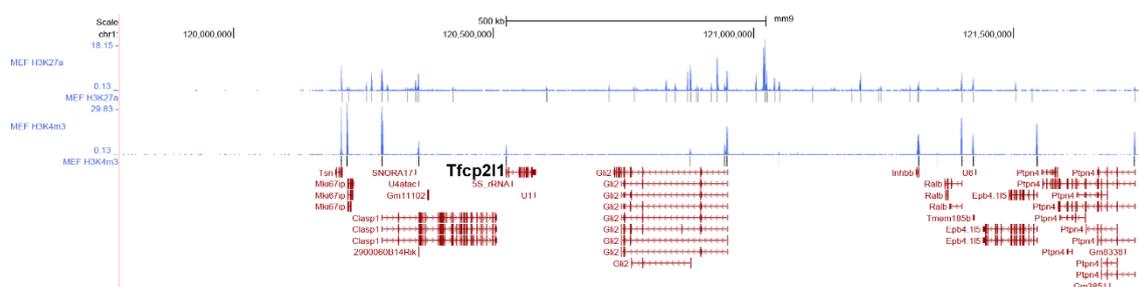


Figura R13. Existen múltiples posibles promotores y *enhancers* en las regiones cercanas a *Tfc211* en el ADN. Se muestran los resultados de CHIP-Seq para H3K27ac y H3K4me3 cercanos a *Tfc211* en MEFs. Se analizaron los datos publicados (GSE49847) y se obtuvieron los picos para la región que ocupa el subTAD asociado a *Tfc211* en el genoma localizado en el análisis anterior.

Finalmente, analizamos mediante la herramienta *Jaspar* las secuencias donde se hallaron evidencias de la presencia de las modificaciones de histona H3K27ac y de H3K4me3. Analizamos todos los picos entre el gen *Tsn* y la zona intergénica existente entre *Gli2* e *Inhb*. Con esta herramienta, tratamos de identificar si en dichas secuencias se encontraba el motivo de unión de Hif1 α al ADN. Como resultado, obtuvimos varias predicciones con un alto valor de significación estadística en la predicción. En la tabla, se recogen los valores de predicción para los motivos de unión por los que se une al ADN Hif1 α , Arnt (también conocido como Hif1 β) y el dímero formado por Arnt-Hif1 α . Se muestran los valores de predicción partir de valor 8 (**Tablas R1 y Tabla R2**).

Tabla R1. Es probable encontrar motivos de unión de Hif1 α al ADN junto a marcas H3K4me3 cerca del gen *Tfc211*. Se obtuvieron las secuencias de los H3K4me3 analizados previamente. Se introdujeron estas secuencias en la herramienta *Jaspar* y se anotaron los valores de predicción superiores a 8. Se destacan en negrita los valores superiores a 10 o cercanos a 10 con redundancia en la misma secuencia.

Nº	Picos H3K4me3		Valores de predicción	
	Coordenadas		Hif1 α (Hs)	Arnt-Hif1 α (Mm, Hs) Arnt (Mm)
1	chr1 120207069	120208069		8,9+8,6 10,35(x2)
2	chr1 120218264	120219264		10,35(x2)
3	chr1 120284832	120285832		
4	chr1 120353476	120354476		
5	chr1 120355828	120356828		
6	chr1 120524203	120525203		
7	chr1 120878169	120879169	11,44	9,65 8,6
8	chr1 120944066	120945066		
9	chr1 120948708	120949708		
10	chr1 121048448	121049448		8,6

Tabla R2. Es probable encontrar motivos de unión de Hif1 α al ADN junto a marcas H3K27ac cerca del gen *Tfcp2l1*. Se obtuvieron las secuencias de los H3K27ac analizados previamente. Se introdujeron estas secuencias en la herramienta *Jaspar* y se anotaron los valores de predicción superiores a 8. Se destacan en negrita los valores superiores a 10 o cercanos a 10 con redundancia en la misma secuencia.

Nº	Picos H3K27ac			Valores de predicción		
	chr	Coordenadas	Hif1 α (Hs)	Arnt-Hif1 α (Mm, Hs)	Arnt (Mm)	
1	chr1	120207404 120208404		8,9	10,35(x2)	
2	chr1	120221282 120222282				
3	chr1	120255176 120256176		8,9	10,35(x2)	
4	chr1	120265167 120266167		8,6		
5	chr1	120285203 120286203		8,9		
6	chr1	120295951 120296951	11,33		10,32	
7	chr1	120334277 120335277		8,66		
8	chr1	120349335 120350335				
9	chr1	120353439 120354439				
10	chr1	120355455 120356455				
11	chr1	120421418 120422418		8,9		
12	chr1	120601335 120602335	11,33+9(x2)	9-10(x4)	10,35(x4)	
13	chr1	120601816 120602816	10+11+9(x3)	9,5(x2)	10,35(x4)	
14	chr1	120721954 120722954				
15	chr1	120770136 120771136				
16	chr1	120832188 120833188				
17	chr1	120848959 120849959				
18	chr1	120849606 120850606				
19	chr1	120872555 120873555				
20	chr1	120878507 120879507	11,44	9,7	8,6	
21	chr1	120889798 120890798		9,1		
22	chr1	120893574 120894574				
23	chr1	120918933 120919933				
24	chr1	120929983 120930983				
25	chr1	120948747 120949747				
26	chr1	121004587 121005587			8,6	
27	chr1	121022115 121023115				
28	chr1	121025014 121026014		9,4		
29	chr1	121026023 121027023				
30	chr1	121040365 121041365				
31	chr1	121049700 121050700				

Estos picos con alto valor de predicción coincidían con el promotor de *Tsn* (pico 1 en ambos ChIP-Seq, **Tablas R1 y R2**) otro, aguas arriba de *Clasp1* (pico 6 de H3K27ac **Tabla R2**), otro en el primer intrón de este mismo gen (picos 12 y 13 en el ChIP-Seq de H3K27ac **Tabla R2**) y uno último aguas abajo de *Tfcp2l1* (pico 20 de H3k27ac y pico 7 de H3K4me3 **Tablas R1 y R2**). De entre todos, la mayor concentración de valores de predicción altos se encontró aguas abajo de *Tfcp2l1*. Esto sugiere una alta probabilidad de unión de Hif1 α a un *enhancer* activo perteneciente al subTAD de *Tfcp2l1* y, por tanto, que Hif1 α podría regular la expresión de *Tfcp2l1* durante la hipoxia.

4. Estudio de las dianas transcripcionales de Tfc2l1 en hipoxia y normoxia

Para estudiar las dianas reguladas por Tfc2l1 en hipoxia y, en concreto, aquellas posibles responsables de su efecto de extensión de vida proliferativa, realizamos ChIP-Seq (mediante protocolo *ChIPmentation*) inmunoprecipitando Tfc2l1 en una muestra de normoxia senescente (Sen) y una muestra de hipoxia inmortalizada (Inm). Los resultados de secuenciación se analizaron mediante el mapeo o alineamiento con el genoma de ratón *Mouse Dec. 2011 (GRCm38/mm10)* y, posteriormente, realizando la identificación de picos estadísticamente significativos o *peak calling*. Se estableció $q\text{-valor} < 0,01$ como nivel de significación estadística para reducir falsos positivos. De este modo, pudimos distinguir 3 grupos de picos: uno de señal específica en la muestra de senescencia (Sen, 198 picos); otro de señal específica en la muestra inmortalizada (Inm, 418 picos); y un tercer grupo con señal común en ambas muestras al que denominamos Com (194 picos) (**Figura R14**).

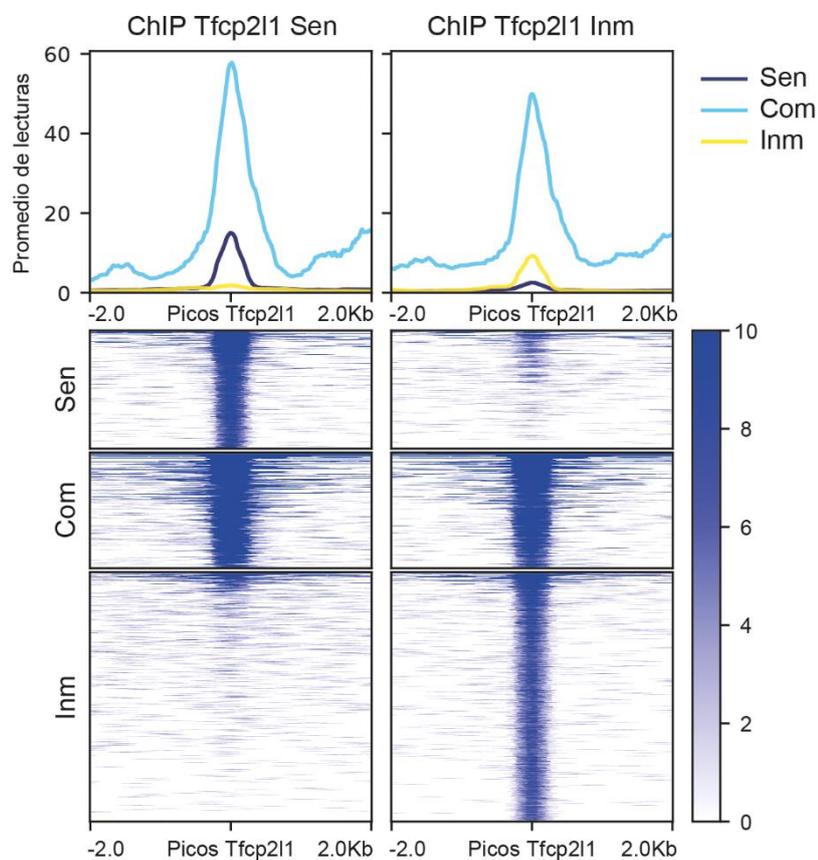


Figura R14. Tfc2l1 se une a un mayor número de secuencias asociadas a genes en inmortalización (Inm). Se muestra la señal de secuenciación del ChIP-Seq de Tfc2l1 en senescencia (Sen) e inmortalización (Inm). Media del número de lecturas entorno a los picos de Tfc2l1 en la muestra de normoxia senescente (Sen), y en la de hipoxia inmortalizada (Inm). Se observa una señal específica de cada muestra y una señal común en los perfiles de ambas muestras y en el *heatmap*.

Posteriormente, realizamos un análisis de enriquecimiento de motivos de unión al ADN de factores de transcripción (TFs) en los 3 grupos de picos. En el caso de los picos asociados a la muestra senescente (Sen), se hallaron los motivos descritos para los TFs ETS:RUNX, KLF10, NFkB-p50-p52 y NFAT. El p-valor de estos 4 motivos no era inferior a 10^{-2} . En cambio, en el grupo de picos comunes (Com), los motivos encontrados eran más numerosos y de menor p-valor. Los 5 motivos más significativos fueron aquellos descritos para los TFs HIF-1b, Tfc2l1,

Atf, HIF-2a y NFAT-AP1. Por último, en el grupo de picos de la muestra de hipoxia inmortalizada (Inm) se encontraron enriquecidos 2 motivos de TFs, siendo el de menor p-valor el motivo de Tfcp2l1 y el segundo, el motivo formado por *RAR:RXR*. La presencia del motivo de unión de Tfcp2l1 al ADN es indicativo de la especificidad de los picos encontrados en la muestra tomada durante la inmortalización (**Figura R15**).

Orden	Motivo	TF	p-Valor	% Secuencias diana	% Secuencias inespecíficas
Sen					
#1		ETS:RUNX	1*10 ⁻²	3,54%	0,90%
#2		KLF10	1*10 ⁻²	29,80%	21,25%
#3		NFkB-p50,p52 (RHD)	1*10 ⁻²	3,54%	0,95%
#4		NFAT(RHD)	1*10 ⁻²	12,12%	7,21%
Com					
#1		HIF-1b(HLH)	1*10 ⁻⁵	32,99%	19,68%
#2		Tfcp2l1	1*10 ⁻⁴	7,22%	1,91%
#3		Atf1(bZIP)	1*10 ⁻⁴	17,01%	8,25%
#4		HIF2a(bHLH)	1*10 ⁻⁴	13,40%	5,84%
#5		NFAT:AP1 (RHD,bZIP)	1*10 ⁻⁴	6,19%	1,62%
Inm					
#1		Tfcp2l1	1*10 ⁻³	3,83%	1,85%
#2		RAR:RXR (NR),DR5	1*10 ⁻²	1,20%	0,23%

Figura R15. El motivo de unión al ADN de Tfcp2l1 se encuentra enriquecido en los picos comunes (Com) y en los de la muestra de células inmortalizadas (Inm). Análisis de enriquecimiento de motivos en los 3 grupos de picos del ChIP-Seq. Se muestran por orden de p-valor los enriquecimientos más significativos estadísticamente en cada grupo junto con el porcentaje de secuencias diana (picos) y secuencias inespecíficas (control aleatorio o “background”) en los que se han encontrado los motivos.

Resultados

A continuación, se identificaron los genes asociados a los picos en el genoma de referencia mediante la herramienta *GREAT*, que establece un dominio regulatorio para cada gen y les asocia los picos localizados dentro de dichos dominios (Ver materiales y métodos). Como resultado, se encontraron 236 genes asociados a picos específicos de la muestra de células senescentes (Sen), 644 genes asociados a picos específicos de la muestra inmortalizada en hipoxia (Inm) y 249 genes comunes a ambas muestras (Com) (**Figura R16**). Algunos de los ejemplos de genes asociados a picos de señal más representativa fueron los siguientes: *Gbx2* y *Tet2* en la muestra Senescente (Sen) (**Figura R17**), *Axin2*, *Hes7* y *Hey2*, hallados como picos comunes (Com) en ambas muestras (**Figura R18**) e *Il2-Il21*, *Sox5* y *Tbx6*, que se encontraron sólo durante la immortalización en hipoxia (Inm) (**Figura R19**).

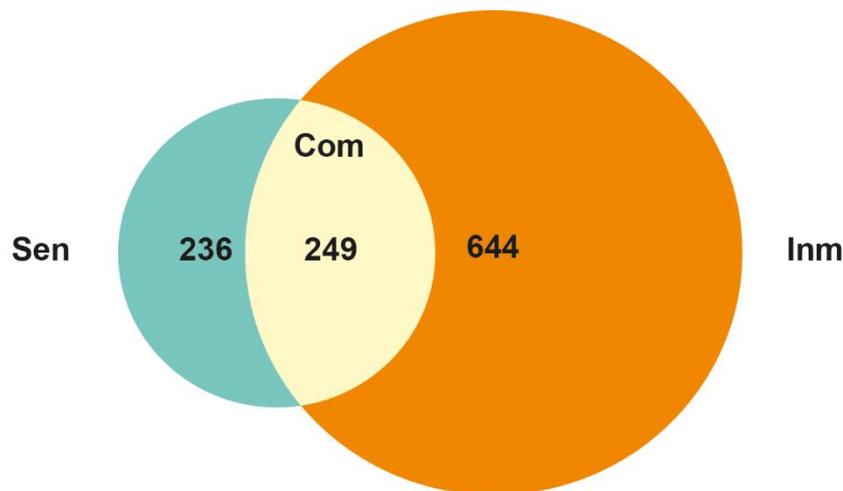


Figura R16. Número de genes asociados a los picos específicos y comunes de cada muestra. Se encontraron 236 genes asociados a picos específicos de senescencia (Sen), 644 genes asociados a picos específicos de immortalización en hipoxia (Inm) y 249 genes comunes (Com).

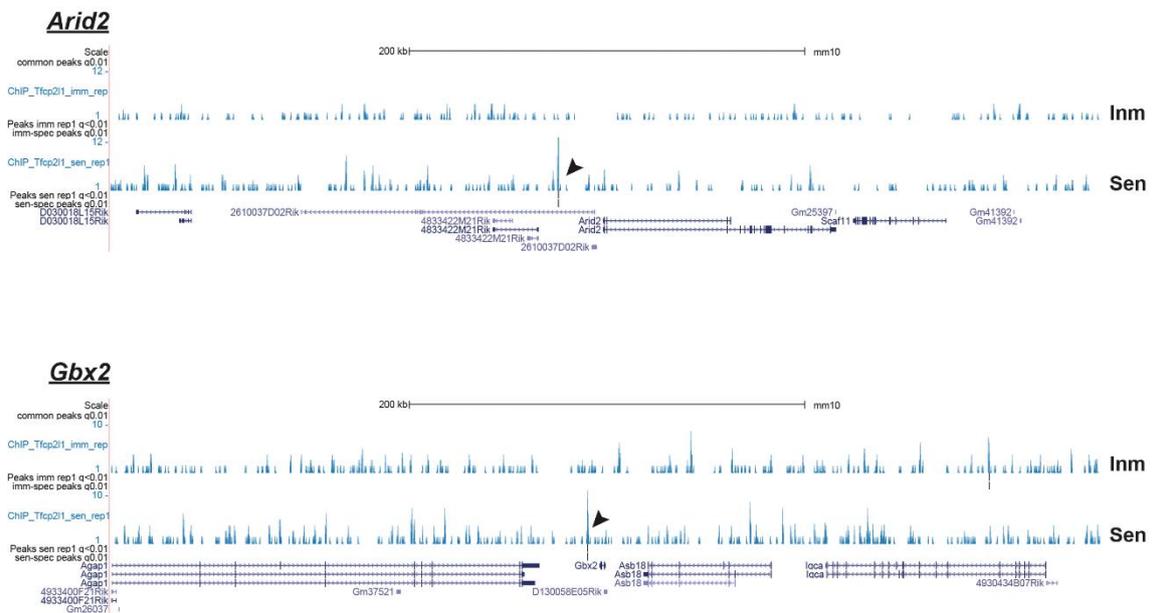


Figura R17. Ejemplo de picos asociados a genes en la muestra senescente (Sen). Se muestran imágenes obtenidas desde *UCSC Genome Browser* tras el mapeo o alineamiento de la secuenciación resultante del experimento ChIP-Seq con el genoma de referencia *Mouse Dec. 2011 (GRCm38/mm10)*. Los picos asociados a los 3 genes son específicos de la muestra de senescencia (Sen).

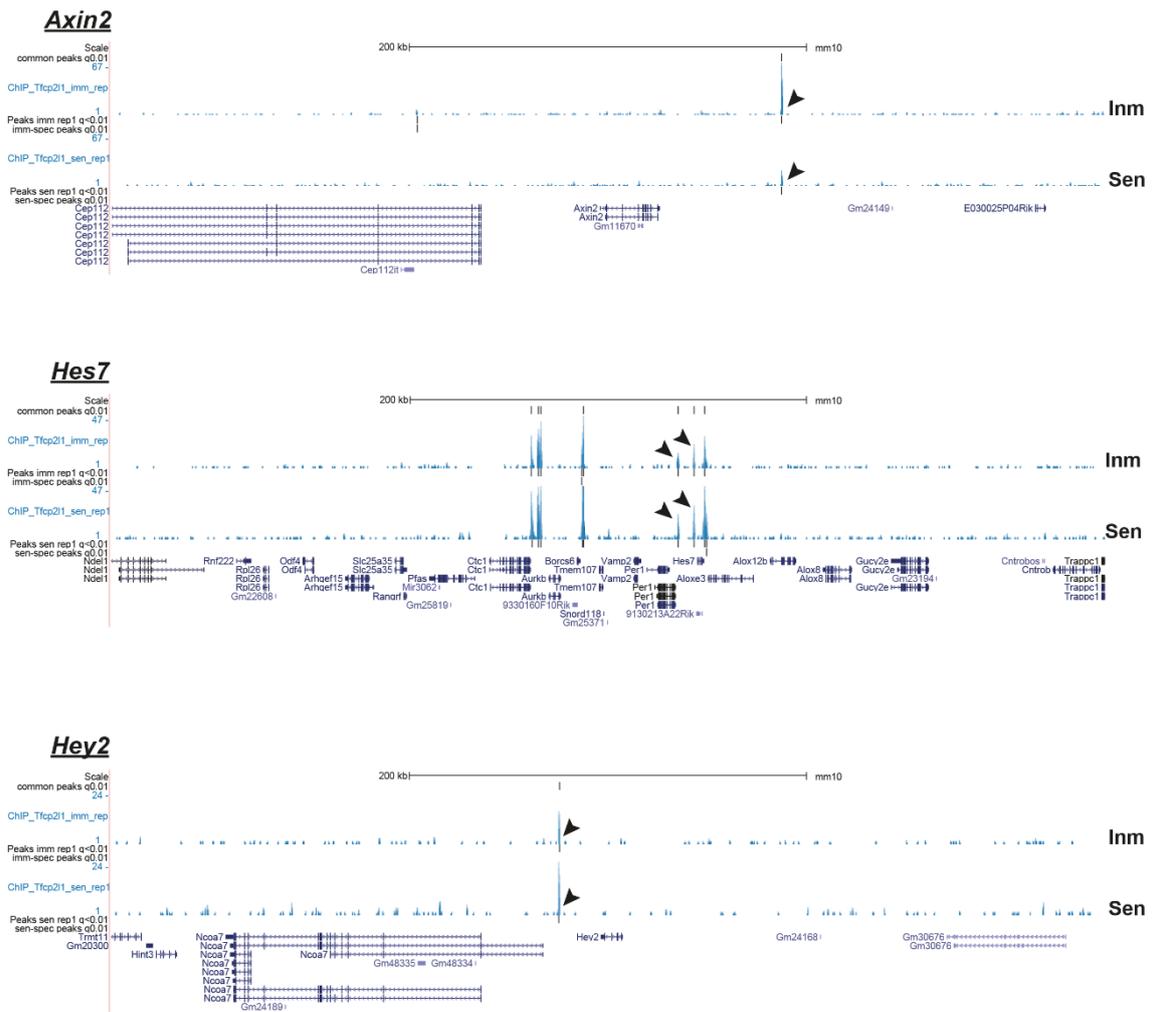
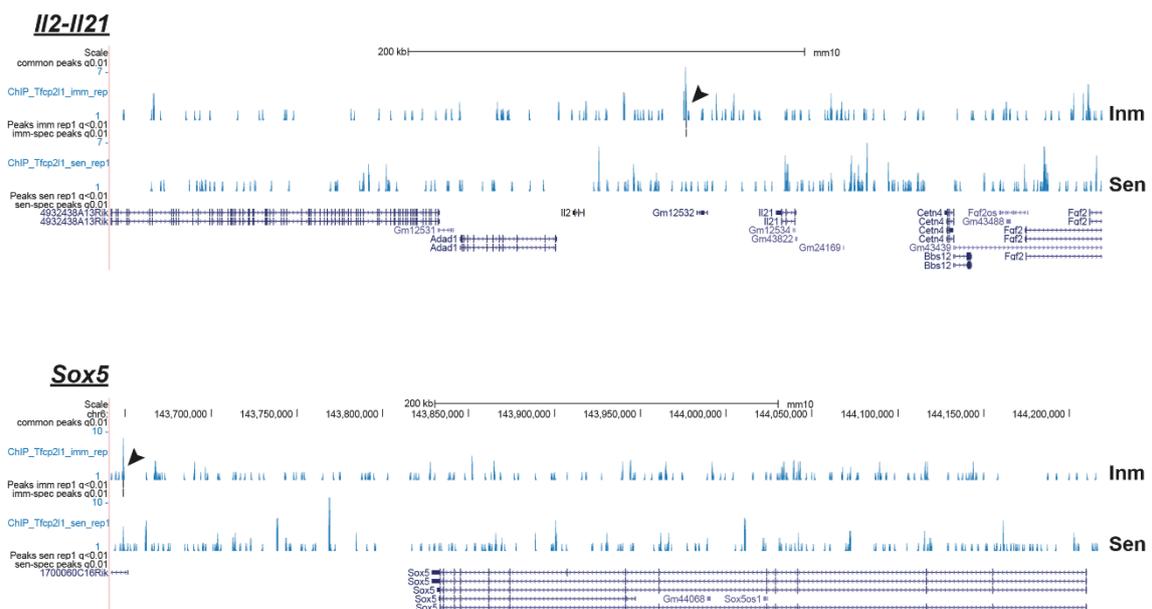


Figura R18. Ejemplo de picos asociados a genes comunes a senescencia e inmortalización en la muestra (Com). Se muestran imágenes obtenidas desde *UCSC Genome Browser* tras el mapeo o alineamiento de la secuenciación resultante del experimento ChIP-Seq con el genoma de referencia *Mouse Dec. 2011 (GRCm38/mm10)*. Los picos asociados a los 3 genes se encuentran en la muestra de senescencia (Sen) y en la muestra de inmortalización (Imm).



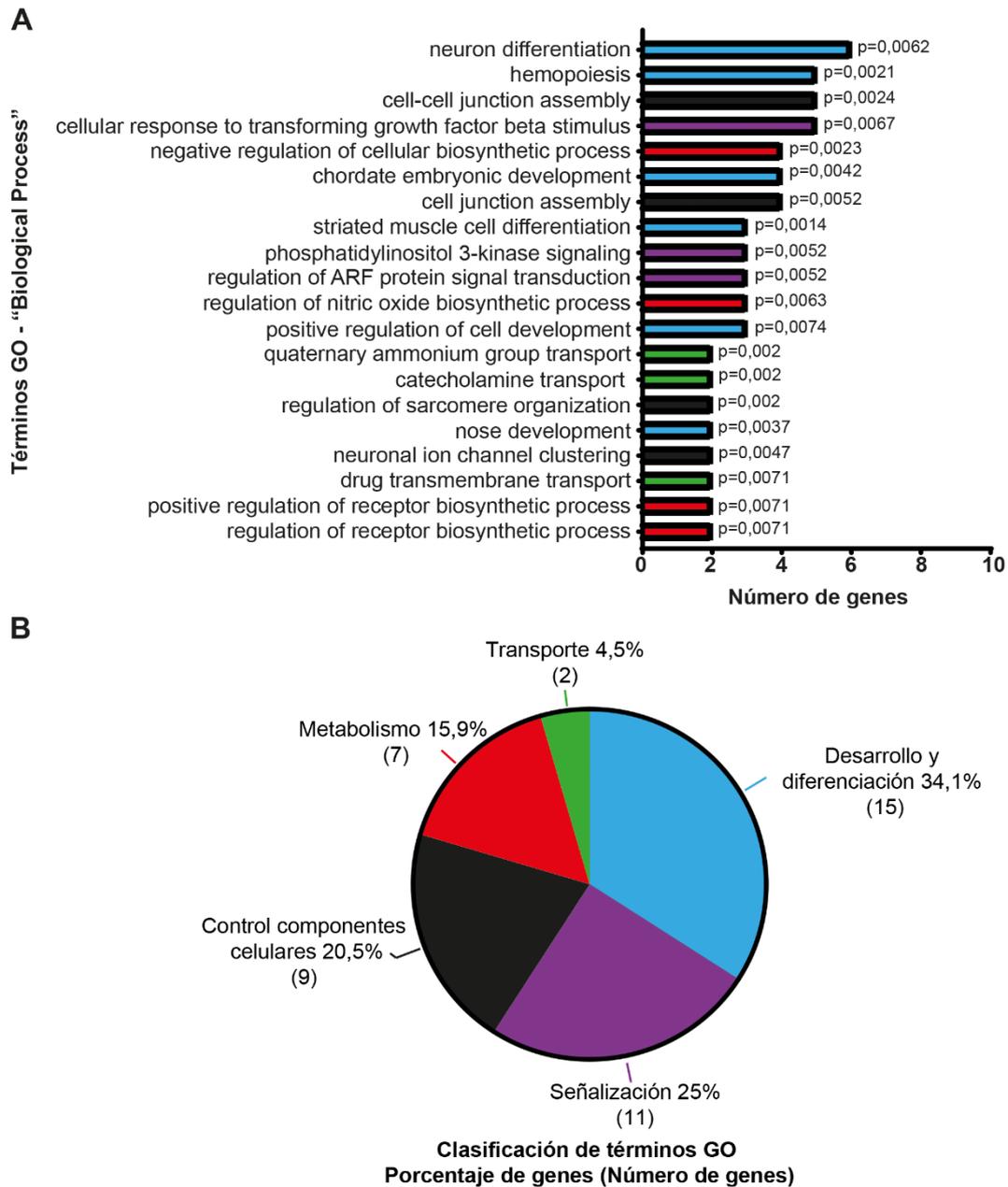


Figura R20. Los picos de Tfcp2l1 en células senescentes (Sen) se asocian a genes implicados en diversos procesos biológicos. A) Número de genes asociados a picos en los 20 términos GO *Biological Process* más significativos de células senescentes (Sen). Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional sobre los genes asociados a picos de Tfcp2l1 en la muestra senescente (Sen) utilizando los términos GO *Biological Process* a través de la herramienta *Enrichr* y se representó el número de genes coincidentes en los 20 términos de menor p-valor. B) Clasificación en categorías funcionales generales de los genes incluidos en los 20 términos GO *Biological Process* de células senescentes (Sen). Los 20 términos GO *Biological Process* más significativos se analizaron mediante la herramienta *CateGORizer* para clasificarlos dentro de sus términos GO superiores o ancestrales. Estos términos superiores se clasificaron, a su vez, en categorías generales que describieran los procesos biológicos de los términos GO. Se representa el porcentaje y número de genes de los 20 términos GO *Biological Process* más significativos incluidos en cada categoría.

Resultados

Realizamos el mismo análisis con los 644+249 genes asociados a picos hallados en la muestra de MEFs inmortalizados por hipoxia (Inm). En esta ocasión el solapamiento entre los genes de los términos GO y los genes de la muestra fue mayor, ascendiendo hasta un máximo de 41 genes y obteniendo un p-valor mínimo en el orden de magnitud de 10^{-4} . Entre los resultados con mayor número de coincidencias se encontraron términos como “*regulation of cell proliferation*”, “*negative regulation of cellular process*”, “*positive regulation of cellular process*”, “*positive regulation of cell proliferation*” y “*glycosaminoglycan biosynthetic process*”. **(Figura R21 A).**

De nuevo, clasificamos mediante la herramienta *CateGORizer* los 20 términos GO más significativos y, tras obtener sus términos superiores, los reunimos en 5 categorías funcionales. Se encontró como la categoría más representativa aquella que contenía los términos GO relacionados con procesos de *proliferación*. Esta categoría reunía un 45,5% de los genes (N=46) de todos los incluidos en los 20 términos GO más significativos. En segundo lugar, englobamos los términos GO que hacían referencia a *señalización* y que representaban el 26,7% de los genes (N=27). La siguiente categoría con mayor número de genes era la que denominamos *desarrollo y diferenciación*, con el 13,9% (N=14). Finalmente, encontramos términos referentes al *metabolismo*, que suponían el 10,9% (N=11), y al *control de componentes celulares*, con un 2,8% de los genes (N=3). 2 de los términos GO con mayor número de genes incluidos hacían referencia a procesos celulares muy generales (“*negative regulation of cellular process*” y “*positive regulation of cellular process*”) por lo que no se incluyeron en ninguna categoría funcional **(Figura R21 B).**

Según el análisis funcional de los términos GO, *Tfcp2l1* podría unirse a zonas del genoma asociadas a genes involucrados en la regulación de la proliferación. Esto parecía suceder de forma relevante sólo en las células inmortalizadas en hipoxia (Inm) y no en la muestra de normoxia senescente (Sen). Para comprobar si la unión de *Tfcp2l1* a estos genes era específica de Inm, decidimos representar el perfil promedio de unión de *Tfcp2l1* en torno a cada pico asociado a los 46 genes de proliferación hallados en el análisis funcional de Inm **(Tabla R3).**

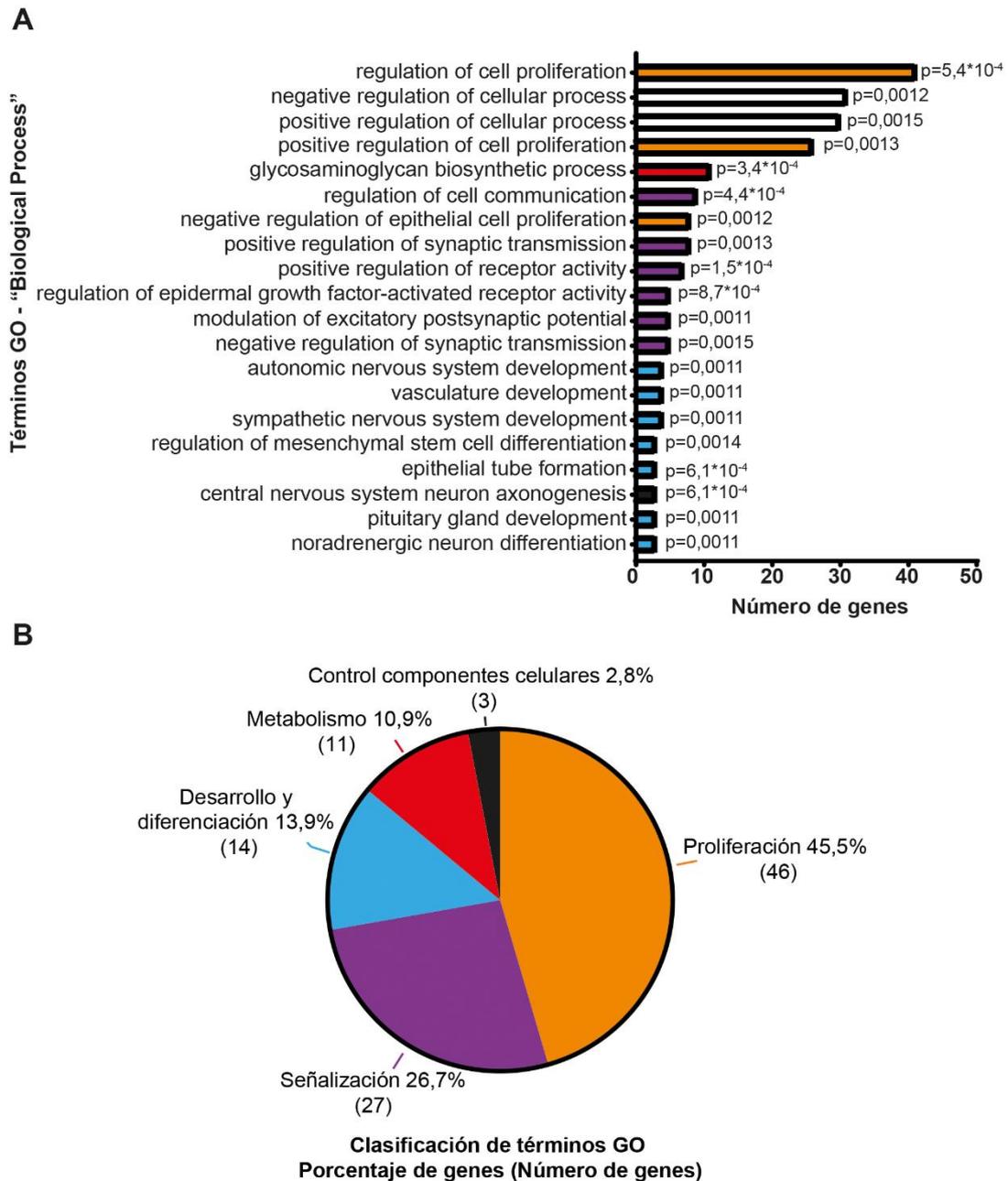


Figura R21. Los picos de Tfcp2l1 en células inmortalizadas por la hipoxia (Inm) se asocian a genes implicados en diversos procesos biológicos entre los que destaca la regulación de la proliferación. A) Número de genes asociados a picos en los 20 términos GO *Biological Process* más significativos de células inmortalizadas por la hipoxia (Inm). Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional sobre los genes asociados a picos de Tfcp2l1 en la muestra Inm utilizando los términos GO *Biological Process* a través de la herramienta *Enrichr* y se representó el número de genes coincidentes en los 20 términos de menor p-valor. **B) Clasificación en categorías funcionales generales de los genes incluidos en los 20 términos GO *Biological Process* de células inmortalizadas por la hipoxia (Inm).** Los 20 términos GO *Biological Process* más significativos se analizaron mediante la herramienta *CateGORizer* para clasificarlos dentro de sus términos GO superiores o ancestrales. Estos términos superiores se clasificaron, a su vez, en categorías generales que describieran los procesos biológicos descritos por los términos GO superiores. Se representa el porcentaje y número de genes de los 20 términos GO "Biological Process" más significativos incluidos en cada categoría.

Resultados

Tabla R3. Genes asociados a la regulación de la proliferación en las células inmortalizadas en hipoxia (Inm). Se muestra la relación de genes incluidos en los términos GO relacionados con la proliferación que resultaron estadísticamente significativos en el análisis funcional de la muestra de inmortalización en hipoxia (Inm). Dichos términos GO son: "regulation of cell proliferation" (GO:0042127), "negative regulation of epithelial cell proliferation" (GO:0050680), "positive regulation of cell proliferation" (GO:0008284).

Genes asociados a regulación de la proliferación - Inm			
<i>Adra1a</i>	<i>Ier5</i>	<i>Pdcd5</i>	<i>Slc25a33</i>
<i>Azgp1</i>	<i>Il1b</i>	<i>Pdgfra</i>	<i>Smarca2</i>
<i>Chrna10</i>	<i>Il2</i>	<i>Plpp1</i>	<i>Sox11</i>
<i>Dlg5</i>	<i>Il21</i>	<i>Prkch</i>	<i>Sox2</i>
<i>Fbxw7</i>	<i>Il7</i>	<i>Pten</i>	<i>Sox9</i>
<i>Fer</i>	<i>Irs2</i>	<i>Ptn</i>	<i>Tdgf1</i>
<i>Flt4</i>	<i>Klf10</i>	<i>Ptpnc</i>	<i>Tgfa</i>
<i>Fn1</i>	<i>Kmt2d</i>	<i>Rgcc</i>	<i>Thbs1</i>
<i>Folr2</i>	<i>Myo16</i>	<i>Runx3</i>	<i>Utp20</i>
<i>Garem1</i>	<i>Nacc2</i>	<i>Scgb3a1</i>	<i>Xiap</i>
<i>Gata3</i>	<i>Npr3</i>	<i>Sfrp2</i>	
<i>Grem1</i>	<i>Nrg1</i>	<i>Six3</i>	

Pudimos comprobar que la señal era muy leve en la muestra de MEFs senescentes (Sen) y muy alta, por el contrario, en las muestras de MEFs inmortalizados en hipoxia (Inm) (**Figura R22**), confirmando la especificidad de estos picos en condiciones de hipoxia/inmortalización.

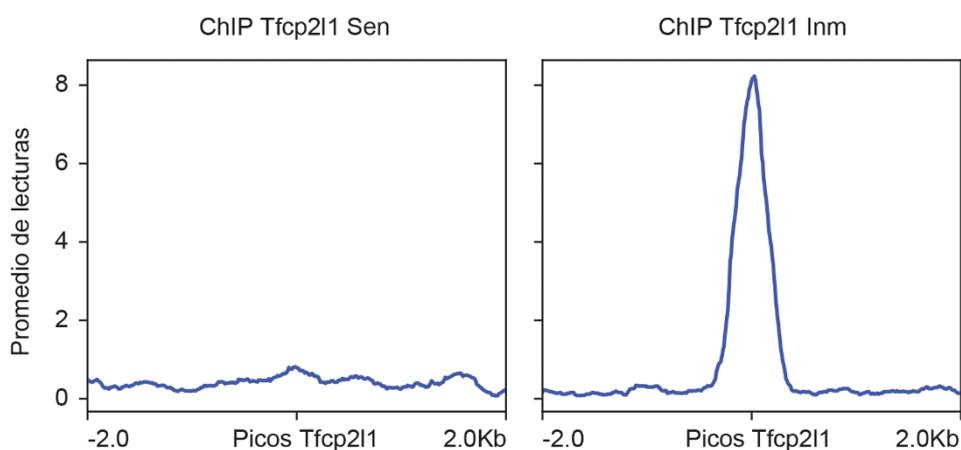


Figura R22. Tfc2p211 se une a genes relacionados con la regulación de la proliferación en células inmortalizadas en hipoxia (Inm) de manera específica. Representación del perfil de la señal de secuenciación obtenida en los ChIPs de Tfc2p211 para los picos a los que se asocian los 46 genes de regulación de la proliferación hallados en el análisis funcional de las células inmortalizadas en hipoxia (Inm).

Algunos ejemplos de los genes relacionados con funciones de proliferación asociados a estos picos son *Il1b*, *Il2*, *Klf10*, *Pdgfra*, *Rgcc*, *Sox2*, *Sox9*, *Sox11*, *Tdgf1* y *Tgfa* (**Figura R23**).

Posteriormente, decidimos validar algunos de estos picos mediante ChIP-qPCR inmunoprecipitando Tfc2p21 de nuevo en muestras senescentes (Sen) e inmortalizadas por la hipoxia (Inm) y utilizando cebadores diseñados para las regiones donde se localizaban dichos picos. Pudimos confirmar la unión de Tfc2p21 en muestras inmortalizadas por la hipoxia (Inm) para los picos asociados a *Tgfa*, *Sox2* y *Sox9*. Utilizamos cebadores diseñados contra una zona no codificante o desértica del genoma (“*Gene Desert*”) como control negativo de amplificación y obtuvimos una señal de amplificación menor a la de la muestra IgG en todos los casos (**Figura R24 A**). Además de esto, analizamos los niveles de ARNm de *Tgfa* en dos puntos diferentes del experimento 3T3. El primer punto se tomó cuando las células de normoxia conservaban la capacidad proliferativa (Pro). El segundo punto se tomó cuando los MEFs de normoxia entraron en senescencia (Sen) y los de hipoxia seguían proliferando (Inm). Encontramos sobreexpresión en las muestras de hipoxia respecto a las de normoxia (**Figura R24 B**) También hemos observado la sobreexpresión de *Sox2* y *Sox9* en muestras similares de hipoxia respecto a muestras de normoxia en experimentos 3T3 (**Figura R4 A**). Esto validaba los datos de ChIP-Seq y sugiere que Tfc2p21 podía estar activando la transcripción de estos genes en hipoxia.

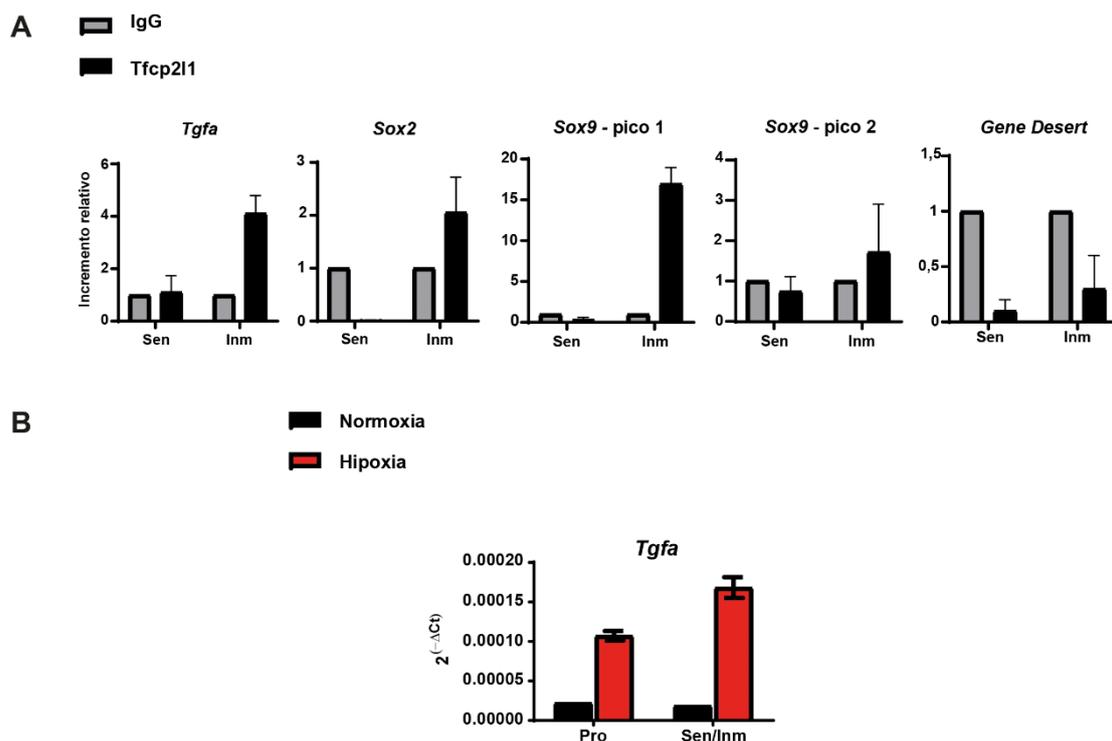


Figura R24. En los MEFs inmortalizados en hipoxia Tfc2p21 se une al ADN cerca de las secuencias de *Tgfa*, *Sox2* y *Sox9* cuya expresión aumenta en estas condiciones. A) Validación de la unión de Tfc2p21 al ADN en regiones asociadas a *Sox2*, *Sox9* y *Tgfa*. Se diseñaron cebadores específicos contra las regiones ocupadas por picos de Tfc2p21 en el ChIP-Seq realizado previamente y se analizó mediante qPCR el ADN inmunoprecipitado con anti-Tfc2p21 de nuevo en muestras de MEFs senescentes de normoxia (Sen) e inmortalizados en hipoxia (Inm). Se utilizaron cebadores contra una región no codificante del genoma como control negativo (*Gene desert*). Como control positivo se utilizó la inmunoprecipitación de las muestras con anti-RNA polimerasa II y cebadores contra el primer exón de α -tubulina. Los datos de Ct se analizaron mediante el método cuantificación relativa cuyo resultado (expresado en porcentaje de ADN de la muestra respecto al control negativo *INPUT*) se representó relativizando la muestra inmunoprecipitada con anti-Tfc2p21 a la inmunoprecipitada con IgG. **B) Expresión transcripcional de *Tgfa*.** Se analizaron mediante qRT-PCR los niveles de ARNm de *Tgfa* en MEFs en normoxia y en hipoxia al inicio del experimento 3T3 (Pro) y cuando entraron en senescencia en normoxia (Sen), pero proliferaban en hipoxia (Inm). Se muestra la media de, al menos, 2 réplicas biológicas analizadas por triplicado.

En conjunto, estos resultados indican que el incremento de la expresión de *Tfcp2l1* en hipoxia se corresponde con una mayor unión de este factor de transcripción al ADN y, en concreto, a regiones asociadas a genes con relevancia en la regulación de la proliferación entre los que destacamos, tras su validación, *Sox2*, *Sox9* y *Tgfa*.

5. Estudio del papel de *Tfcp2l1* en el efecto causado por la hipoxia en la generación de iPSCs

5.1. Efecto de la sobreexpresión de *Tfcp2l1* en reprogramación celular

Para estudiar la implicación de *Tfcp2l1* en el efecto que causa la hipoxia sobre la reprogramación celular, decidimos comparar la capacidad de generación de iPSCs de células que sobreexpresaban *Tfcp2l1* y células tratadas con hipoxia. Para ello, utilizamos MEFs de ratones transgénicos que poseían un cassette reportero para la expresión de *Nanog* (*GFP-IRES-Puro* introducido en la región no traducida 5' del gen *Nanog*¹⁹⁸).

Se infectaron esos MEFs-*Nanog-GFP* con vectores para la expresión de los 4 factores de Yamanka *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* (4F) y los 4 factores más *Tfcp2l1* (4F-*Tfcp2l1*). Los niveles de sobreexpresión de *Tfcp2l1* se comprobaron a los 4 días postransducción (**Figura R25 A**). Además, MEFs-4F se cultivaron en hipoxia (4F-Hipoxia) durante un periodo de 9 días. Tras esto, se devolvieron a normoxia y se seleccionaron con puromicina aquellas colonias que expresaban *Nanog* en todas las condiciones. Finalmente, se contaron las colonias *Nanog-GFP*⁺ a los 21 días (Ver materiales y métodos, Figura MM 1). Pudimos observar un aumento estadísticamente significativo en la generación de colonias iPSCs (*Nanog-GFP*⁺) en las condiciones 4F-Hipoxia y 4F-*Tfcp2l1* respecto a la condición control 4F de normoxia. Sin embargo, no hallamos diferencias significativas entre las condiciones 4F-Hipoxia y 4F-*Tfcp2l1*. Esto podría sugerir que *Tfcp2l1* es capaz de replicar el efecto de la hipoxia sobre la eficiencia de generación de iPSCs (**Figura R25 B y C**).

5.2. Efecto de la reducción de la expresión de *Tfcp2l1* en reprogramación celular

Posteriormente, decidimos comprobar el efecto de la disminución de *Tfcp2l1* en la generación de iPSCs tratadas con hipoxia. Para ello, realizamos el mismo experimento anterior y sobreexpresamos 2 moléculas diferentes de shARN (Sh#1 y Sh#2) y una molécula control (Sc) en MEFs-4F en hipoxia y también en normoxia como condición control. Comprobamos la disminución de la expresión de *Tfcp2l1* a los 4 días postraducción y hallamos una reducción en todas las condiciones respecto al control Sc de normoxia, especialmente en el caso del Sh#2 (**Figura R26 A**).

De nuevo, comparamos la capacidad de generación de iPSCs contando el número de colonias *Nanog-GFP*⁺ a los 21 días postransducción. En MEFs-4F-Sc, se observó un aumento estadísticamente significativo del número de colonias *Nanog-GFP*⁺ en hipoxia respecto a normoxia. Se produjo también una reducción del número de colonias con la expresión de ambos shARN respecto al Sc en cada condición de oxígeno.

Por otro lado, comparamos la generación de colonias en hipoxia durante la sobreexpresión de los ARNsh a la de normoxia. Observamos que el número de colonias se reducía a valores similares, especialmente en 4F-Sh#2 de hipoxia donde no se encontraron diferencias significativas respecto a 4F-Sc en normoxia (**Figura R26 B y C**).

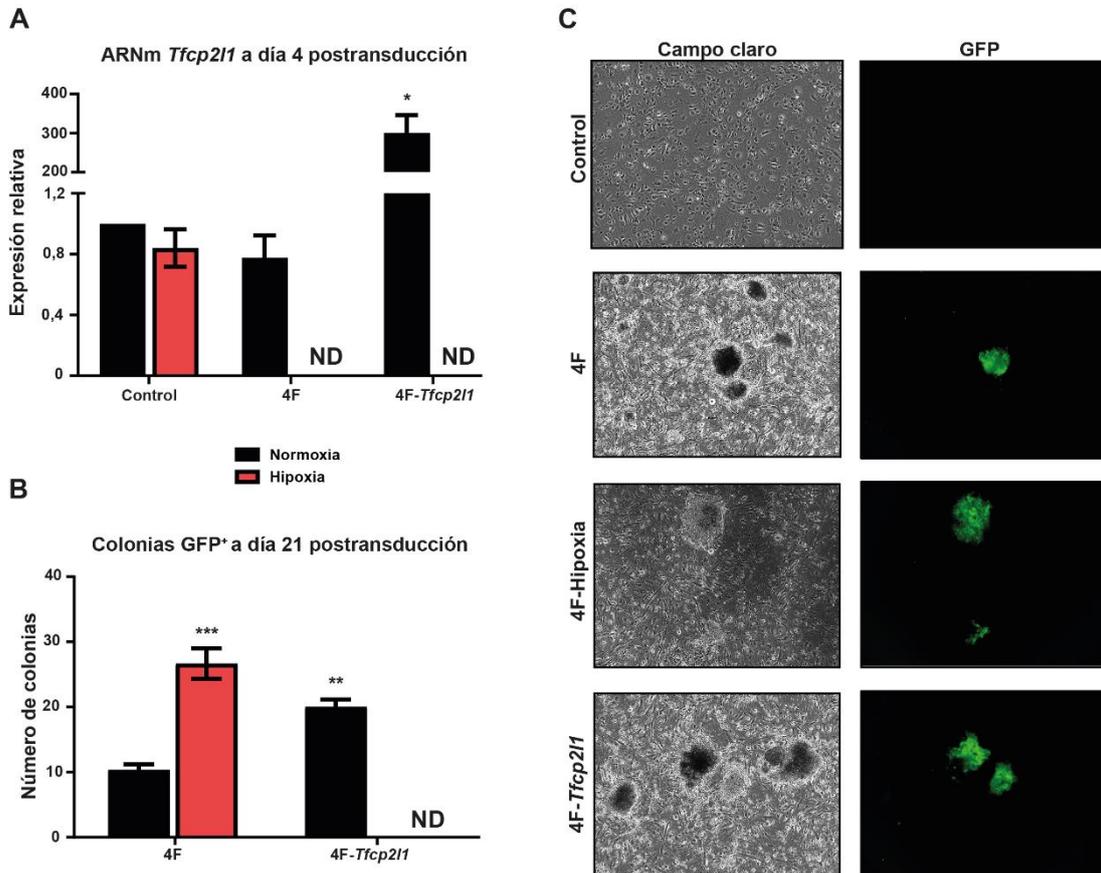


Figura R25. La sobreexpresión de *Tfc2l1* puede replicar el efecto de la hipoxia en reprogramación. A) Expresión transcripcional de *Tfc2l1*. A 4 días postransducción se recogieron muestras de todas las condiciones y se midieron los niveles de ARNm de *Tfc2l1* mediante qRT-PCR. El resultado de expresión se relativizó a la media del control 4F de normoxia **B) Número de colonias GFP+.** Se contaron las colonias GFP+ a 21 días postransducción en las diferentes condiciones. **C) Colonias iPSCs.** MEFs-Nanog^{GFP-IRES-Puro} transducidos con los factores indicados se seleccionaron para la expresión de Nanog en todas las condiciones y se observaron al microscopio de fluorescencia a 21 días postransducción. Para el análisis estadístico en los niveles de ARNm se utilizó el test Anova (One way). En el análisis de crecimiento se compararon todas las muestras entre sí mediante el test múltiple Anova. Las gráficas muestran la media de, al menos, 3 repeticiones independientes medidas por triplicado (*p<0,05; **p<0,01; ***<0,001). ND: no determinado.

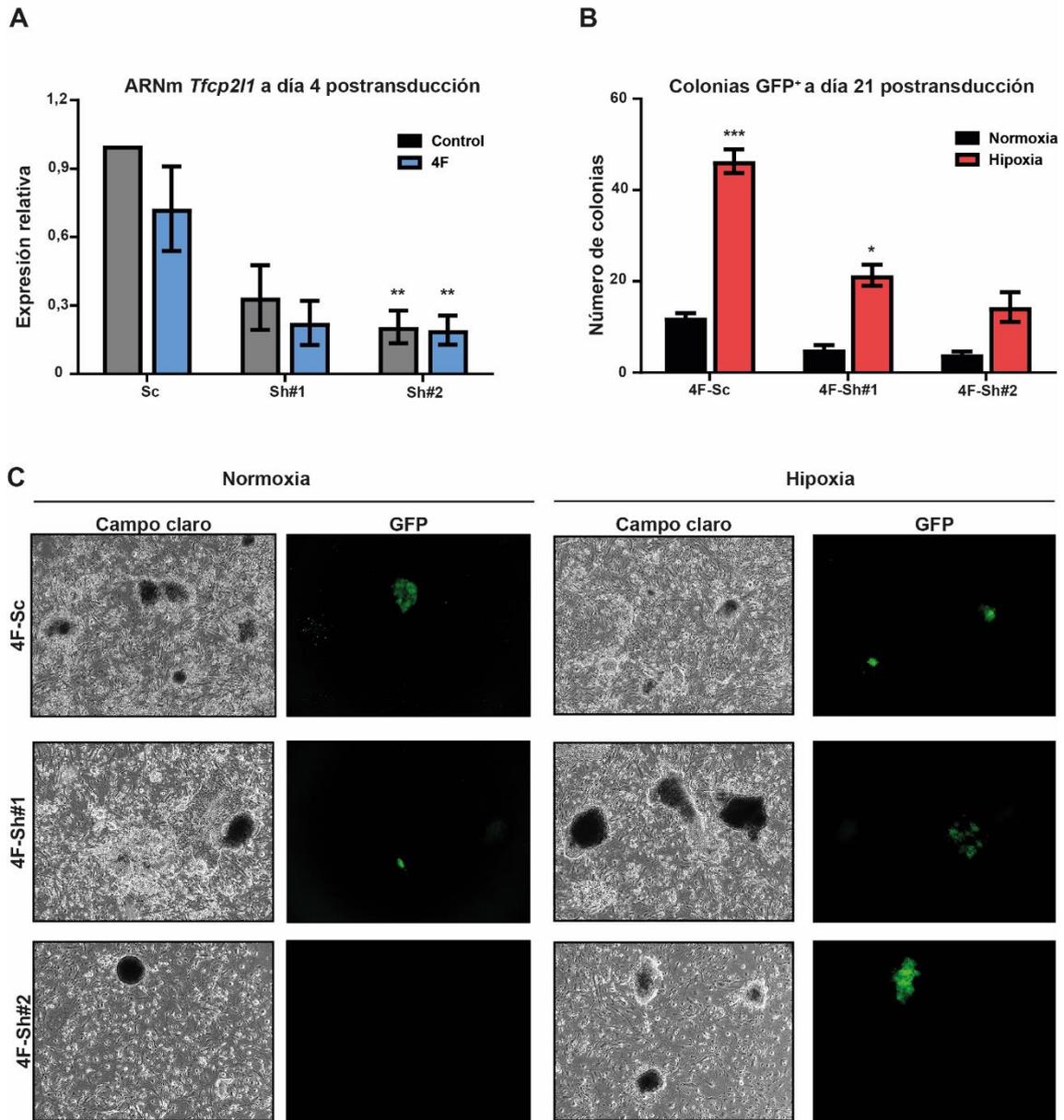


Figura R26. La reducción de la expresión de *Tfc211* puede reducir el efecto de la hipoxia en reprogramación. A) Expresión transcripcional de *Tfc211*. 4 días postransducción se recogieron muestras de todas las condiciones y se midieron los niveles de ARNm de *Tfc211* mediante qRT-PCR. **B) Número de colonias GFP+.** Se contaron las colonias GFP+ a 21 días postransducción en las diferentes condiciones. **C) Colonias iPSCs.** MEFs-Nanog^{GFP-IRES-Puro} transducidos con los factores indicados y ARNsh se seleccionaron para la expresión de Nanog en todas las condiciones y se observaron al microscopio de fluorescencia a 21 días postransducción. Para el análisis estadístico en los niveles de ARNm y de crecimiento se utilizó el test Anova (One way) y se eligió como condición de referencia la muestra 4F-Sc de normoxia. Las gráficas muestran la media de, al menos, 3 repeticiones independientes medidas por triplicado (*p<0,05; **p<0,01; ***<0,001).

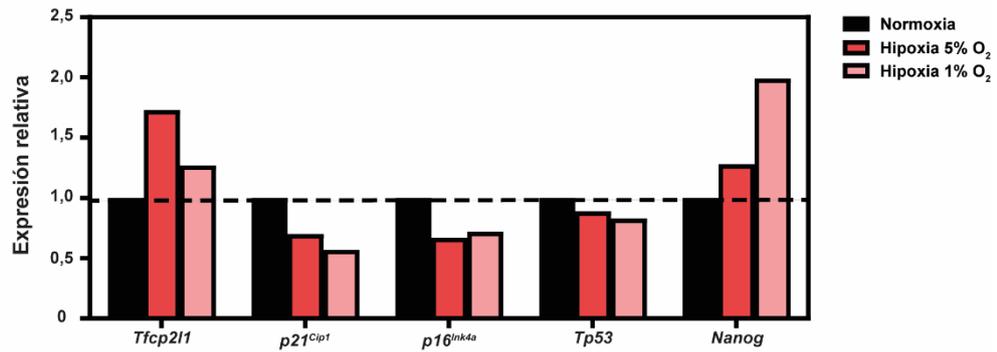
5.3. Meta-análisis de la expresión de *Tfcp2l1* en reprogramación

Por último, estudiamos en iPSCs la expresión de genes que podrían intervenir en el proceso de inmortalización celular. Para ello, realizamos un meta-análisis en el que analizamos la expresión de genes que previamente habíamos observado alterados por la hipoxia y por la sobreexpresión de *Tfcp2l1* en nuestro modelo de MEFs. Utilizamos datos de expresión de ARNm generados por el grupo de investigación del Dr. Shinya Yamanaka en experimentos de reprogramación con MEFs en condiciones similares a las de nuestros experimentos anteriores.

En primer lugar, comparamos la expresión de distintos genes en iPSCs generadas con un tratamiento de hipoxia similar al de nuestro experimento anterior. MEFs infectados con los 4 factores de Yamanaka se expusieron a concentraciones del 1% y 5% O₂ durante 9 días²⁰¹. Pudimos observar un incremento de *Tfcp2l1* en ambas condiciones de hipoxia, siendo mayor a 5% de O₂. En cambio, los efectores de la senescencia *p21^{Cip}*, *p16^{INK4a}* y *Tp53* disminuían su expresión con la reducción de los niveles de oxígeno. Además de esto, comprobamos la sobreexpresión de *Nanog* en hipoxia, cuyo incremento era mayor al 1% O₂ (**Figura R27 A**).

A continuación, comparamos la expresión de estos genes en diferentes estadios de la reprogramación con mESCs y células somáticas sin reprogramar. Así, observamos los niveles de ARNm en MEFs a días 2, 4, 8, 18 de reprogramación y también en iPSCs consideradas maduras. Tanto la expresión de *Tfcp2l1* como de *Nanog* aumentaban a lo largo del proceso de reprogramación, encontrándose los niveles más altos en iPSCs maduras. Estos niveles altos de las iPSCs eran similares en mESCs. Sin embargo, la expresión de *Tfcp2l1* y de *Nanog* era muy reducida en las muestras de células somáticas sin reprogramar. De nuevo, encontramos una correlación negativa entre la expresión de *Tfcp2l1* y de *p21^{Cip1}* y *p16^{INK4a}*, al igual que en nuestro modelo experimental de MEFs. Aunque los niveles de ARNm son altos en los primeros días de reprogramación, se produce una caída de la expresión en las iPSCs maduras e igualmente en mESCs, coincidiendo con los niveles más altos de *Tfcp2l1*. Por último, se observaron niveles más altos de *Tp53* en iPSCs y mESCs que en los estadios intermedios de reprogramación y que en células somáticas sin reprogramar (**Figura R27 B**).

A



B

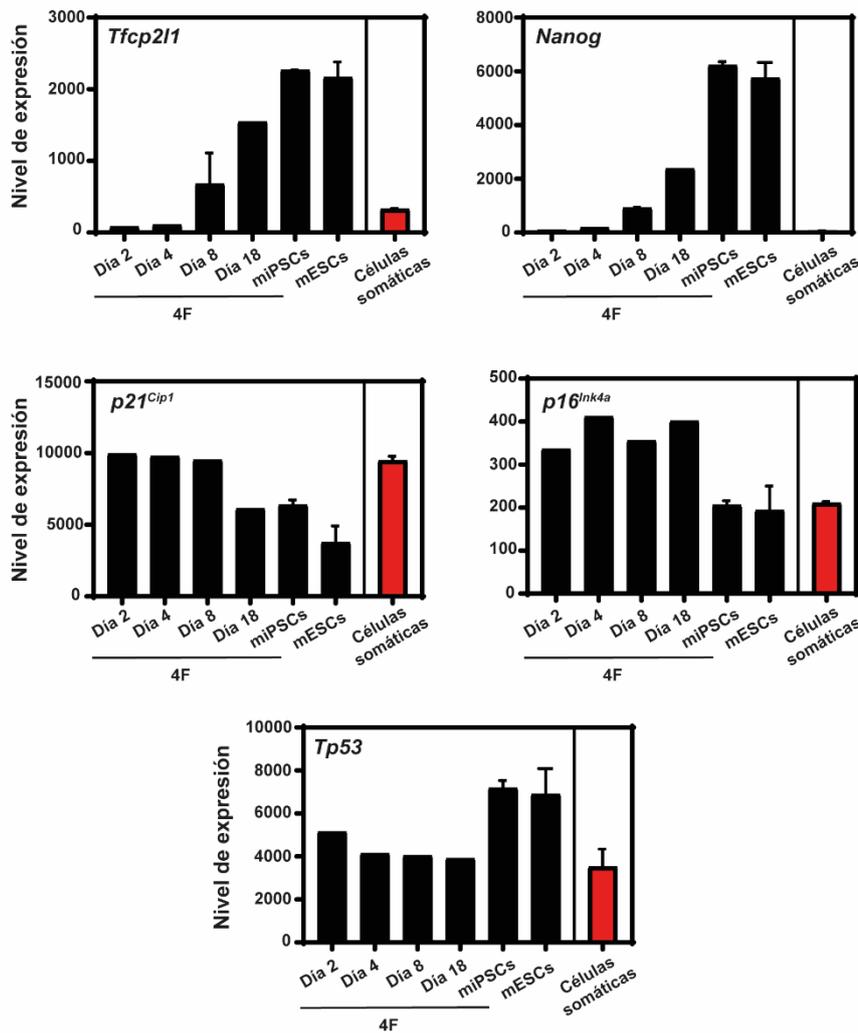


Figura R27. La expresión de *Tfc211* correlaciona positivamente con *Nanog* y negativamente con efectores de la senescencia en el proceso de reprogramación y en hipoxia. A) Niveles de ARNm en iPSCs cultivadas en hipoxia y normoxia. Se comparó la expresión de *Tfc211* con la de *p21^{Cip1}*, *p16^{Ink4a}*, *Tp53* y *Nanog* en iPSCs cultivadas en normoxia y a 5% y 1% de O₂. B) Niveles de expresión durante el proceso de reprogramación y en mESCs. Se compararon niveles de ARNm de *Tfc211*, *Nanog*, *p21^{Cip1}*, *p16^{Ink4a}*, y *Tp53* en MEFs a los 2, 4, 8 y 18 días de la transducción de OSKM, además de iPSCs maduras, mESCs y células somáticas sin reprogramar.

DISCUSIÓN

La senescencia celular es un estado celular complejo caracterizado por la parada proliferativa y unas características fenotípicas específicas. La senescencia puede ser inducida a través de diferentes mecanismos intrínsecos y extrínsecos como el acortamiento telomérico y la respuesta a daño en el ADN, la detección de señales oncogénicas, el estrés oxidativo o el tratamiento con terapias contra el cáncer^{3,4}. La senescencia celular es necesaria en la regulación de diversos procesos fisiológicos como la supresión tumoral^{5,6}, el desarrollo de estructuras del embrión, la cicatrización de tejidos y la reprogramación celular implicada en la regeneración tisular⁷. Además, la aparición de células senescentes correlaciona con el envejecimiento de los tejidos y está implicada en los efectos deletéreos de patologías asociadas a él⁸. A pesar de la relevancia fisiológica de la senescencia, se desconoce cómo la hipoxia, que es característica de todos los tejidos del organismo, afecta a su iniciación y desarrollo.

Se ha descrito que la hipoxia puede prolongar la vida replicativa de células primarias¹⁷¹⁻¹⁷⁴. Se ha sugerido que este aumento de la vida proliferativa puede ser debido a un efecto pleiotrópico como consecuencia de la disminución de mecanismos oxidativos¹⁷³. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que se debe a la activación de genes específicos por parte de la hipoxia, aunque no podemos descartar una participación posterior de la oxidación una vez iniciado el proceso de senescencia celular. Cuando se mantienen los cultivos primarios de MEFs en hipoxia, se activa Hif1 α , el cual a su vez activa y mantiene elevados los niveles de expresión de *Tfcp2l1*. Este se une a diversos promotores y *enhancers* a lo largo del genoma incluyendo genes implicados en proliferación, pluripotencia e inmortalización como *Sox2*, *Sox9* o *Tgfa*. De la misma manera, la expresión de *Tfcp2l1* regularía también la eficiencia en la generación de células iPSCs a partir de MEFs.

En nuestro modelo elegimos una hipoxia del 3% de O₂ ya que es representativa del nivel medio de oxígeno de los tejidos humanos^{157,173}. Y hemos comprobado la inmortalización de las células en hipoxia cultivándolas hasta 6 meses, observando que los MEFs mantenían su capacidad proliferativa sin variación durante todo este tiempo. Los MEFs mantenidos siempre en hipoxia desde su extracción del embrión alcanzan la extensión de la vida proliferativa en un 100% de los cultivos. De igual manera, el 100% de los cultivos generados en normoxia y que se mantienen en normoxia entran en senescencia. Sin embargo, dependiendo del momento y tiempo de exposición a normoxia durante la generación y cultivo de los MEFs, hay variabilidad en la extensión de vida proliferativa (**Figura R1 A**). Esto puede indicar cierta estocasticidad en el mecanismo molecular que define su entrada en senescencia o durante la inmortalización en hipoxia, debido, probablemente, a variaciones transcripcionales que podrían definir el fenotipo de inmortalización.

En las condiciones de cultivo más homogéneas estudiamos los cambios fisiológicos que producía la hipoxia en los fibroblastos primarios. Con la prolongación de la vida replicativa, la hipoxia también evitó la aparición de la morfología típica de senescencia y el incremento de la actividad β -galactosidasa ácida en las células. Además de esto, disminuyó la expresión de los CKIs *p21^{Cip1}*, *p15^{INK4b}* y *p16^{INK4a}*. Estos frenos del ciclo celular se mantuvieron siempre en niveles

de expresión significativamente menores en hipoxia respecto a normoxia, permitiendo la proliferación.

Además, observamos un aumento de la forma activa de p53, p-p53 (Ser15) junto con altos niveles de la histona modificada pH2AX (Ser 139) en hipoxia respecto a normoxia. Se sabe que la hipoxia puede generar estrés replicativo en ausencia de daño al ADN cuando los niveles de oxígeno son muy bajos (0.01%). Esto supone un estímulo oncogénico que activa ATM, que es capaz de fosforilar tanto p53 como la histona H2AX^{262-264,269}. En nuestros resultados, observamos una señalización similar, por lo que creemos que también puede ocurrir cuando los niveles de oxígeno son del 3%. Alternativamente, también se ha propuesto que el aumento de pH2AX (Ser139) puede ser llevado a cabo por Hif1 α en hipoxia, de manera independiente al daño en el ADN²⁷⁰. Además, se ha visto que pH2AX favorece el papel oncogénico de HIF1 α en tumores de mama, suponiendo una ventaja adaptativa para el crecimiento del tumor, ya que promueve la función de HIF1 α como factor inductor de la glicolisis y la metástasis²⁷¹. De este modo, el aumento de pH2AX en hipoxia podría ser un efecto secundario de la acción de Hif1 α en MEFs.

Como el aumento de pH2AX podría llevar a un aumento de activación de p53, estudiamos su señalización midiendo la expresión de sus dianas transcripcionales *p21^{Cip1}* y *Bax*²⁰. Los niveles de ARNm de ambos genes disminuían con el tiempo y en el caso de *p21^{Cip1}*, los niveles de proteína también. Aunque Bax es una proteína proapoptótica, nos servía como control de la actividad transcripcional de p53. De este modo, la señalización de p53 ante el estrés detectado en hipoxia no desemboca en una respuesta de parada proliferativa ni la entrada en senescencia. Por lo tanto, debe de existir un mecanismo que evita la senescencia inducida por p53, a pesar de no disminuir los niveles de esta proteína o de reducir la señalización de estrés celular que realiza pH2AX y que se deben, posiblemente, al exceso proliferativo.

En conjunto, apoyan la existencia de una respuesta adaptativa, como la referida por Parrinello et al. 2003¹⁷³, que permite la proliferación de los MEFs en hipoxia a pesar de la activación de la vía p53. Pensamos que la estocasticidad en el mecanismo molecular que define la entrada en senescencia o bien la evasión de esta en hipoxia puede depender de la eficacia de esta respuesta adaptativa. Sobre esta estocasticidad, tendría una gran influencia el momento de la vida replicativa en que se inicie la exposición a altos niveles de oxígeno y la duración de esta.

Sin embargo, nuestros resultados difieren de los de Parrinello et al. 2003¹⁷³ en que detectamos una reducción de los CKIs en los cultivos de hipoxia que, probablemente, permite la extensión de la vida proliferativa de las células. Si la inmortalización dependiese sólo del daño oxidativo acumulado (ROS producido), como se propone en su estudio, no se explica claramente la inmortalización de un alto porcentaje de los cultivos de MEFs que estuvieron expuestos a hipoxia sólo 1 día tras su explante antes de comenzar el experimento 3T3 en normoxia (**Figura R1**).

Es sabido que la acumulación de daño oxidativo induce senescencia celular. Esta alta producción de ROS se alcanza con el tiempo y debido al metabolismo oxidativo realizado en la mitocondria que se agrava con el cúmulo de mitocondrias disfuncionales en las células senescentes, cuyo potencial de membrana alterado eleva la producción de ROS^{3,68}. ROS provoca daño en el ADN que activa DDR y, a largo plazo, la sobreexpresión de *p21^{Cip1}* y la parada de ciclo celular e inducción de senescencia¹²⁰. Todo esto puede ocurrir en normoxia.

Se ha propuesto que es la disminución de ROS en hipoxia lo que mantiene la capacidad proliferativa de los cultivos primarios inhibiendo su entrada en senescencia¹⁷³. Sin embargo, nuestros datos sugieren que es la regulación de un solo gen, *Tfcp2l1*, lo que promueve la proliferación ilimitada en hipoxia. Así, la activación de *Tfcp2l1* en hipoxia mantendría la expresión de genes relacionados con la pluripotencia promoviendo el mantenimiento de la capacidad proliferativa e inhibiendo la expresión de CKIs. En este sentido, la ausencia de ROS no sería el desencadenante de la inmortalización durante la exposición a hipoxia, aunque podría contribuir en escenarios intermedios donde hemos encontrado variabilidad. Es más, se ha demostrado que ROS puede actuar en la señalización de hipoxia, manteniendo los niveles de HIF y estimulando la malignidad tumoral²⁷². De este modo, en hipoxia se activa y/o no se reduce la expresión de *Tfcp2l1* como adaptación fisiológica a esos niveles bajos de O₂ para mantener la capacidad proliferativa.

Existen múltiples evidencias de que la hipoxia contribuye a mantener el potencial replicativo ilimitado. El embrión se desarrolla en un ambiente hipóxico y tanto las células madre embrionarias como adultas residen en nichos cuyos niveles de oxígeno son incluso menores que los del tejido donde se encuentran^{190,191}. Además, se ha demostrado que las condiciones de hipoxia favorecen el mantenimiento de ESCs y células madre adultas en cultivo al estimular las principales rutas moleculares de pluripotencia y autorrenovación¹⁹². De este modo, es posible pensar que la respuesta adaptativa que produce la hipoxia en cultivo esté relacionada con la adquisición de un perfil de expresión de genes de desdiferenciación y relacionados con las propiedades de células madre capaz de mantener un potencial replicativo ilimitado como el de las células madre.

En nuestro trabajo, al comparar la capacidad proliferativa normal en hipoxia y normoxia de células al inicio del 3T3, y de células senescentes de normoxia y células que se mantenían proliferativas en ese mismo punto en hipoxia, observamos sobreexpresión de un mayor número genes de desdiferenciación/células madre en las muestras de hipoxia. Este grupo de genes contenía genes de células indiferenciadas y genes relacionados con las propiedades de células madre. En cambio, en las muestras de normoxia, predominó la sobreexpresión de genes de diferenciación. En la muestra de células inmortalizadas en hipoxia sólo encontramos sobreexpresión de dos genes y ambos pertenecían a la categoría desdiferenciación/células madre. Estos genes fueron *Rest* y *Tfcp2l1*. Mientras que *Rest* tiene una función pleiotrópica, al estar relacionado con la activación de microRNAs con multitud de dianas transcripcionales en el

genoma^{273,274}, *Tfcp2l1* tiene un papel más específico como regulador de la pluripotencia y la capacidad de autorrenovación en ESCs.

Tfcp2l1 es un factor de transcripción que se expresa en ESCs²⁷⁵ y puede establecer y mantener la pluripotencia, así como promover la autorrenovación en estas células, además de ser capaz de reprogramarlas de un estado “*primed*” a un estado “*naïve*”^{265,266}. Para llevar a cabo estas funciones, *Tfcp2l1* puede unirse a otros factores de transcripción como Oct3/4, Sox2 y Nanog²⁷⁶ o la proteína demetiladora Tet2²⁷⁷ y acudir a promotores y enhancers de genes como *Oct3/4*, *Nanog*, *Esrrb* y *Klf4* para promover su expresión²⁷⁸.

Ante los resultados obtenidos con el *array* de qPCR y la función de *Tfcp2l1* como regulador central de la pluripotencia, estudiamos la expresión de otros genes relacionados con las propiedades de células madre. Observamos sobreexpresión de los factores de Yamanaka *Oct3/4*, *Sox2* y *Klf4*, además de *Nanog* en hipoxia. Esto supone la activación del núcleo de pluripotencia, necesario para el establecimiento y mantenimiento de esta tanto en ESCs como en iPSCs^{192,197,198}. Mientras que los niveles de *c-Myc* disminuían en normoxia al entrar en senescencia²⁷⁹ en hipoxia se mantenían a lo largo del experimento 3T3. *c-Myc* es un protooncogén que regula el ciclo celular y la autorrenovación y tiene un papel importante en el establecimiento de la pluripotencia durante la reprogramación²⁸⁰, por tanto, su expresión en MEFs cultivados en hipoxia puede ser relevante para prolongar la vida proliferativa. En el caso de *Bmi1*, se sabe que es parte del PcG, se activa en hipoxia en CSCs y puede reprimir la expresión del locus *INK4a/Arf* permitiendo la proliferación^{3,99,170}. *Klf2* y *Klf4*, también sobreexpresados en hipoxia, participan en la ruta de señalización de *Tfcp2l1* y tienen función relevante en el establecimiento y mantenimiento de la pluripotencia²⁸¹. Por último, también se encontraron mayores niveles de *Sox9* en hipoxia, el cual activa la proliferación y se expresa en células madre de tejido adulto²⁸². En conjunto, la sobreexpresión de estos genes relacionados con las propiedades de células madre y la reprogramación celular pueden estimular la proliferación de los MEFs en hipoxia.

Por otro lado, la disminución de la expresión de *Tfcp2l1* por shARN contra su ARNm induce la parada proliferativa de las células tanto en hipoxia como en normoxia. Esto sugiere que los niveles de *Tfcp2l1* son esenciales para la proliferación celular, independientemente de las condiciones de oxígeno. En ambos casos, la parada proliferativa fue acompañada de un fenotipo senescente con alta actividad β -galactosidasa ácida y la expresión de *p16^{INK4a}* en los MEFs con bajos niveles de *Tfcp2l1*. Sin embargo, no observamos cambios en la expresión de los factores de Yamanaka y *Nanog* en MEFs con bajo *Tfcp2l1*. Esto podría indicar que la bajada brusca de *Tfcp2l1* influye principalmente los niveles de CKIs produciendo un freno proliferativo brusco con entrada en senescencia celular, a pesar de mantenerse altos los niveles de genes de pluripotencia. Por otro lado, la expresión ectópica de altos niveles de *Tfcp2l1* (más de 100 veces los valores medios obtenidos de manera natural en hipoxia) también condujo a la inducción de senescencia celular en los fibroblastos. La parada proliferativa, acompañada de alta actividad β -galactosidasa ácida y sobreexpresión de los CKIs, *p21^{Cip1}* y *p16^{INK4a}*, se observaron al

sobreexpresar *Tfcp2l1* en ambas condiciones, en normoxia, y también en hipoxia. Estos datos parecen indicar una función dual en la fisiología celular por parte de *Tfcp2l1*. Por un lado, inducir las propiedades relacionadas con las células madre aumentando factores como *Klf4*, *Sox2*, *Nanog*, *Oct3/4* o *c-Myc*, y por otro, regulando los frenos proliferativos a nivel de CKIs.

Existen múltiples evidencias de la regulación de CKIs por parte de los factores que regulan la pluripotencia y las propiedades de las células madre. *Bmi1* es un componente principal del PcG que reprime la expresión del locus *INK4a/ARF* y promueve la autorrenovación en distintos tipos de células madre, así como la proliferación en células tumorales y CSCs²⁸³. Se ha sugerido que *SOX9* puede promover la proliferación de células tumorales mediante la activación de *BMI1* y la inhibición de *p21^{Cip1}*²⁸⁴. Además, se ha demostrado que la expresión de *Sox2* en células de tumor de páncreas promueve la proliferación mediante la inhibición de *p21^{Cip1}* y *p27^{Kip1}*²⁸⁵. Por otro lado, *Oct3/4* puede inhibir *p21^{Cip1}* en ESCs y células madre mesenquimales, permitiendo la autorrenovación de estas células^{286,287}. Aunque no hemos encontrado picos de CHIP-Seq con significación estadística que evidencien la unión de *Tfcp2l1* a regiones reguladoras asociadas a *Bmi1* u *Oct3/4* en el ADN, no podemos descartar la presencia de picos menos notables o la inducción de su expresión de manera indirecta. La activación de *Sox2* y *Sox9* por parte de *Tfcp2l1* en MEFs en hipoxia podría poner en marcha algunos de estos mecanismos, ya sea de manera directa, o indirecta por la activación del núcleo de pluripotencia¹⁹⁸.

Por otro lado, si *Tfcp2l1* regula la proliferación puede que niveles demasiado altos de su expresión impliquen un estímulo hiperproliferativo que la célula detecte como nocivo, de manera similar a lo que ocurre en la inducción de senescencia por oncogenes. Del mismo modo, también cabe pensar que si *Tfcp2l1* regula la señalización de genes relacionados con las propiedades de células madre (entre ellos el núcleo de pluripotencia *Sox2*, *Oct3/4*, *Nanog*, además de *Klf4* y otros genes relevantes) un exceso de su expresión pueda provocar un estrés similar al de la senescencia inducida por reprogramación (RIS) ya que ésta es capaz de activar las principales vías efectoras de la senescencia (*p53*, *p16^{INK4a}*, *p21^{Cip1}*, *DDR* y remodelación del locus *INK4a/Arf*)^{205,206}. Las células en las que indujimos la sobreexpresión de *Tfcp2l1* expresaban niveles más elevados de *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* y *Nanog* que las células control en normoxia. También observamos niveles elevados de los genes *Esrrb*, *Tbx3* y *Klf2* que están descritos como parte de la ruta de señalización de *Tfcp2l1* en ESCs y que contribuyen a la pluripotencia y mantenimiento de la autorrenovación en estas células^{265,266}. Además, observamos un incremento de la expresión de los genes *Hes1* y *Hey1*, que forman parte de la ruta de señalización de Notch y cuya expresión es regulada por *Tfcp2l1* en el desarrollo del tubo colector del riñón²⁶⁷.

Para reproducir en MEFs cultivados exclusivamente en normoxia la extensión de la vida proliferativa observada en hipoxia, reprodujimos los niveles transcripcionales de *Tfcp2l1* alcanzados en 3% O₂. Para alcanzar estos niveles de expresión fisiológicos, empleamos un sistema de expresión inducible sensible a doxiciclina. Sólo una concentración intermedia de doxiciclina (500 ng/μl) logró incrementar la proliferación de los MEFs en normoxia. También observamos un incremento de la expresión de los factores de Yamanaka en los MEFs cultivados

con esta concentración de doxiciclina en los días 3 y 6, que se correspondía con los días de inducción de la expresión de *Tfcp2l1*. También observamos sobreexpresión de *Bmi1* y *Klf2* en estos días. Y de *Sox9* algo más tardía en el tiempo. En cuanto a los componentes de la ruta de señalización de *Tfcp2l1*, pudimos observar un aumento de los niveles de ARNm de *Stat3* en los días 3 y 9, posiblemente por retroalimentación ya que *Stat3* activa la transcripción de *Tfcp2l1* tras la señalización de *Lif* en ESCs²⁶⁵. La expresión de *Tbx3* también aumentó del mismo modo y la de *Gbx2*, aunque más tarde en el tiempo.

En paralelo observamos una disminución de *p16^{INK4a}* a día 15 en MEFs cultivados con 500 ng/μl de doxiciclina. Sin embargo, observamos un ligero aumento de expresión con el tiempo en *p21^{Cip1}*, al igual que *Bax*, indicando la posible existencia de estrés en las células de cultivo y la activación de la vía de señalización de p53. Es posible que este estrés proceda de la selección de los fibroblastos primarios transducidos con los 2 vectores que forman el sistema de expresión inducible por doxiciclina.

En conjunto, nuestros datos sugieren que sólo los niveles de *Tfcp2l1* similares a los fisiológicos producidos por la hipoxia son capaces de facilitar la inmortalización. Como primera evidencia, mostramos que se produce una inducción de senescencia cuando se sobreexpresan niveles altos de *Tfcp2l1* respecto a los promovidos por la hipoxia. También debe tenerse en cuenta la sobreexpresión de genes relacionados con *Tfcp2l1*, que sólo se produjo cuando el cultivo era suplementado con niveles medios de doxiciclina, induciendo niveles moderados de sobreexpresión de *Tfcp2l1* y se confirmó con un número elevado de genes de pluripotencia. Por último, como evidencia adicional, se sabe que sólo cuando los niveles de *Tfcp2l1* son similares a los inducidos por *Lif* en el cultivo de ESCs, se consigue replicar su efecto sobre la pluripotencia y la autorrenovación en estas células²⁶⁵. De una manera similar sucede para el factor de núcleo de pluripotencia *Oct3/4*. En su caso, niveles muy altos, o muy bajos de expresión dan lugar a diferenciación de las ESCs¹⁹². Esto es indicativo de que la expresión de *Tfcp2l1* es fielmente regulada en las células ya que niveles por encima o por debajo de los fisiológicos no promueven la autorrenovación celular. Niveles de *Tfcp2l1* fuera de la ventana fisiológica podrían inducir senescencia celular como consecuencia de su ausencia o bien de efecto de OIS.

Activación de la expresión de *Tfcp2l1* inducida por la hipoxia

En primer lugar, simulamos hipoxia en normoxia utilizando un inhibidor de las PHDs, impidiendo la degradación de las proteínas *Hif1α* y observamos un aumento de *Tfcp2l1*. Esto sugiere que *Tfcp2l1* puede ser diana transcripcional de alguna de las isoformas de *Hif1α*. En estas condiciones, con la inhibición química de las PHDs, observamos un aumento de los niveles de ARNm de *Oct3/4*, *Sox2* y *Klf4* al igual que en MEFs en hipoxia.

Ya que la expresión de *Tfcp2l1* aumenta con la inhibición de las PHDs, utilizamos un mutante de activación constitutiva de *Hif-1α*, que expresamos ectópicamente en MEFs, para ver si la activación era regulada por esta proteína. La expresión de *Hif1α* en normoxia provocó la parada proliferativa de las células. Se sabe que *Hif1α* puede provocar senescencia a través de

p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, la inhibición de CDC25A o el SASP¹⁸³⁻¹⁸⁷. En nuestros experimentos, la parada de la proliferación fue acompañada de un fenotipo senescente con alta actividad β-galactosidasa ácida, cambio morfológico y expresión elevada de p21^{Cip1} y p16^{INK4a}.

Con la expresión ectópica del mutante de activación constitutiva de Hif1α observamos el aumento de *Tfcp2l1* en ARNm y proteína, así como un aumento de expresión de *Oct3/4*, *Klf4* y *c-Myc* coincidiendo con el aumento de *Tfcp2l1*. Además, se produjo la activación de la expresión de algunos de los componentes de la ruta de señalización de Tfcpl21 como *Esrrb*, *Tbx3*, *Gbx2* y *Stat3*. Por tanto, Hif1α activa directa o indirectamente la expresión de *Tfcp2l1* y de genes activados en MEFs cultivados en hipoxia.

Ante estas evidencias, para observar si había un efecto transcripcional directo sobre *Tfcp2l1*, decidimos estudiar la probabilidad de que Hif1α se uniera a una región reguladora cercana a *Tfcp2l1* en el ADN. *Tfcp2l1* comparte un TAD con *Gli2*, otro gen importante en desarrollo. Sin embargo, esta región se divide en 2 subTADs diferentes y *Tfcp2l1* ocupa uno solo de ellos. Localizamos las posibles regiones reguladoras utilizando datos públicos de ChiP-Seq de modificaciones de histona para identificar posibles enhancers y promotores activos²⁶⁰. Por último, estudiamos la presencia de los motivos de unión por los que Hif1α se une al ADN y encontramos una alta probabilidad de unión de Hif1α a un *enhancer* activo perteneciente al subTAD de *Tfcp2l1*.

Por lo tanto, el aumento de la expresión de *Tfcp2l1* en hipoxia es, probablemente, causado por Hif1α y es responsable del incremento de la vida proliferativa y escape de la senescencia en MEFs.

Dianas transcripcionales de Tfcp2l1 en hipoxia

Para conocer las dianas transcripcionales a través de las que Tfcp2l1 contribuye a este efecto fisiológico de la hipoxia, realizamos ChIP-Seq en una muestra senescente de normoxia (Sen) y una muestra de hipoxia que había prolongado su capacidad proliferativa y que consideramos inmortalizada (Inm). De este modo, pudimos comparar la actividad diferencial de Tfcp2l1 como factor de transcripción en los estados proliferativo (Inm) y no proliferativo (Sen) que se alcanzan en las dos condiciones de oxígeno durante nuestro experimento 3T3.

En los resultados de secuenciación encontramos una alta señal común a las dos muestras. Esto podría indicar que Tfcp2l1 tiene una actividad basal sobre dianas comunes en las dos condiciones de oxígeno y en ambos estados proliferativos de las células.

El motivo de unión al ADN descrito para Tfcp2l1 se encuentra enriquecido en el grupo de picos comunes a las dos muestras (Com) y también en la muestra de células inmortalizadas en hipoxia (Inm). Esto sirve como evidencia de la especificidad de los resultados, aunque no excluye la posibilidad de unión al ADN mediante motivos de unión alternativos no descritos o mediante la unión a otros factores de transcripción. Esto es lo que podría ocurrir en la muestra senescente (Sen). Además, encontramos enriquecidos los motivos de unión descritos para Hif1β

y Hif2 α en los picos comunes (Com). Esto podría indicar una posible cooperación entre los factores de respuesta a hipoxia y Tfcp2l1 para unirse a dianas comunes, aunque serían necesarios estudios adicionales sobre esta interacción para generar evidencias al respecto.

Tfcp2l1 se une a un mayor número de secuencias asociadas a genes en la muestra de células inmortalizadas en hipoxia (Inm). Esto coincide con la mayor expresión de *Tfcp2l1* en estas muestras respecto a las de normoxia. De este modo, la hipoxia estimula no solo la expresión de *Tfcp2l1*, sino también su actividad de unión al ADN y, probablemente, su actividad como factor de transcripción. El número de picos específicos de la muestra senescente de normoxia (Sen) fue similar al número de picos comunes (Com) asociados a genes, 236 y 249, respectivamente, 2,5 veces menor que en la muestra inmortalizada de hipoxia (Inm).

Entre los genes a los que se asociaban los picos comunes de ambas muestras (Com) destacan aquellos que codifican para componentes de la ruta de señalización de *Notch* (*Axin2*, *Hes7*, *Hey2*). Esta ruta ha sido descrita como diana transcripcional de Tfcp2l1 en su función de regulación del desarrollo del túbulo colector del riñón²⁶⁷. Además, hemos observado sobreexpresión de algunos de los componentes de esta ruta con la expresión ectópica de *Tfcp2l1*. Por tanto, puede que Tfcp2l1 regule esta ruta de señalización en ambas condiciones de oxígeno, pero que esto no sea suficiente para evadir la senescencia en normoxia.

Hemos señalado como ejemplos representativos de los picos asociados a genes en la muestra senescente (Sen) a dos dianas descritas de Tfcp2l1, *Gbx2* y *Tet2*. En el caso de *Gbx2*, observamos una sobreexpresión en hipoxia en MEFs. Por eso, es necesario tener en cuenta la posible función de Tfcp2l1 también como factor represor de la transcripción que ha sido descrita previamente²⁶⁵. Algo similar puede ocurrir en el caso de *Tet2*, que ha sido descrito previamente como diana transcripcional de Tfcp2l1. Tet2 es una proteína demetiladora que puede unirse a Tfcp2l1 para aumentar la accesibilidad de los promotores de *Nanog* y *Klf4*, promoviendo la pluripotencia y facilitando la reprogramación²⁷⁷. Es posible que Tfcp2l1 actúe como represor en normoxia, disminuyendo la expresión de Tet2 y evitando la accesibilidad a los promotores de estos genes que se expresan menos en normoxia que en hipoxia.

En el caso de los picos mostrados de la muestra de hipoxia, tienen especial relevancia como diana de Tfcp2l1 los genes de proliferación. *Tbx6* tiene función en desarrollo y es similar en función y estructura a *Tbx3*, que forma parte de la ruta de señalización de *Tfcp2l1* que mantiene la autorrenovación y la pluripotencia en ESCs. Además, Tbx6 puede actuar junto con Sox2 para unirse a *enhancers* en el desarrollo neural²⁸⁸. Sox5 forma parte de la familia Sox y está involucrado en el desarrollo del embrión, además está descrito que puede unirse a Sox9 para actuar en conjunto sobre regiones reguladoras²⁸⁹. En el caso de *Il2-Il21*, sería necesario un estudio en más profundidad de la región reguladora que ocupa el pico de Tfcp2l1 para determinar si puede encargarse de la regulación de una de las 2 interleuquinas o de ambas al ocupar este sitio del genoma.

Al estudiar los términos GO (*Biological Process*) en ambas muestras encontramos gran variedad de términos en los resultados. El enriquecimiento en estos términos fue mucho más bajo en la muestra senescente (Sen). Sin embargo, fue mucho más significativo en la muestra inmortalizada en hipoxia (Inm). Aunque en ambos casos encontramos procesos tales como “Desarrollo y diferenciación”, “Metabolismo” o “Señalización” representados entre los términos ontológicos, estos hacían referencias a procesos muy diversos difíciles de relacionar entre sí en cada categoría. Sin embargo, encontramos entre los términos más enriquecidos de la muestra inmortalizada en hipoxia (Inm) 3 términos referentes a la regulación de la proliferación y cuyo “*gene ratio*” era alto. Al englobarlos en una categoría única a la que denominamos “proliferación” sumaban 46 genes, suponiendo casi la mitad (45,5%) de los genes estudiados en los 20 términos más representativos.

La unión de *Tfcp2l1* a estos genes implicados en la regulación de la proliferación es específica de la muestra inmortalizada (Inm) como pudimos comprobar en el perfil promedio de unión de *Tfcp2l1* a estos genes. Todo esto sugiere que la hipoxia no sólo aumenta la expresión de *Tfcp2l1*, sino que también promueve la proliferación a través de la unión de *Tfcp2l1* a este conjunto de genes. Entre los 46 genes asociados a estos términos ontológicos destacamos *Il1b*, *Il2*, *Klf10*, *Pdgfra*, *Rgcc*, *Sox2*, *Sox9*, *Sox11*, *Tdgf1* y *Tgfa*. La regulación transcripcional de estos genes por parte de *Tfcp2l1* explica su función en el incremento proliferativo de hipoxia y el aumento de la vida proliferativa, así como la adquisición de un perfil de expresión de genes relacionados con las propiedades de células madre.

Las muestras de hipoxia de nuestro experimento 3T3 sobreexpresan *Tgfa*, *Sox2* y *Sox9* en hipoxia al inicio y al final del experimento 3T3. Esto junto a la validación de la unión de *Tfcp2l1* a los sitios del ADN donde se localizan sus picos asociados, sugiere que *Tfcp2l1* promueve su transcripción de forma directa. Esto explica, funcionalmente, el papel causal de *Tfcp2l1* en el efecto fisiológico de la hipoxia en MEFs. *Tfcp2l1* incrementa la expresión de *Tgfa*, que es un factor de crecimiento que activa las rutas de proliferación en la célula²⁹⁰. Además, *Tfcp2l1* aumenta la expresión de *Sox2* que forma parte del núcleo de pluripotencia¹⁹⁸ y de *Sox9* que participa en el mantenimiento de la pluripotencia al expresarse en células madre de tejido adulto²⁸².

***Tfcp2l1* en reprogramación celular**

Tfcp2l1 es el responsable del incremento de la proliferación en MEFs en hipoxia que produce un aumento de la expresión de genes relacionados con las propiedades de células madre y va acompañado de la disminución de la expresión de CKIs. Estos son eventos necesarios para la reprogramación celular ya que con ella se consigue la pluripotencia y la senescencia es una barrera que puede impedirlo^{198,205,206}. De este modo, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que *Tfcp2l1* puede ser responsable del efecto de aumento de la eficiencia de la reprogramación descrito previamente en hipoxia²⁰¹.

La expresión ectópica de *Tfcp2l1* incrementa el número de colonias iPSCs *Nanog*-GFP⁺ en MEFs-*Nanog*-GFP transducidos con los 4 factores de Yamanaka, al igual que lo hace la exposición a hipoxia en estas células. Además, la expresión de shARN contra el ARNm de *Tfcp2l1* consigue disminuir el número de colonias iPSCs *Nanog*-GFP⁺. Esto sucede tanto en normoxia como en hipoxia. Sin embargo, al producirse un mayor número de colonias iPSCs en hipoxia, los MEFs-4F-Sh reducen su número de colonias hasta ser similares a los del control de normoxia. Con ello, demostramos que la expresión de *Tfcp2l1* es necesaria para el incremento de eficiencia en la generación de iPSCs. Este efecto de shARNs contra *Tfcp2l1* es similar al observado en MEFs durante el experimento 3T3 en normoxia e hipoxia. La expresión de *Tfcp2l1*, necesaria para la proliferación, incrementa la capacidad de reprogramación celular.

Mediante el meta-análisis de datos generados por el laboratorio del Dr. Shinya Yamanaka, pudimos comprobar que la expresión de *Tfcp2l1* y *Nanog* aumentaban en hipoxia al 5% y al 1% y que los CKIs, *p16^{INK4a}* y *p21^{Cip1}*, disminuían en estas condiciones, al igual que en nuestro experimento de extensión de vida proliferativa en hipoxia. Esto supone una evidencia indirecta del incremento de expresión de *Tfcp2l1* en hipoxia en el contexto de la reprogramación, en el que es necesario evitar la senescencia, al igual que en el proceso de immortalización.

Obtuvimos evidencias adicionales de la expresión de *Tfcp2l1* en reprogramación cuando analizamos su expresión en estadios intermedios del proceso de reprogramación. En estas muestras, la expresión de *Tfcp2l1* aumentaba con el tiempo al igual que la expresión de *Nanog*, lo que revela su importancia en el establecimiento de la pluripotencia. Pudimos comparar también esta expresión con la de mESCs, en la que ambos genes tenían una expresión similar a la de iPSCs. Por eso, es posible que *Tfcp2l1* sea relevante en el establecimiento y mantenimiento de la pluripotencia en iPSCs, al igual que en mESCs^{265,266}, además de favorecer la proliferación.

Del mismo modo que en el análisis anterior, comprobamos la disminución de expresión de *p21^{Cip1}* y *p16^{INK4a}* durante la reprogramación, cuyos niveles finales coincidían con los de mESCs. De nuevo, los niveles de *Tfcp2l1* coinciden con niveles bajos de los CKIs. No sucede lo mismo en este caso con la expresión de *Tp53*, que es mayor en iPSCs y en mESCs que en los estadios intermedios de la reprogramación y en células somáticas. Esto sugiere que la expresión de *Tfcp2l1* no es incompatible con la expresión transcripcional de *Tp53*.

En resumen, nuestro trabajo muestra cómo la hipoxia, a través de la activación transcripcional de *Tfcp2l1*, consigue aumentar la vida replicativa de MEFs. Esto se produce a través de la unión de *Tfcp2l1* al ADN en regiones reguladoras de genes implicados en la proliferación como *Sox2*, *Sox9* y *Tgfa*, que también incrementan su expresión en hipoxia. Algunos de estos genes están relacionados con las propiedades de células madre o son genes implicados en pluripotencia. De este modo, *Tfcp2l1* también es responsable del aumento de eficiencia de la reprogramación celular en hipoxia. Los niveles de expresión de *Tfcp2l1* están finamente regulados en la célula, ya que un incremento excesivo de estos provoca la entrada en senescencia de un modo similar a como se produce en OIS. Así, los niveles fisiológicos de *Tfcp2l1* alcanzados en hipoxia son suficientes para promover la proliferación y la expresión de

genes relacionados con las propiedades de células madre sin suponer un estrés de hiperproliferación. Este incremento de la expresión es llevado a cabo, muy probablemente, por la unión de Hif1 α a un *enhancer* cercano a *Tfcp2l1* en el ADN. Todo esto supone que la activación de *Tfcp2l1* por la hipoxia podría ser relevante en la inmortalización previa a la transformación maligna, facilitando la tumorigénesis. Además, en el microambiente tumoral, que es hipóxico, la expresión de *Tfcp2l1* podría favorecer la aparición de CSCs al favorecer la pluripotencia y, por tanto, la desdiferenciación celular.

CONCLUSIONES

1. La vida proliferativa de MEFs cultivados exclusivamente en hipoxia (3% O₂) se prolonga de manera ilimitada, mientras que aquellos cultivados en normoxia (20% O₂) entran en senescencia replicativa.
2. La hipoxia provoca la evasión de la senescencia en MEFs disminuyendo, en comparación con los MEFs de normoxia, la actividad β-galactosidasa ácida, la expresión de *p21^{Cip1}*, *p15^{INK4b}* y *p16^{INK4a}*, y produciendo signos de estrés proliferativo con un aumento de p-H2AX (Ser139) y p-p53 (Ser15) que no conducen a la parada proliferativa vía p53.
3. La hipoxia promueve en MEFs la expresión de genes de dediferenciación y genes relacionados con las propiedades de células madre entre los que destacan *Tfcp2l1*, *Oct3/4*, *Sox2*, *Sox9*, *Klf4*, *Klf2*, *cMyc* y *Bmi1*.
4. La expresión ectópica a niveles supra fisiológicos o la reducción de los niveles de expresión de *Tfcp2l1* provoca la entrada en senescencia de MEFs en cultivos en normoxia e hipoxia.
5. Sólo la expresión ectópica de *Tfcp2l1* a niveles similares a los fisiológicos inducidos por la hipoxia logra un incremento de la vida proliferativa de MEFs en normoxia con variaciones en la expresión de genes semejantes a las provocadas por la hipoxia.
6. La activación constitutiva de Hif1α en normoxia induce, directa o indirectamente, la expresión de *Tfcp2l1*.
7. La hipoxia promueve la actividad de Tfcp2l1 como factor de transcripción, que se une a un mayor número de zonas del ADN asociadas a genes en MEFs inmortalizados en hipoxia en comparación con MEFs senescentes de normoxia.
8. En MEFs inmortalizados por la hipoxia, Tfcp2l1 se une a zonas del ADN asociadas a genes reguladores de la proliferación que, en muchos casos, también están relacionados con las propiedades de células madre y que se sobreexpresan en hipoxia, como son *Sox2*, *Sox9* y *Tgfa*.
9. La expresión de *Tfcp2l1* aumenta la reprogramación celular y la disminución de su expresión mediante shARNs específicos reduce el incremento de eficiencia de reprogramación causado por la hipoxia.

CONCLUSIONS

1. The lifespan of MEFs can be extended indefinitely when they are cultured only under hypoxic conditions (3% O₂). However, MEFs cultured only under normoxic conditions (20% O₂) undergo replicative senescence.
2. Hypoxia induces senescence bypass in MEFs with a decrease in acid β-galactosidase activity and in the expression of *p21^{Cip1}*, *p15^{INK4b}* and *p16^{INK4a}* compared to MEFs cultured in normoxia. This produces proliferative stress with increased levels of p-H2AX (Ser139) and p-p53 (Ser15), but without p53-proliferative arrest.
3. Hypoxia promotes in MEFs the expression of dedifferentiation and stem-related genes like *Tfcp2l1*, *Oct3/4*, *Sox2*, *Sox9*, *Klf4*, *Klf2*, *c-Myc* and *Bmi1*.
4. The ectopic expression of supraphysiological levels or the downregulation of the expression levels of *Tfcp2l1* induces senescence in MEFs cultured under hypoxic and normoxic conditions.
5. Only the ectopic induction of expression levels of *Tfcp2l1* similar to those promoted by hypoxia can produce an increase in the lifespan of MEFs in normoxia with changes in gene expression similar to those induced by hypoxia.
6. The constitutive activation of Hif1α in normoxia induces, either directly or indirectly, the expression of *Tfcp2l1*.
7. Hypoxia promotes the activity of Tfcp2l1 as a transcription factor, which binds to a higher number of DNA regions associated to genes in MEFs immortalized in hypoxia compared to senescent MEFs cultured in normoxia.
8. In MEFs immortalized in hypoxia, Tfcp2l1 binds to DNA regions associated with genes involved in the regulation of proliferation which, in many cases, are also related to stem cells properties, like *Sox2*, *Sox9* or *Tgfa*. These genes are overexpressed in hypoxia.
9. The expression of *Tfcp2l1* increases cellular reprogramming and its downregulation by specific shRNAs reduces the increase of reprogramming efficiency caused by hypoxia.

BIBLIOGRAFÍA

1. He, S. & Sharpless, N. E. Senescence in Health and Disease. *Cell* **169**, 1000–1011 (2017).
2. Lee, S. & Schmitt, C. A. The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat. Cell Biol.* **21**, 94–101 (2019).
3. Herranz, N. & Gil, J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J. Clin. Invest.* **128**, 1238–1246 (2018).
4. Hernandez-Segura, A., Nehme, J. & Demaria, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* **28**, 436–453 (2018).
5. Chandek, C. & Mooi, W. J. Oncogene-induced cellular senescence. *Advances in Anatomic Pathology* (2010) doi:10.1097/PAP.0b013e3181c66f4e.
6. Collado, M. & Serrano, M. Senescence in tumours: Evidence from mice and humans. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 51–57 (2010).
7. Rhinn, M., Ritschka, B. & Keyes, W. M. Cellular senescence in development, regeneration and disease. *Dev.* (2019) doi:10.1242/dev.151837.
8. van Deursen, J. M. Senolytic therapies for healthy longevity. *Science* (2019) doi:10.1126/science.aaw1299.
9. Malumbres, M. & Barbacid, M. To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 222–231 (2001).
10. Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 153–166 (2009).
11. Sage, J., Miller, A. L., Pérez-Mancera, P. A., Wysocki, J. M. & Jacks, T. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* (2003) doi:10.1038/nature01764.
12. Beauséjour, C. M. *et al.* Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* (2003) doi:10.1093/emboj/cdg417.
13. Yu, Y. *et al.* Targeting the Senescence-Overriding Cooperative Activity of Structurally Unrelated H3K9 Demethylases in Melanoma. *Cancer Cell* (2018) doi:10.1016/j.ccell.2018.01.002.
14. Saleh, T., Tyutyunyk-Massey, L. & Gewirtz, D. A. Tumor cell escape from therapy-induced senescence as a model of disease recurrence after dormancy. *Cancer Res.* (2019) doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3437.
15. Ameri, K. & Maltepe, E. HIGD1A-mediated dormancy and tumor survival. *Molecular and Cellular Oncology* (2015) doi:10.1080/23723556.2015.1030537.

Bibliografía

16. Axelson, H., Fredlund, E., Ovenberger, M., Landberg, G. & Pålman, S. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells - A mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Seminars in Cell and Developmental Biology* (2005) doi:10.1016/j.semcdb.2005.03.007.
17. Kobayashi, A. *et al.* Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. *J. Exp. Med.* (2011) doi:10.1084/jem.20110840.
18. Wang, N. *et al.* Mitotic quiescence, but not unique 'stemness,' marks the phenotype of bone metastasis-initiating cells in prostate cancer. *FASEB J.* (2015) doi:10.1096/fj.14-266379.
19. Hofstetter, C. P. *et al.* Protein phosphatase 2A mediates dormancy of glioblastoma multiforme-derived tumor stem-like cells during hypoxia. *PLoS One* (2012) doi:10.1371/journal.pone.0030059.
20. Moll, U. M. & Zaika, A. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Letters* (2001) doi:10.1016/S0014-5793(01)02284-0.
21. Yosef, R. *et al.* Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat. Commun.* (2016) doi:10.1038/ncomms11190.
22. Yosef, R. *et al.* p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling. *EMBO J.* (2017) doi:10.15252/embj.201695553.
23. Rodier, F. *et al.* DNA-SCARS: Distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J. Cell Sci.* (2011) doi:10.1242/jcs.071340.
24. Carnero, A. Markers of cellular senescence. *Methods Mol. Biol.* (2013) doi:10.1007/978-1-62703-239-1_4.
25. Campisi, J. & D'Adda Di Fagagna, F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 729–740 (2007).
26. Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M. & Narita, M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes and Development* (2014) doi:10.1101/gad.235184.113.
27. Chandra, T. *et al.* Independence of Repressive Histone Marks and Chromatin Compaction during Senescent Heterochromatic Layer Formation. *Mol. Cell* (2012) doi:10.1016/j.molcel.2012.06.010.
28. Swanson, E. C., Manning, B., Zhang, H. & Lawrence, J. B. Higher-order unfolding of satellite heterochromatin is a consistent and early event in cell senescence. *J. Cell Biol.* (2013) doi:10.1083/jcb.201306073.

29. Cheng, L. Q., Zhang, Z. Q., Chen, H. Z. & Liu, D. P. Epigenetic regulation in cell senescence. *Journal of Molecular Medicine* (2017) doi:10.1007/s00109-017-1581-x.
30. Koch, C. M. *et al.* Pluripotent stem cells escape from senescence-associated DNA methylation changes. *Genome Res.* (2013) doi:10.1101/gr.141945.112.
31. Sakaki, M. *et al.* Potential roles of DNA methylation in the initiation and establishment of replicative senescence revealed by array-based methylome and transcriptome analyses. *PLoS One* (2017) doi:10.1371/journal.pone.0171431.
32. Bielak-Zmijewska, A. *et al.* A comparison of replicative senescence and doxorubicin-induced premature senescence of vascular smooth muscle cells isolated from human aorta. *Biogerontology* (2014) doi:10.1007/s10522-013-9477-9.
33. Bannister, A. J. & Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* (2011) doi:10.1038/cr.2011.22.
34. Chen, H. *et al.* MacroH2A1 and ATM Play Opposing Roles in Paracrine Senescence and the Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Mol. Cell* (2015) doi:10.1016/j.molcel.2015.07.011.
35. Ohanna, M. *et al.* Senescent cells develop a parg-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome (PNAS). *Genes Dev.* (2011) doi:10.1101/gad.625811.
36. Khursheed, M. *et al.* ARID1B, a member of the human SWI/SNF chromatin remodeling complex, exhibits tumour-suppressor activities in pancreatic cancer cell lines. *Br. J. Cancer* (2013) doi:10.1038/bjc.2013.200.
37. Tordella, L. *et al.* SWI/SNF regulates a transcriptional program that induces senescence to prevent liver cancer. *Genes Dev.* (2016) doi:10.1101/gad.286112.116.
38. Sarnowska, E. *et al.* The Role of SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes in Hormone Crosstalk. *Trends in Plant Science* (2016) doi:10.1016/j.tplants.2016.01.017.
39. Kwon, S. M., Hong, S. M., Lee, Y. K., Min, S. & Yoon, G. Metabolic features and regulation in cell senescence. *BMB Rep.* **52**, 5–12 (2019).
40. Nacarelli, T. & Sell, C. Targeting metabolism in cellular senescence, a role for intervention. *Mol. Cell. Endocrinol.* (2017) doi:10.1016/j.mce.2016.08.049.
41. Birsoy, K. *et al.* An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell* (2015) doi:10.1016/j.cell.2015.07.016.
42. Sullivan, L. B. *et al.* Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell* (2015) doi:10.1016/j.cell.2015.07.017.
43. Aird, K. M. & Zhang, R. Nucleotide metabolism, oncogene-induced senescence and

- cancer. *Cancer Letters* (2015) doi:10.1016/j.canlet.2014.01.017.
44. Birch, J. & Passos, J. F. Targeting the SASP to combat ageing: Mitochondria as possible intracellular allies? *BioEssays* (2017) doi:10.1002/bies.201600235.
45. Gorgoulis, V. *et al.* Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* **179**, 813–827 (2019).
46. Kim, Y. M. *et al.* Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP)-1-mediated lipogenesis is involved in cell senescence. *J. Biol. Chem.* (2010) doi:10.1074/jbc.M110.120386.
47. Stallone, G., Infante, B., Prisciandaro, C. & Grandaliano, G. MTOR and aging: An old fashioned dress. *International Journal of Molecular Sciences* (2019) doi:10.3390/ijms20112774.
48. Blagosklonny, M. V. Geroconversion: Irreversible step to cellular senescence. *Cell Cycle* (2014) doi:10.4161/15384101.2014.985507.
49. McHugh, D. & Gil, J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J. Cell Biol.* **217**, 65–77 (2018).
50. Acosta, J. C. *et al.* Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell* (2008) doi:10.1016/j.cell.2008.03.038.
51. Acosta, J. C. *et al.* A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol.* (2013) doi:10.1038/ncb2784.
52. Kuilman, T. *et al.* Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell* (2008) doi:10.1016/j.cell.2008.03.039.
53. Kang, T. W. *et al.* Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* (2011) doi:10.1038/nature10599.
54. Coppe, J. P., Kauser, K., Campisi, J. & Beauséjour, C. M. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem.* (2006) doi:10.1074/jbc.M603307200.
55. Di Mitri, D. *et al.* Tumour-infiltrating Gr-1 + myeloid cells antagonize senescence in cancer. *Nature* (2014) doi:10.1038/nature13638.
56. Eggert, T. *et al.* Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell* (2016) doi:10.1016/j.ccell.2016.09.003.
57. Laberge, R. M. *et al.* MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat. Cell Biol.* (2015) doi:10.1038/ncb3195.

58. Carroll, B. & Korolchuk, V. I. Dysregulation of mTORC1/autophagy axis in senescence. *Aging* (2017) doi:10.18632/aging.101277.
59. Narita, M. *et al.* Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science* (80-). (2011) doi:10.1126/science.1205407.
60. Dou, Z. *et al.* Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* (2015) doi:10.1038/nature15548.
61. Slobodnyuk, K. *et al.* Autophagy-induced senescence is regulated by p38 α signaling. *Cell Death Dis.* (2019) doi:10.1038/s41419-019-1607-0.
62. Brusker, I., Rhodes, J. M. & Goldman, R. β -Galactosidase—An indicator of the maturational stage of mouse and human mononuclear phagocytes. *J. Cell. Physiol.* (1982) doi:10.1002/jcp.1041120312.
63. Kopp, H. G., Hooper, A. T., Shmelkov, S. V. & Rafii, S. β -galactosidase staining on bone marrow. The osteoclast pitfall. *Histol. Histopathol.* (2007) doi:10.14670/HH-22.971.
64. Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1995) doi:10.1073/pnas.92.20.9363.
65. Demaria, M. *et al.* An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell* (2014) doi:10.1016/j.devcel.2014.11.012.
66. Muñoz-Espín, D. *et al.* Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* (2013) doi:10.1016/j.cell.2013.10.019.
67. Storer, M. *et al.* Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* (2013) doi:10.1016/j.cell.2013.10.041.
68. Chapman, J., Fielder, E. & Passos, J. F. Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship. *FEBS Letters* (2019) doi:10.1002/1873-3468.13498.
69. Dasari, A., Bartholomew, J. N., Volonte, D. & Galbiati, F. Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements. *Cancer Res.* (2006) doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1236.
70. Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M. & Campisi, J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol. Biol. Cell* (2012) doi:10.1091/mbc.E11-10-0884.
71. Wang, A. S., Ong, P. F., Chojnowski, A., Clavel, C. & Dreesen, O. Loss of lamin B1 is a biomarker to quantify cellular senescence in photoaged skin. *Sci. Rep.* (2017) doi:10.1038/s41598-017-15901-9.
72. Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585–621 (1961).

Bibliografía

73. de Magalhães, J. P. & Passos, J. F. Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* (2018) doi:10.1016/j.mad.2017.07.001.
74. Blasco, M. A. Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 611–622 (2005).
75. Martínez, P. & Blasco, M. A. Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies. **216**, 875–887 (2017).
76. Olovnikov, A. M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* (1973) doi:10.1016/0022-5193(73)90198-7.
77. Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* (1990) doi:10.1038/345458a0.
78. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* (1985) doi:10.1016/0092-8674(85)90170-9.
79. Bodnar, A. G. *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* (80-.). (1998) doi:10.1126/science.279.5349.349.
80. Blasco, M. A. *et al.* Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* (1997) doi:10.1016/S0092-8674(01)80006-4.
81. Rudolph, K. L. *et al.* Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* (1999) doi:10.1016/S0092-8674(00)80580-2.
82. Jaskelioff, M. *et al.* Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature* (2011) doi:10.1038/nature09603.
83. Campisi, J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 685–705 (2013).
84. Itahana, K., Campisi, J. & Dimri, G. P. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* **5**, 1–10 (2004).
85. Calado, R. T. & Dumitriu, B. Telomere dynamics in mice and humans. *Semin. Hematol.* (2013) doi:10.1053/j.seminhematol.2013.03.030.
86. Sharpless, N. E. & Sherr, C. J. Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer* (2015) doi:10.1038/nrc3960.
87. Rodier, F. & Campisi, J. Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* **192**, 547–556 (2011).
88. Calcinotto, A. *et al.* Cellular senescence: Aging, cancer, and injury. *Physiol. Rev.* **99**,

- 1047–1078 (2019).
89. D'Adda Di Fagagna, F. Living on a break: Cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 512–522 (2008).
 90. Zhang, Y., Xiong, Y. & Yarbrough, W. G. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* (1998) doi:10.1016/S0092-8674(00)81401-4.
 91. Rufini, A., Tucci, P., Celardo, I. & Melino, G. Senescence and aging: The critical roles of p53. *Oncogene* (2013) doi:10.1038/onc.2012.640.
 92. Pantoja, C. & Serrano, M. Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* (1999) doi:10.1038/sj.onc.1202880.
 93. Martín-Caballero, J., Serrano, M., Flores, J. M. & García-Palencia, P. Tumor susceptibility of p21waf1/cip1-deficient mice. *Cancer Res.* (2001).
 94. Quereda, V., Porlan, E., Canámero, M., Dubus, P. & Malumbres, M. An essential role for Ink4 and Cip/Kip cell-cycle inhibitors in preventing replicative stress. *Cell Death Differ.* **23**, 430–441 (2016).
 95. Kim, W. Y. & Sharpless, N. E. The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. *Cell* **127**, 265–275 (2006).
 96. Classon, M. & Harlow, E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nature Reviews Cancer* (2002) doi:10.1038/nrc950.
 97. Beroukhi, R. *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* (2010) doi:10.1038/nature08822.
 98. Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B. & Herman, J. G. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* (2001).
 99. LaPak, K. M. & Burd, C. E. The molecular balancing act of p16ink4a in cancer and aging. *Molecular Cancer Research* (2014) doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0350.
 100. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell* (1997) doi:10.1016/S0092-8674(00)81902-9.
 101. Lin, A. W. *et al.* Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* (1998) doi:10.1101/gad.12.19.3008.
 102. Di Micco, R. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* (2006) doi:10.1038/nature05327.

Bibliografía

103. Bartkova, J. *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* (2006) doi:10.1038/nature05268.
104. Halazonetis, T. D., Gorgoulis, V. G. & Bartek, J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* (2008) doi:10.1126/science.1140735.
105. Macheret, M. & Halazonetis, T. D. Intragenic origins due to short G1 phases underlie oncogene-induced DNA replication stress. *Nature* (2018) doi:10.1038/nature25507.
106. Michaloglou, C. *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* (2005) doi:10.1038/nature03890.
107. Gray-Schopfer, V. C. *et al.* Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: A role for p16? *Br. J. Cancer* (2006) doi:10.1038/sj.bjc.6603283.
108. Dankort, D. *et al.* BrafV600E cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat. Genet.* (2009) doi:10.1038/ng.356.
109. Dhomen, N. *et al.* Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice. *Cancer Cell* (2009) doi:10.1016/j.ccr.2009.02.022.
110. Collado, M. *et al.* Senescence in premalignant tumours. *Nature* (2005) doi:10.1038/436642a.
111. Chen, Z. *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* (2005) doi:10.1038/nature03918.
112. Braig, M. *et al.* Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* (2005) doi:10.1038/nature03841.
113. Denchi, E. L., Attwooll, C., Pasini, D. & Helin, K. Deregulated E2F Activity Induces Hyperplasia and Senescence-Like Features in the Mouse Pituitary Gland. *Mol. Cell. Biol.* (2005) doi:10.1128/mcb.25.7.2660-2672.2005.
114. Mooi, W. J. Oncogene-induced cellular senescence: Causal factor in the growth arrest of pituitary microadenomas? in *Hormone Research* (2009). doi:10.1159/000192442.
115. HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* (1956) doi:10.1093/geronj/11.3.298.
116. Sies, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology* (2015) doi:10.1016/j.redox.2015.01.002.
117. Höhn, A. *et al.* Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biol.* **11**, 482–501 (2017).
118. Cadet, J. & Richard Wagner, J. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2013)

- doi:10.1101/cshperspect.a012559.
119. Von Zglinicki, T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences* (2002) doi:10.1016/S0968-0004(02)02110-2.
 120. Passos, J. F. *et al.* Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol. Syst. Biol.* (2010) doi:10.1038/msb.2010.5.
 121. Höhn, A., Jung, T. & Grune, T. Pathophysiological importance of aggregated damaged proteins. *Free Radical Biology and Medicine* (2014) doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.028.
 122. Zhang, Y. G. *et al.* Featured Article: Accelerated decline of physical strength in peroxiredoxin-3 knockout mice. *Exp. Biol. Med.* (2016) doi:10.1177/1535370216642039.
 123. Nyström, T., Yang, J. & Molin, M. Peroxiredoxins, gerontogenes linking aging to genome instability and cancer. *Genes and Development* (2012) doi:10.1101/gad.200006.112.
 124. Picot, C. R., Perichon, M., Cintrat, J. C., Friguet, B. & Petropoulos, I. The peptide methionine sulfoxide reductases, MsrA and MsrB (hCBS-1), are downregulated during replicative senescence of human WI-38 fibroblasts. *FEBS Lett.* (2004) doi:10.1016/S0014-5793(03)01530-8.
 125. Liao, N. *et al.* Antioxidants inhibit cell senescence and preserve stemness of adipose tissue-derived stem cells by reducing ROS generation during long-term in vitro expansion. *Stem Cell Res. Ther.* (2019) doi:10.1186/s13287-019-1404-9.
 126. Kornienko, J. S. *et al.* High doses of synthetic antioxidants induce premature senescence in cultivated mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* (2019) doi:10.1038/s41598-018-37972-y.
 127. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194 (2013).
 128. Van Remmen, H. *et al.* Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol. Genomics* (2004) doi:10.1152/physiolgenomics.00122.2003.
 129. Pérez, V. I. *et al.* The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell* (2009) doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00449.x.
 130. Hekimi, S., Lapointe, J. & Wen, Y. Taking a 'good' look at free radicals in the aging process. *Trends in Cell Biology* (2011) doi:10.1016/j.tcb.2011.06.008.
 131. Miłucha-Pietrasik, J., Niklas, A., Uruski, P., Tykarski, A. & Książek, K. Mechanisms and significance of therapy-induced and spontaneous senescence of cancer cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2020) doi:10.1007/s00018-019-03261-8.

Bibliografía

132. Chang, B. D. *et al.* A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res.* (1999).
133. Schmitt, C. A. *et al.* A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* (2002) doi:10.1016/S0092-8674(02)00734-1.
134. te Poele, R. H., Okorokov, A. L., Jardine, L., Cummings, J. & Joel, S. P. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* (2002).
135. Roninson, I. B. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Research* (2003).
136. Jones, K. R. *et al.* p53-dependent accelerated senescence induced by ionizing radiation in breast tumour cells. *Int. J. Radiat. Biol.* (2005) doi:10.1080/09553000500168549.
137. Mirzayans, R., Scott, A., Cameron, M. & Murray, D. Induction of Accelerated Senescence by γ Radiation in Human Solid Tumor-Derived Cell Lines Expressing Wild-Type TP53. *Radiat. Res.* (2005) doi:10.1667/rr3280.
138. Li, M., You, L., Xue, J. & Lu, Y. Ionizing radiation-induced cellular senescence in normal, non-transformed cells and the involved DNA damage response: A mini review. *Frontiers in Pharmacology* (2018) doi:10.3389/fphar.2018.00522.
139. Shao, L. *et al.* Hematopoietic stem cell senescence and cancer therapy-induced long-term bone marrow injury. *Transl. Cancer Res.* (2013) doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2013.10.05.
140. Ewald, J. A., Desotelle, J. A., Wilding, G. & Jarrard, D. F. Therapy-induced senescence in cancer. *Journal of the National Cancer Institute* (2010) doi:10.1093/jnci/djq364.
141. Petrova, N. V., Velichko, A. K., Razin, S. V. & Kantidze, O. L. Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell* (2016) doi:10.1111/accel.12518.
142. Di, X. *et al.* A chemotherapy-associated senescence bystander effect in breast cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* (2008) doi:10.4161/cbt.7.6.5861.
143. Coppé, J. P. *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* (2008) doi:10.1371/journal.pbio.0060301.
144. Krizhanovsky, V. *et al.* Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell* (2008) doi:10.1016/j.cell.2008.06.049.
145. Jun, J. II & Lau, L. F. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat. Cell Biol.* (2010) doi:10.1038/ncb2070.
146. Zhu, F. *et al.* Senescent cardiac fibroblast is critical for cardiac fibrosis after myocardial infarction. *PLoS One* (2013) doi:10.1371/journal.pone.0074535.

147. Schafer, M. J. *et al.* Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat. Commun.* (2017) doi:10.1038/ncomms14532.
148. Demaria, M. *et al.* Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer Discov.* (2017) doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0241.
149. Franceschi, C., Garagnani, P., Parini, P., Giuliani, C. & Santoro, A. Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nature Reviews Endocrinology* (2018) doi:10.1038/s41574-018-0059-4.
150. Krishnamurthy, J. *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* (2004) doi:10.1172/JCI22475.
151. Liu, Y. *et al.* Expression of p16INK4a in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell* (2009) doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00489.x.
152. Krishnamurthy, J. *et al.* p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* (2006) doi:10.1038/nature05092.
153. Molofsky, A. V. *et al.* Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* (2006) doi:10.1038/nature05091.
154. Janzen, V. *et al.* Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 INK4a. *Nature* (2006) doi:10.1038/nature05159.
155. Sousa-Victor, P. *et al.* Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* (2014) doi:10.1038/nature13013.
156. Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* (2016) doi:10.1038/nature16932.
157. Vaupel, P., Kallinowski, F. & Okunieff, P. Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review. *Cancer Res.* **49**, 6449–6465 (1989).
158. Pouyssegur, J. & López-Barneo, J. Hypoxia in health and disease. *Mol. Aspects Med.* **47–48**, 1–2 (2016).
159. Lopez-Barneo, J. Oxygen-sensing by ion channels and the regulation of cellular functions. *Trends in Neurosciences* (1996) doi:10.1016/S0166-2236(96)10050-3.
160. Weir, E. K., López-Barneo, J., Buckler, K. J. & Archer, S. L. Mechanisms of disease: Acute oxygen-sensing mechanisms. *New England Journal of Medicine* (2005) doi:10.1056/NEJMra050002.
161. López-Barneo, J. & Simon, M. C. Cellular adaptation to oxygen deficiency beyond the Nobel award. *Nature Communications* (2020) doi:10.1038/s41467-020-14469-9.

Bibliografía

162. Lee, J. W., Ko, J., Ju, C. & Eltzschig, H. K. Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. *Exp. Mol. Med.* **51**, 1–13 (2019).
163. Jewell, U. R. *et al.* Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.* (2001) doi:10.1096/fj.00-0732fje.
164. Fandrey, J., Gorr, T. A. & Gassmann, M. Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovascular Research* (2006) doi:10.1016/j.cardiores.2006.05.005.
165. Majmundar, A. J., Wong, W. J. & Simon, M. C. Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. *Mol. Cell* **40**, 294–309 (2010).
166. Kaelin, W. G. & Ratcliffe, P. J. Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Mol. Cell* **30**, 393–402 (2008).
167. Franke, K., Gassmann, M. & Wielockx, B. Erythrocytosis: The HIF pathway in control. *Blood* **122**, 1122–1128 (2013).
168. Gu, Y. Z., Moran, S. M., Hogenesch, J. B., Wartman, L. & Bradfield, C. A. Molecular characterization and chromosomal localization of a third α - class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α . *Gene Expr.* **7**, 205–213 (1998).
169. Carnero, A. & Lleonaart, M. The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution. *Insid. Cell* **1**, 96–105 (2016).
170. Qiu, G. Z. *et al.* Reprogramming of the Tumor in the Hypoxic Niche: The Emerging Concept and Associated Therapeutic Strategies. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 669–686 (2017).
171. Packer, L. & Fuehr, K. Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells [13]. *Nature* (1977) doi:10.1038/267423a0.
172. Saito, H., Hammond, A. T. & Moses, R. E. The effect of low oxygen tension on the in vitro-replicative life span of human diploid fibroblast cells and their transformed derivatives. *Exp. Cell Res.* (1995) doi:10.1006/excr.1995.1087.
173. Parrinello, S. *et al.* Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **5**, 741–747 (2003).
174. Betts, D. H., Perrault, S. D. & King, W. A. Low oxygen delays fibroblast senescence despite shorter telomeres. *Biogerontology* **9**, 19–31 (2008).
175. Kamijo, T. *et al.* Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19(ARF). *Cell* (1997) doi:10.1016/S0092-8674(00)80452-3.
176. Wright, W. E. & Shay, J. W. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: Fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nature Medicine* (2000)

- doi:10.1038/78592.
177. Kondoh, H. *et al.* Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res.* (2005).
 178. Tsai, C. C. *et al.* Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood* (2011) doi:10.1182/blood-2010-05-287508.
 179. Gordan, J. D., Bertout, J. A., Hu, C. J., Diehl, J. A. & Simon, M. C. HIF-2 α Promotes Hypoxic Cell Proliferation by Enhancing c-Myc Transcriptional Activity. *Cancer Cell* **11**, 335–347 (2007).
 180. Bell, E. L., Klimova, T. A., Eisenbart, J., Schumacker, P. T. & Chandel, N. S. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Trigger Hypoxia-Inducible Factor-Dependent Extension of the Replicative Life Span during Hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* (2007) doi:10.1128/mcb.02265-06.
 181. Sermeus, A. & Michiels, C. Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. *Cell Death and Disease* (2011) doi:10.1038/cddis.2011.48.
 182. Leontieva, O. V. *et al.* Hypoxia suppresses conversion from proliferative arrest to cellular senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 13314–13318 (2012).
 183. Koshiji, M. *et al.* HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J.* (2004) doi:10.1038/sj.emboj.7600196.
 184. Gardner, L. B. *et al.* Hypoxia Inhibits G1/S Transition through Regulation of p27 Expression. *J. Biol. Chem.* (2001) doi:10.1074/jbc.M010189200.
 185. Goda, N. *et al.* Hypoxia-Inducible Factor 1 Is Essential for Cell Cycle Arrest during Hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* (2003) doi:10.1128/mcb.23.1.359-369.2003.
 186. Hammer, S., To, K. K. W., Yoo, Y. G., Koshiji, M. & Huang, L. E. Hypoxic suppression of the cell cycle gene CDC25A in tumor cells. *Cell Cycle* (2007) doi:10.4161/cc.6.15.4515.
 187. Welford, S. M. & Giaccia, A. J. Hypoxia and senescence: The impact of oxygenation on tumor suppression. *Molecular Cancer Research* (2011) doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0065.
 188. Young, A. P. *et al.* VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat. Cell Biol.* (2008) doi:10.1038/ncb1699.
 189. Wang, W., Wang, D. & Li, H. Initiation of premature senescence by Bcl-2 in hypoxic condition. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 2446–2453 (2014).
 190. Webster, W. S. & Abela, D. The effect of hypoxia in development. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* (2007) doi:10.1002/bdrc.20102.

Bibliografía

191. Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T. & Quiñones-Hinojosa, A. Oxygen in stem cell biology: A critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* **7**, 150–161 (2010).
192. Huang, G., Ye, S., Zhou, X., Liu, D. & Ying, Q. L. Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: From signaling pathways to pluripotency network. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2015) doi:10.1007/s00018-015-1833-2.
193. Danet, G. H., Pan, Y., Luongo, J. L., Bonnet, D. A. & Simon, M. C. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J. Clin. Invest.* (2003) doi:10.1172/JCI17669.
194. Ezashi, T., Das, P. & Roberts, R. M. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2005) doi:10.1073/pnas.0501283102.
195. Morrison, S. J. *et al.* Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J. Neurosci.* (2000) doi:10.1523/jneurosci.20-19-07370.2000.
196. Huang, X., Trinh, T., Aljoufi, A. & Broxmeyer, H. E. Hypoxia Signaling Pathway in Stem Cell Regulation: Good and Evil. *Curr. Stem Cell Reports* **4**, 149–157 (2018).
197. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* (2006) doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
198. Takahashi, K. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* (2007) doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
199. Huangfu, D. *et al.* Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* (2008) doi:10.1038/nbt1418.
200. Okita, K., Hong, H., Takahashi, K. & Yamanaka, S. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat. Protoc.* (2010) doi:10.1038/nprot.2009.231.
201. Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* (2009) doi:10.1016/j.stem.2009.08.001.
202. Sugimoto, K. *et al.* Effects of hypoxia inducible factors on pluripotency in human iPS cells. *Microsc. Res. Tech.* (2018) doi:10.1002/jemt.23032.
203. Mathieu, J. *et al.* Hypoxia-inducible factors have distinct and stage-specific roles during reprogramming of human cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* (2014) doi:10.1016/j.stem.2014.02.012.

204. Prigione, A. *et al.* HIF1 α modulates cell fate reprogramming through early glycolytic shift and upregulation of PDK1-3 and PKM2. *Stem Cells* (2014) doi:10.1002/stem.1552.
205. Banito, A. *et al.* Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev.* **23**, 2134–2139 (2009).
206. Li, H. *et al.* The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* **460**, 1136–1139 (2009).
207. Mosteiro, L. *et al.* Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science* (80-.). **354**, (2016).
208. Mosteiro, L., Pantoja, C., de Martino, A. & Serrano, M. Senescence promotes in vivo reprogramming through p16 INK4a and IL-6. *Aging Cell* **17**, (2018).
209. Chiche, A. *et al.* Injury-Induced Senescence Enables In Vivo Reprogramming in Skeletal Muscle. *Cell Stem Cell* **20**, 407-414.e4 (2017).
210. Ocampo, A. *et al.* In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell* **167**, 1719-1733.e12 (2016).
211. Milanovic, M. *et al.* Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* **553**, 96–100 (2018).
212. Ritschka, B. *et al.* The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev.* **31**, 172–183 (2017).
213. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* (2011) doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
214. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2003) doi:10.1073/pnas.0530291100.
215. Kalluri, R. & Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer* (2006) doi:10.1038/nrc1877.
216. Junttila, M. R. & De Sauvage, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* (2013) doi:10.1038/nature12626.
217. Brurberg, K. G., Thuen, M., Ruud, E.-B. M. & Rofstad, E. K. Fluctuations in p O₂ in Irradiated Human Melanoma Xenografts . *Radiat. Res.* (2006) doi:10.1667/rr3491.1.
218. Bennewith, K. L. & Durand, R. E. Quantifying transient hypoxia in human tumor xenografts by flow cytometry. *Cancer Res.* (2004) doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0289.
219. Azuma, T. *et al.* B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* (2008) doi:10.1182/blood-2007-11-123141.

Bibliografía

220. Conley, S. J. *et al.* Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2012) doi:10.1073/pnas.1018866109.
221. Iriando, O. *et al.* Distinct breast cancer stem/progenitor cell populations require either HIF1 α or loss of PHD3 to expand under hypoxic conditions. *Oncotarget* (2015) doi:10.18632/oncotarget.5564.
222. Bhagat, M. *et al.* HIF-2 α mediates a marked increase in migration and stemness characteristics in a subset of glioma cells under hypoxia by activating an Oct-4/Sox-2-Mena (INV) axis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2016) doi:10.1016/j.biocel.2016.02.017.
223. Johansson, E. *et al.* CD44 Interacts with HIF-2 α to Modulate the Hypoxic Phenotype of Perinecrotic and Perivascular Glioma Cells. *Cell Rep.* (2017) doi:10.1016/j.celrep.2017.07.049.
224. Das, B. *et al.* MYC Regulates the HIF2 α Stemness Pathway via Nanog and Sox2 to Maintain Self-Renewal in Cancer Stem Cells versus Non-Stem Cancer Cells. *Cancer Res.* (2019) doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-2847.
225. Wu, L. *et al.* HIF-2 α mediates hypoxia-induced LIF expression in human colorectal cancer cells. *Oncotarget* (2015) doi:10.18632/oncotarget.3017.
226. Derynck, R. & Weinberg, R. A. EMT and Cancer: More Than Meets the Eye. *Developmental Cell* (2019) doi:10.1016/j.devcel.2019.04.026.
227. Krishnamachary, B. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B. *Cancer Res.* (2006) doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3719.
228. Moreno-Bueno, G., Portillo, F. & Cano, A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene* (2008) doi:10.1038/onc.2008.346.
229. Hugo, H. J. *et al.* Direct repression of MYB by ZEB1 suppresses proliferation and epithelial gene expression during epithelial-to-mesenchymal transition of breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* (2013) doi:10.1186/bcr3580.
230. Wang, T. *et al.* Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2014) doi:10.1073/pnas.1410041111.
231. King, H. W., Michael, M. Z. & Gleadle, J. M. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* (2012) doi:10.1186/1471-2407-12-421.
232. Easwaran, H., Tsai, H. C. & Baylin, S. B. Cancer Epigenetics: Tumor Heterogeneity, Plasticity of Stem-like States, and Drug Resistance. *Molecular Cell* (2014) doi:10.1016/j.molcel.2014.05.015.

233. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* (80-.). (1956)
doi:10.1126/science.123.3191.309.
234. Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L. & Dang, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* (2006) doi:10.1016/j.cmet.2006.02.002.
235. Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F. & Maity, A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1: Interaction between H-ras and hypoxia. *J. Biol. Chem.* (2001) doi:10.1074/jbc.M010144200.
236. Mimura, I. *et al.* Dynamic Change of Chromatin Conformation in Response to Hypoxia Enhances the Expression of GLUT3 (SLC2A3) by Cooperative Interaction of Hypoxia-Inducible Factor 1 and KDM3A. *Mol. Cell. Biol.* (2012) doi:10.1128/mcb.06643-11.
237. Shibuya, K. *et al.* Targeting the facilitative glucose transporter GLUT1 inhibits the self-renewal and tumor-initiating capacity of cancer stem cells. *Oncotarget* (2015)
doi:10.18632/oncotarget.2892.
238. Tahiliani, M. *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* (80-.). (2009)
doi:10.1126/science.1170116.
239. Wu, M. Z. *et al.* Interplay between HDAC3 and WDR5 Is Essential for Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Mol. Cell* (2011) doi:10.1016/j.molcel.2011.07.012.
240. Kulshreshtha, R. *et al.* A MicroRNA Signature of Hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* (2007)
doi:10.1128/mcb.01395-06.
241. Han, M. *et al.* Antagonism of miR-21 reverses epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype through AKT/ERK1/2 inactivation by targeting PTEN. *PLoS One* (2012) doi:10.1371/journal.pone.0039520.
242. Ferraro, A. *et al.* Epigenetic regulation of miR-21 in colorectal cancer: ITGB4 as a novel miR-21 target and a three-gene network (miR-21-ITGB4-PCDC4) as predictor of metastatic tumor potential. *Epigenetics* (2014) doi:10.4161/epi.26842.
243. Van Den Beucken, T. *et al.* Hypoxia promotes stem cell phenotypes and poor prognosis through epigenetic regulation of DICER. *Nat. Commun.* (2014)
doi:10.1038/ncomms6203.
244. Zhang, C. *et al.* Hypoxia-inducible factors regulate pluripotency factor expression by ZNF217-and ALKBH5-mediated modulation of RNA methylation in breast cancer cells. *Oncotarget* (2016) doi:10.18632/oncotarget.11743.
245. Schmidl, C., Rendeiro, A. F., Sheffield, N. C. & Bock, C. CHIPmentation: Fast, robust, low-input CHIP-seq for histones and transcription factors. *Nat. Methods* (2015)

Bibliografía

- doi:10.1038/nmeth.3542.
246. Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y. & Greenleaf, W. J. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat. Methods* (2013) doi:10.1038/nmeth.2688.
 247. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 : Nature Methods : Nature Publishing Group. *Nat Meth* (2012).
 248. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* (2009) doi:10.1093/bioinformatics/btp352.
 249. Quinlan, A. R. & Hall, I. M. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* (2010) doi:10.1093/bioinformatics/btq033.
 250. Ramírez, F. *et al.* deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* (2016) doi:10.1093/nar/gkw257.
 251. Zhang, Y. *et al.* Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* (2008) doi:10.1186/gb-2008-9-9-r137.
 252. Benner, C., Heinz, S. & Glass, C. K. HOMER - Software for motif discovery and next generation sequencing analysis. [Http://Homer.Ucsd.Edu/](http://Homer.Ucsd.Edu/) (2017).
 253. Hiller, M. *et al.* Computational methods to detect conserved non-genic elements in phylogenetically isolated genomes: Application to zebrafish. *Nucleic Acids Res.* (2013) doi:10.1093/nar/gkt557.
 254. Chen, E. Y. *et al.* Enrichr: Interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* (2013) doi:10.1186/1471-2105-14-128.
 255. Kuleshov, M. V. *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* (2016) doi:10.1093/nar/gkw377.
 256. Ashburner, M. *et al.* Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nature Genetics* (2000) doi:10.1038/75556.
 257. The Gene Ontology, C. *et al.* The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res.* (2019) doi:10.17863/CAM.36439.
 258. Yan, J. *et al.* Histone H3 lysine 4 monomethylation modulates long-range chromatin interactions at enhancers. *Cell Res.* (2018) doi:10.1038/cr.2018.1.
 259. Yue, F. *et al.* A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* (2014) doi:10.1038/nature13992.
 260. Calo, E. & Wysocka, J. Modification of Enhancer Chromatin: What, How, and Why?

- Molecular Cell* (2013) doi:10.1016/j.molcel.2013.01.038.
261. Fornes, O. *et al.* JASPAR 2020: Update of the open-Access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* (2020) doi:10.1093/nar/gkz1001.
 262. Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y. & Prives, C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* (1997) doi:10.1016/S0092-8674(00)80416-X.
 263. Tibbetts, R. S. *et al.* A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* (1999) doi:10.1101/gad.13.2.152.
 264. Olcina, M., Lecane, P. S. & Hammond, E. M. Targeting hypoxic cells through the DNA damage response. *Clinical Cancer Research* (2010) doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0286.
 265. Martello, G., Bertone, P. & Smith, A. Identification of the missing pluripotency mediator downstream of leukaemia inhibitory factor. *EMBO J.* (2013) doi:10.1038/emboj.2013.177.
 266. Ye, S., Li, P., Tong, C. & Ying, Q. L. Embryonic stem cell self-renewal pathways converge on the transcription factor Tfcp2l1. *EMBO J.* (2013) doi:10.1038/emboj.2013.175.
 267. Werth, M. *et al.* Transcription factor TF211 patterns cells in the mouse kidney collecting ducts. *Elife* (2017) doi:10.7554/eLife.24265.
 268. Hu, C. J., Sataur, A., Wang, L., Chen, H. & Simon, M. C. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α . *Mol. Biol. Cell* (2007) doi:10.1091/mbc.E06-05-0419.
 269. Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. & Chen, D. J. ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. *J. Biol. Chem.* (2001) doi:10.1074/jbc.C100466200.
 270. Wrann, S., Kaufmann, M. R., Wirthner, R., Stiehl, D. P. & Wenger, R. H. HIF mediated and DNA damage independent histone H2AX phosphorylation in chronic hypoxia. *Biol. Chem.* (2013) doi:10.1515/hsz-2012-0311.
 271. Rezaeian, A. H. *et al.* A hypoxia-responsive TRAF6-ATM-H2AX signalling axis promotes HIF1 α activation, tumorigenesis and metastasis. *Nat. Cell Biol.* (2017) doi:10.1038/ncb3445.
 272. Tafani, M. *et al.* The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2016) doi:10.1155/2016/3907147.
 273. Chang, Y. T. *et al.* REST is a crucial regulator for acquiring EMT-like and stemness

Bibliografía

- phenotypes in hormone-refractory prostate cancer. *Sci. Rep.* (2017) doi:10.1038/srep42795.
274. Gao, Z., Ding, P. & Hsieh, J. Profiling of REST-dependent micrnas reveals dynamic modes of expression. *Front. Neurosci.* (2012) doi:10.3389/fnins.2012.00067.
275. Ivanova, N. *et al.* Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* (2006) doi:10.1038/nature04915.
276. Chen, X. *et al.* Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. *Cell* (2008) doi:10.1016/j.cell.2008.04.043.
277. Sardina, J. L. *et al.* Transcription Factors Drive Tet2-Mediated Enhancer Demethylation to Reprogram Cell Fate. *Cell Stem Cell* (2018) doi:10.1016/j.stem.2018.08.016.
278. Wang, X. *et al.* the transcription factor TFCP2L1 induces expression of distinct target genes and promotes self-renewal of mouse and human embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* (2019) doi:10.1074/jbc.RA118.006341.
279. Dean, R., Kim, S. S. & Delgado, D. Expression of c-myc oncogene in human fibroblasts during in vitro senescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1986) doi:10.1016/0006-291X(86)90948-4.
280. Chappell, J. & Dalton, S. Roles for MYC in the establishment and maintenance of pluripotency. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* (2013) doi:10.1101/cshperspect.a014381.
281. Qiu, D. *et al.* Klf2 and Tfc2l1, Two Wnt/ β -Catenin Targets, Act Synergistically to Induce and Maintain Naive Pluripotency. *Stem Cell Reports* (2015) doi:10.1016/j.stemcr.2015.07.014.
282. Jo, A. *et al.* The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. *Genes and Diseases* (2014) doi:10.1016/j.gendis.2014.09.004.
283. Siddique, H. R. & Saleem, M. Concise review: Role of BMI1, a stem cell factor, in cancer recurrence and chemoresistance: Preclinical and clinical evidences. *Stem Cells* (2012) doi:10.1002/stem.1035.
284. Aldaz, P. *et al.* SOX9 promotes tumor progression through the axis BMI1-p21CIP. *Sci. Rep.* (2020) doi:10.1038/s41598-019-57047-w.
285. Herreros-Villanueva, M. *et al.* SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis* (2013) doi:10.1038/oncsis.2013.23.
286. Lee, J., Go, Y., Kang, I., Han, Y. M. & Kim, J. Oct-4 controls cell-cycle progression of embryonic stem cells. *Biochem. J.* (2010) doi:10.1042/BJ20091439.
287. Lu, Y. *et al.* OCT4 maintains self-renewal and reverses senescence in human hair follicle

- mesenchymal stem cells through the downregulation of p21 by DNA methyltransferases. *Stem Cell Res. Ther.* (2019) doi:10.1186/s13287-018-1120-x.
288. Takemoto, T. *et al.* Tbx6-dependent Sox2 regulation determines neural or mesodermal fate in axial stem cells. *Nature* (2011) doi:10.1038/nature09729.
289. Liu, C. F. & Lefebvre, V. The transcription factors SOX9 and SOX5/SOX6 cooperate genome-wide through super-enhancers to drive chondrogenesis. *Nucleic Acids Res.* (2015) doi:10.1093/nar/gkv688.
290. Hsuan, J. J. Transforming Growth Factor (TGF) Alpha. in *Encyclopedia of Endocrine Diseases* (2004). doi:10.1016/b0-12-475570-4/01317-2.

ANEXO: CONTRIBUCIONES
CIENTÍFICAS DURANTE LA ETAPA DE
DOCTORADO

PUBLICACIONES

1. Muñoz-Galván S; Felipe-Abrio B; García-Carrasco M; Domínguez-Piñol J; Suarez-Martínez E; Verdugo-Sivianes EM; Espinosa-Sánchez A; Navas LE; **Otero-Albiol D**; Marin JJ; Jiménez-García MP; García-Heredia JM; Quiroga AG; Estevez-García P; Carnero A. *New markers for human ovarian cancer that link platinum resistance to the cancer stem cell phenotype and define new therapeutic combinations and diagnostic tools*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 38 - 234, pp. 1 - 14. BMC. 03/06/2019. ISSN 1756-9966
2. Muñoz-Galván, S; Lucena-Cacace, A; Pérez, M; **Otero-Albiol, D**; Gómez-Cambronero, J; Carnero, A. *Tumor cell-secreted PLD increases tumor stemness by communication with microenvironment*. Oncogene. 38, pp. 1309 - 1323. Nature. 10/10/2018. ISSN 0950-9232
3. Lucena-Cacace, A; **Otero-Albiol, D**; Jiménez-García, MP; Muñoz-Galván, S; Carnero, A. *NAMPT is a Potent Oncogene in Colon Cancer Progression that Modulates Cancer Stem Cell Properties and resistance to therapy through Sirt1 and PARP*. Clinical Cancer Research. 24 - 5, pp. 1 - 15. American Association for Cancer Research Journals. 01/03/2018. ISSN 1078-0432
4. Lucena-Cacace, A; **Otero-Albiol, D**; Jiménez-García, MP; Peinado-Serrano, J; Carnero, A. *NAMPT overexpression induces pluripotency and defines a novel tumor signature for glioma prognosis*. Oncotarget. 8 - 59, pp. 99514 - 99530. Impact Journals. 21/11/2017. ISSN 1949-2553
5. **Otero-Albiol D**; Felipe-Abrio B. *MicroRNA regulating metabolic reprogramming in tumor cells: New tumor markers*. Cancer Translational Medicine. 2 - 6, pp. 175 - 181. Wolters Kluwer. 15/11/2016. ISSN 2395-3977
6. López-Guerra JL; Verdugo-Sivianes EM; **Otero-Albiol D**; Vieites B; Ortiz-Gordillo MJ; De León JM; Praena-Fernández JM; Marin JJ; Carnero A. *High casein kinase 1 epsilon levels are correlated with better prognosis in subsets of patients with breast cancer*. Oncotarget. 6 - 30, pp. 30343 - 30356. Impact Journal. 06/10/2015. ISSN 1949-2553

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

1. **25th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (EACR). Amsterdam (Holanda). 30/06/2018 - 03/07/2018.**

Póster 1: **Otero-Albiol D**, Muñoz-Galván S, Suárez-Martínez E, Verdugo-Sivianes EM, Jiménez-García MP, Navas L, Pérez M, García-Heredia JM, Peinado-Serrano J, Carnero A. (2018). *Hypoxia-induced PLD2 promotes tumorigenesis and stem cell-like properties in tumor cells*.

Póster 2: Verdugo-Sivianes EM, Felipe-Abrio B, **Otero-Albiol D**, Jiménez-García MP, Navas L, Peinado-Serrano J, Muñoz-Galván S, Pérez M, García-Heredia JM, Carnero A. (2018). *Prognostic relevance of PP1 in breast cancer*.

Póster 3: Muñoz-Galván S, Felipe-Abrio B, Verdugo-Sivianes EM, Jiménez-García MP, Suarez-Martinez E, Perez M, **Otero-Albiol D**, Peinado-Serrano J, Navas L, Carnero A. (2018). *Downregulation of MYPT1 increases tumorigenesis and resistance to platinum drugs in ovarian cancer.*

2. **24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (EACR). Manchester (Reino Unido). 09-12/07/2016**

Póster 1: Jiménez-García MP, Lucena-Cacace A, Robles-Frías MJ, Felipe-Abrio B, Verdugo-Sivianes EM, **Otero-Albiol D**, Peinado-Serrano J, Perez M, Muñoz-Galván S, Garcia-Heredia JM, Narlik-Grassow M, Blanco-Aparicio C, Carnero A (2016). *Conditional transgenic expression of PIM1/PIM2 kinases in hormone-dependent tissues induces mammary gland and female reproductive system tumors.*

Póster 2: Jiménez-García MP, Lucena-Cacace A, Robles-Frías MJ, Felipe-Abrio B, Verdugo-Sivianes EM, **Otero-Albiol D**, Peinado-Serrano J, Perez M, Muñoz-Galván S, Garcia-Heredia JM, Narlik-Grassow M, Blanco-Aparicio C, Carnero A (2016). *Determination of the Proto-Oncogenic Role of PIM1/PIM2 Kinases in Male Reproductive System Pre-Neoplastic Lesions by using Conditional Transgenic Murine Models.*

Póster 3: Felipe-Abrio B, Jiménez-García MP, Verdugo-Sivianes EM, Lucena-Cacace A, **Otero-Albiol D**, Perez M, Peinado-Serrano J, Muñoz-Galván S, Garcia-Heredia JM, Carnero A (2016). *Absence of MYBBP1a translocation from nucleolus to nucleoplasm under glucose starvation in renal carcinoma cell lines.*

3. **57th American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting. New Orleans, LA (Estados Unidos). 16-20/04/2016**

Póster: Lucena-Cacace A, Jiménez-García MP, Ferrer I, Felipe-Abrio B, Verdugo-Sivianes EM, **Otero-Albiol D**, Perez M, Muñoz-Galván S, Garcia-Heredia JM, Peinado-Serrano J, Marín JJ, Narlik-Grassow M, Blanco-Aparicio C, Carnero A (2016). *Determination of the Proto-Oncogenic Role of PIM1/PIM2 Kinases in Male Reproductive System Pre-Neoplastic Lesions by using Conditional Transgenic Murine Models.*

4. **XV ASEICA International Congress, 2015. Sevilla (España). 21-23/10/2015**

Póster 1: Jiménez-García MP, Ferrer I, Felipe-Abrio B, Lucena-Cacace A, Verdugo-Sivianes EM, **Otero-Albiol D**, Peinado-Serrano J, Perez M, Muñoz-Galván S, Garcia-Heredia JM, Marín JJ, Narlik-Grassow M, Blanco-Aparicio C, Carnero A (2015). *Determination of the Proto-Oncogenic Role of PIM1/PIM2 Kinases in Male Reproductive System Tumors by using Conditional Transgenic Murine Models.*

Póster 2: Jiménez-García MP, Ferrer I, Felipe-Abrio B, Lucena-Cacace A, Verdugo-Sivianes EM, **Otero-Albiol D**, Peinado-Serrano J, Perez M, Muñoz-Galván S, Garcia-Heredia JM, Marín JJ, Narlik-Grassow M, Blanco-Aparicio C, Carnero A (2015).

Conditional Transgenic Expression of PIM1/PIM2 Kinases in Hormone-Dependent Tissues Induces Mammary Gland Tumors.

Póster 3: Perez M, Muñoz Galvan S, Jiménez-García MP, Marin JJ, Padillo J, Marín-Gómez LM, Garcia-Carbonero R, Verdugo-Sivianes EM, García-Heredia Jose M, Lucena-Cacace A, Felipe-Abrio B, **Otero-Albiol D**, Robles-Frias MJ, Carnero A (2015). *Orthotopic xenografts of colorectal hepatic metastases maintain morphological phenotypic and genetic characteristic of the original tumors.*

Póster 4: Perez M, Muñoz Galvan S, Jiménez-García MP, Marin JJ, Verdugo-Sivianes EM, Garcia-Heredia Jose M, Lucena-Cacace A, Felipe-Abrio B, **Otero-Albiol D**, Carnero A. (2015). *Efficacy of CDK4 inhibition against sarcomas depends on their levels of CDK4 mRNA.*