

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Tesis doctoral:

ESTUDIO DE MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN EL ENVEJECIMIENTO HUMANO EN UN MODELO EXPERIMENTAL BASADO EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.

Andrea Gago Martínez

Marzo, 2017

Directora: Dra. Clara I. Rodríguez López

Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal.

Universidad del País Vasco (UPV/EHU)

**"Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas,
de pronto, cambiaron todas las preguntas."**

Mario Benedetti

A mi familia

A Lau

A Vinícius

Tengo mucho que agradecer, no solo por la tesis, sino por las maravillosas personas que he tenido el placer de conocer en este camino.

A la primera persona que he conocido, Ana Zubiaga, sin quien sería imposible que hubiera realizado este trabajo de tesis, gracias Ana por tu confianza y por la oportunidad que me diste el día que me aceptaste en el Máster, a pesar de decirme que «los médicos no hacen este programa de doctorado». Aún así me diste un voto de confianza, por eso te seré eternamente grata.

La segunda persona a quien debo agradecer es a Clara I. Rodríguez, quien también me dio un voto de confianza (a pesar de su desconfianza inicial por mi formación médica) y la oportunidad de aprender a su lado, sin importarle que fuera al laboratorio, sábados, domingo, festivos, salientes de guardia y por las noches, debido a mis horarios, dobles turnos y guardias en el hospital. Y también porque soportó estoicamente los tres primeros meses de mis saludos «a la uruguaya» sin decirme que: «aquí no nos saludamos con besos todos los días, sólo cuando no nos vemos hace mucho tiempo».

A la tercera persona, que no puedo ni quiero dejar de agradecer es Arantza Infante. Aran, no sé ni cómo agradecerte todo lo que me has enseñado, ayudado, apoyado y podría seguir enumerando mil cosas más que has hecho por mí, así que como no tengo palabras, simplemente: ¡Gracias, gracias, gracias!

A todos los compañeros del labo por todo lo que me han ayudado, por los momentos buenos y malos que hemos pasado juntos. A Garbi con quien compartí mis primeros tiempos en el labo. A Laura Amo por como es, por acompañarme, ayudarme y sobre todo por la confianza que siempre me ha tenido. A Esti Ruiz por la linda persona que es y los gestos que ha tenido conmigo. A Erica por los ánimos y por dejarme usar su termociclador y su hielo tantas veces. A Iker y Lore mis compañeros de últimas horas en el labo. A Paco *for make me laugh* y por ayudarme a escribir mi primer artículo de un ensayo clínico. A Ricardo Andrade, porque es un *crack* y por todo lo que me enseñó de microscopía.

A toda mi familia por su apoyo, en especial a mis abuelos: Nair y Lalo, ejemplos de vida e inspiración, por todo su amor y lo que me han enseñado.

Lau, resumo todo lo que tengo que decir en mil veces y siempre: ¡Gracias! No tengo palabras realmente para agradecerte lo suficiente.

Finalmente, no menos importante, agradezco la fuerza final para acabar la tesis a Vinícius, esta persona increíble que está llegando a mi vida y que sin haber nacido aún, ya ha transformado «mi mundo».

Imagen de portada

Imágenes de tinción por inmunofluorescencia correspondientes a distintas alteraciones nucleares que reflejan la acumulación de prelamin A.

ABREVIATURAS

AU	unidades arbitrarias
BM	del inglés, médula ósea
BSA	del inglés, albúmina de suero bovino
cDNA	del inglés, ácido desoxirribonucleico complementario
CO₂	anhídrido carbónico
cRNA	del inglés, ácido ribonucleico complementario
Ct	del inglés, <i>threshold cycle</i> , ciclo umbral
CT	del inglés, tomografía computarizada
Ctrl	control
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DAVID	del inglés, base de datos para la anotación, visualización y descubrimiento integrado
DIRE	del inglés, <i>distant regulatory elements</i> , programa informático
DMEM	del inglés, <i>dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	del inglés, ácido desoxirribonucleico
DNasa	del inglés, desoxirribonucleasa
dNTP	del inglés, desoxirribonucleótidos trifosfato
EASE	del inglés, <i>Expression Analysis Systematic Explorer</i> , programa informático
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
et al.	del latín, y colaboradores
FBP	del inglés, retroproyección filtrada
FBS	del inglés, suero fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FPLD2	lipodistrofia familiar parcial Dunningan tipo 2
FTasa	del inglés, farnesiltransferasa
FTI	del inglés, inhibidor de la farnesiltransferasa
g	gramos
GAPDH	gen Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en humanos
GEO	del inglés, <i>gene expression omnibus</i>
GO	del inglés, <i>gene ontology</i> , ontología génica
h	hora
HGNC	del inglés, <i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>
HGPS	del inglés, síndrome de Hutchinson Gilford progeria
hMSC	del inglés, células madre mesenquimales humanas
HP1 γ	proteína 1 de la heterocromatina fosforilada
HT-QFISH	del inglés, fluorescencia cuantitativa por hibridación <i>in situ</i>
HUGO	del inglés, organización del genoma humano
ICMT	del inglés, isoprenilcisteína carboximetil transferasa
in silico	del latín, simulación computacional
in situ	del latín, en el sitio o en el lugar
in vitro	del latín, dentro del vidrio, en un ambiente experimental, fuera del organismo
in vivo	del latín, dentro de lo vivo o dentro de un organismo
INM	del inglés, membrana nuclear interna

IP	inhibidor de proteasas
iPSC	del inglés, células madre pluripotentes inducidas
Kb	kilobases
KDa	kilodalton
KeV	kiloelectronvoltios
KV	kilovoltios
LMNA	gen Lamin A/C en humanos
Lmna	gen Lamin A/C en ratones
log	logaritmo
log₂	logaritmo en base 2
mAb	del inglés, anticuerpo monoclonal
MADA	displasia mandibulo acral tipo A
MADB	displasia mandibulo acral tipo B
MBq	MegaBecquerel (unidad del sistema internacional de radioactividad)
MEF	del inglés, fibroblastos embrionarios de ratón
mg	miligramo
miRNA	del inglés, micro RNA
ml	mililitro
mm	milimetro
mM	mili molar
mm³	milímetro cúbico
MOI	multiplicidad de infección
mRNA	del inglés, mensajero del ácido ribonucleico
MSC	del inglés, células madre mesenquimales
ng	nanogramo
nm	nanómetros
NPC	del inglés, complejo de poros nucleares
NT	del inglés, <i>non targeting</i> , no dirigido
Oct-1	factor de transcripción octamérico de la familia POU, denominado también <i>POU2F1</i>
OMIM	del inglés, <i>online mendelian inheritance in man</i>
p6	pacas de 6 pocillos
pb	pares de bases
PBS	del inglés, tampón fosfato salino
PCR	del inglés, reacción en cadena de la polimerasa
PET	del inglés, tomografía por emisión de positrones
PI	del inglés, yoduro de propidio
Pre	células madre mesenquimales humanas que acumulan prelamin A
RCE1	del inglés, homólogo de la proteína peptidasa de prenilación
rcf	fuerza de centrifugación relativa
RDL	Dermopatía restrictiva letal
RNA	del inglés, ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
ROS	especies reactivas del oxígeno

rpm	revoluciones por minuto
RT	temperatura ambiente
RT-qPCR	del inglés, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
SASP	del inglés, fenotipo de secreción asociado a senescencia
SC	del inglés, células madre
SCID	del inglés, inmunodeficiencia combinada severa
SD	del inglés, desviación estándar
SDS	sodio dodecil sulfato
SDS-PAGE	del inglés, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SEM	del inglés, error estándar de la media
shRNA	del inglés, horquillas cortas de interferencia de ácido ribonucleico
TPV	tipranavir
V	voltios
v/v	porcentaje de volumen, expresando concentración de la solución
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
VOIs	del inglés, volúmenes de Interés
VSMC	del inglés, células musculares lisas vasculares
ZMPSTE24	gen de la metaloproteinasa STE24 en humanos
Zmpste24	gen de la metaloproteinasa STE24 en ratones
ZMPSTE24	enzima metalopeptidasa de zinc STE24, denominada también FACE1
γ H2AX	histona H2AX fosforilada
χ^2	test estadístico Chi cuadrado
μA	microamperios
μg	microgramos
μl	microlitros
μM	micromolar
μm	micras

ÍNDICE

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Envejecimiento	3
2.1.1. Concepto de envejecimiento	3
2.1.2. Estadística e importancia del tema.	4
2.1.3. Bases moleculares y celulares del envejecimiento: puntos clave.	5
2.1.3.1. Marcadores primarios: principales causas del daño celular.....	7
2.1.3.1.1. Inestabilidad genómica	7
2.1.3.1.2. Acortamiento de los telómeros.....	7
2.1.3.1.3. Alteraciones epigenéticas	8
2.1.3.1.4. Pérdida de la homeostasis proteica.....	9
2.1.3.2. Marcadores antagónicos: de respuesta al daño que sufre la célula	9
2.1.3.2.1. Alteración en la regulación de la detección de nutrientes.....	9
2.1.3.2.2. Disfunción mitocondrial.....	10
2.1.3.2.3. Senescencia celular.....	10
2.1.3.3. Marcadores de integración: responsables finales de los fenotipos.....	11
2.1.3.3.1. Agotamiento del nicho de células madre.....	11
2.1.3.3.2. Alteración en la comunicación intercelular.....	11
2.1.4. Patologías asociadas con el envejecimiento prematuro y su relación con el envejecimiento fisiológico.	13
2.2. Lámina nuclear y patologías asociadas	14
2.2.1. Lámina nuclear.....	14
2.2.2. Procesamiento de prelamin A.....	16
2.2.3. Laminopatías.....	18
2.2.3.1. Progeria.....	20
2.2.3.2. Displasia mandíbulo acral tipo A	21
2.2.3.3. Displasia mandíbulo acral tipo B	22
2.2.3.4. Dermopatía restrictiva letal	22
2.2.3.5. Lipodistrofia asociada al VIH	23
2.2.4. Modelos murinos relevantes para el estudio de las laminopatías asociadas a fenotipos de envejecimiento	24
2.3. Antecedentes del trabajo y generación del modelo propuesto	28
2.3.1. Elección de las hMSC como sistema celular relevante para el estudio del envejecimiento.	29
2.3.2. Modelo experimental humano de lipodistrofia asociada a <i>LMNA</i>	30
2.3.3. Modelo experimental humano de envejecimiento.	35
III. HIPÓTESIS	37
IV. OBJETIVOS	38

V. MATERIAL Y MÉTODOS	41
5.1. Técnicas de biología celular	41
5.1.1. Cultivo de células.....	41
5.1.1.1. Obtención de las muestras.....	41
5.1.1.2. Cultivo celular y tratamiento farmacológico.....	41
5.1.2. Nivel de duplicación de la población celular.....	42
5.1.2.1. Recuento de células.....	42
5.1.3. Análisis de la apoptosis celular mediante tinción con anexina V - ioduro de propidio.....	43
5.1.4. Tinción para la actividad de β -galactosidasa.....	43
5.1.5. Ensayo de supervivencia celular en condiciones de hipoxia.....	44
5.1.6. Inmunofluorescencia.....	44
5.1.7. <i>Proximity ligation assay</i> (PLA).....	45
5.1.8. Medida de los niveles de oxidación.....	48
5.1.9. Análisis de la longitud de los telómeros.....	48
5.1.10. Ensayo del gen reportero de luciferasa.....	48
5.1.11. Transducción de hMSC.....	49
5.2. Técnicas de biología molecular	50
5.2.1. Extracción de RNA total.....	50
5.2.2. Transcripción inversa y generación de cDNA.....	50
5.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	51
5.2.4. Análisis de expresión génica mediante <i>microarray</i>	54
5.2.5. Extracción y cuantificación de proteínas.....	55
5.2.6. <i>Western blot</i>	55
5.2.6.1. <i>Stripping</i> de la membrana.....	56
5.3. Ensayos funcionales <i>in vivo</i> en un modelo murino de isquemia	57
5.3.1. Modelo animal y técnica quirúrgica.....	57
5.3.2. Mediciones del flujo sanguíneo de los miembros inferiores del ratón.....	58
5.3.3. Radioquímica.....	58
5.3.4. Tomografía por emisión de positrones (PET) y adquisición de datos.....	58
5.3.5. Análisis de Imagen de la tomografía por emisión de positrones (PET).....	59
5.4. Análisis computacional	59
5.4.1. Análisis de anotación funcional y clasificación de los genes.....	59
5.4.2. Análisis computacional de regiones promotoras.....	60
5.5. Análisis estadístico	60
VI. RESULTADOS	63
6.1. Objetivo 1: Evaluación de la acumulación de prelamina A en hMSC	63
6.1.1. El tratamiento con TPV genera acumulación de prelamina A en hMSC.....	63
6.2. Objetivo 2: Validación del modelo experimental de envejecimiento basado en hMSC que	

acumulan prelamin A.....	64
6.2.1. Acortamiento de los telómeros.....	64
6.2.2. Inestabilidad genómica.....	65
6.2.2.1. Inducción de la señalización de daño al DNA.....	65
6.2.2.2. Alteración de la arquitectura nuclear en las células que acumulan prelamin A.....	66
6.2.3. Senescencia celular.....	67
6.2.3.1. Disminución de la proliferación celular.....	67
6.2.3.2. Aumento de senescencia en células que acumulan prelamin A.....	69
6.2.4. Susceptibilidad al estrés.....	70
6.2.4.1. Incremento de la susceptibilidad al estrés en hMSC que acumulan prelamin A.....	70
6.2.4.2. Inestabilidad genómica.....	72
6.2.4.2.1. Aumento de la acumulación de prelamin A en condiciones de estrés.....	72
6.2.4.2.2. Aumento de la señalización del daño al DNA en las células que acumulan prelamin A en condiciones de estrés.....	73
6.2.4.3. Pérdida de la homeostasis proteica.....	74
6.2.4.4. Disfunción mitocondrial.....	78
6.2.4.5 Aumento de la senescencia celular en condiciones de estrés.....	79
6.2.4.5.1. Cambios morfológicos asociados a senescencia.....	79
6.2.4.5.2. Incremento de la senescencia en hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de estrés.....	79
6.2.5 Estudio de la funcionalidad <i>in vivo</i>	81
6.2.5.1. Las hMSC que acumulan prelamin A muestran una actividad funcional disminuida <i>in vivo</i>	81
6.2.6. Análisis del perfil génico.....	84
6.2.6.1. Alteración del perfil de transcripción génico.....	84
6.2.6.2. Clasificación funcional de los genes desregulados en hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de estrés.....	85
6.2.6.3. Validación de los genes desregulados en las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de estrés.....	86
6.3. Objetivo 3: Identificación de mecanismos moleculares involucrados en el envejecimiento humano en MSC.....	87
6.3. Búsqueda de factores de transcripción potencialmente alterados.....	87
6.3.1. Análisis de Oct-1 como posible factor de transcripción involucrado en el envejecimiento de hMSC.....	88
6.3.1.1. Aumento de la expresión de Oct-1 en hMSC que acumulan prelamin A sometidas a condiciones de estrés.....	88
6.3.1.2 Análisis funcional de la actividad de Oct-1.....	89
6.3.1.3. Análisis de la interacción Oct-1 con prelamin A.....	90
6.3.1.4. Silenciamiento de Oct-1.....	91
6.3.1.5. El silenciamiento de Oct-1 induce senescencia.....	94
6.3.1.6. El silenciamiento de Oct-1 activa la autofagia en hMSC.....	95
6.3.2. Análisis del Rol de Oct-1 en la regulación del procesamiento de la proteína prelamin A.....	96
6.3.2.1. Análisis <i>in silico</i> del promotor del gen <i>ZMPSTE24</i>	98
6.3.2.2. Oct-1 regula la expresión génica de <i>ZMPSTE24</i> en hMSC.....	98

6.3.2.3. Oct-1 regula la expresión de la proteína ZMPSTE24 en hMSC.....	99
6.3.2.4. Oct-1 regula la expresión de prelamin A en hMSC.....	99
VII. DISCUSIÓN.....	101
7.1. Recapitulación de los fenotipos de envejecimiento en las hMSC que acumulan prelamin A.....	102
7.2. Estudio de mecanismos moleculares: Identificación de Oct-1 como factor de transcripción que interviene en la regulación del envejecimiento humano en las MSC.....	106
7.3. Consideraciones finales.....	110
VIII. CONCLUSIONES.....	113
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	115
X. ANEXO.....	129
Publicaciones relacionadas con este trabajo de tesis.....	129

I. RESUMEN

Durante la realización de esta tesis hemos generado un modelo *in vitro* para el estudio del envejecimiento humano, basado en células madre mesenquimales humanas (hMSC) que acumulan prelamin A. Hemos demostrado que la acumulación de prelamin A en hMSC induce un fenotipo de envejecimiento caracterizado por un acortamiento de los telómeros, un mayor daño al DNA y un aumento en la senescencia celular. En este modelo experimental humano de envejecimiento el fenotipo se exagera notablemente cuando la acumulación de prelamin A se combina con una condición de estrés, como hemos observado por medio de un mayor incremento del daño al DNA, alteración del proceso de autofagia además de cambios significativos en el perfil de expresión génica. Estas alteraciones fueron ratificadas con una clara disminución de la capacidad funcional de las hMSC que acumulan prelamin A *in vivo*. Finalmente, el potencial de este modelo experimental para el estudio de los mecanismos involucrados en el envejecimiento humano ha sido demostrado, mediante la identificación del papel relevante que desempeña el factor de transcripción Oct-1 en el envejecimiento de las células madre mesenquimales humanas, una función desconocida hasta el momento.

II. INTRODUCCIÓN

2.1. ENVEJECIMIENTO

2.1.1. Concepto de envejecimiento

El envejecimiento es conceptualmente muy difícil de precisar, puesto que no responde a una definición sencilla en términos biológicos, psicológicos ni sociales. Ha sido abordado históricamente desde tres perspectivas parciales diferentes: como consecuencia del paso del tiempo, como deterioro físico y constatación de la pérdida de capacidad funcional, y como una etapa más del ciclo vital. Actualmente se entiende al envejecimiento como el proceso dinámico de cambios que se suceden en el organismo, que se inicia desde el nacimiento, tiene una regulación multifactorial y cuyo estudio es muy complejo. El envejecimiento determina una pérdida de las reservas del organismo y de los mecanismos de respuesta, que establece como consecuencia un aumento en la vulnerabilidad ante cualquier daño y, con ello, mayor riesgo de morbi-mortalidad (Cowdry *et al.*, 1942; Hayflick *et al.*, 1994; Taffet *et al.*, 2003). El organismo al envejecer pierde paulatinamente capacidades para realizar correctamente sus funciones biológicas. Esto ocurre incluso en ausencia de enfermedad. Cada órgano y sistema va perdiendo estas capacidades con una cadencia propia, existiendo también una gran variabilidad en cada individuo (Cowdry *et al.*, 1942; Taffet *et al.*, 2003). Cuando aumentan los requerimientos, como ocurre en las situaciones de sobrecarga funcional (como puede ser una infección o una situación de estrés), la pérdida de vitalidad se hace más evidente, esto se corresponde con el concepto de *Homeostenosis* cuya representación gráfica se muestra en la figura 1 (Taffet *et al.*, 2003).

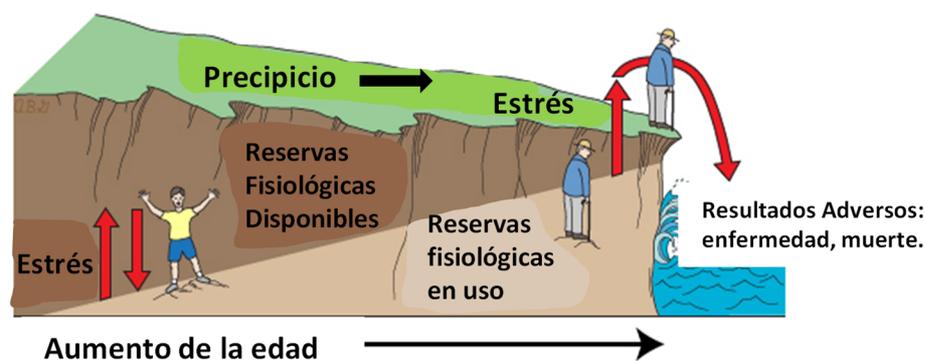


Figura 1. Esquema del concepto de Homeostenosis. Una disminución de las reservas fisiológicas en los adultos mayores conduce a la intolerancia a los desafíos de su homeostasis. Modificado de Taffet GE, 2003.

Es fundamental hacer la disquisición de que el envejecimiento y la enfermedad no son conceptos equivalentes. El envejecimiento normal o fisiológico implica una serie de cambios graduales a nivel biológico, psicológico y social, asociados a la edad, que son intrínsecos e inevitables, y que ocurren como consecuencia del paso del tiempo. Constituye un estado de mayor fragilidad, debido a la disminución de reservas fisiológicas y por tanto una menor capacidad del organismo para adaptarse y responder a diversas agresiones. Esto predispone el desarrollo de enfermedades que se consideran habitualmente como asociadas al envejecimiento, como por ejemplo la aterosclerosis, las enfermedades cardiovasculares o cerebrovasculares (Kennedy *et al.*, 2014). Bajo ningún concepto es una enfermedad como tal y debe diferenciarse del envejecimiento patológico o secundario, que involucra cambios que se producen como consecuencia de malos hábitos o enfermedades de diversas etiologías y que no forman parte del envejecimiento normal, por ejemplo: síndromes de envejecimiento precoz, enfermedad de Alzheimer, demencia fronto-temporal, enfermedades del sistema respiratorio, entre otras.

2.1.2. Estadística e importancia del tema.

Según el último informe publicado por la Organización Mundial de la Salud en 2015, hasta el año 2050 la proporción de la población mundial con más de 60 años de edad pasará de 900 millones a 2000 millones, lo que representa un aumento del 12% al 22% (Figura 2) (División de Población de las Naciones Unidas, Envejecimiento Mundial de la población, 2015). No solo la proporción de la población anciana será mayor, sino que en las últimas décadas la velocidad de envejecimiento se ha incrementado (Lutz *et al.*, 2008). En los países desarrollados, que se caracterizan por una disminución de las tasas de natalidad y un aumento del envejecimiento de la población, la esperanza de vida es de aproximadamente de 78 a 85 años. Se ha estimado que los individuos sufren enfermedades asociadas con el envejecimiento durante sus últimos 20 años de vida. Por lo tanto, alcanzar un envejecimiento fisiológico saludable se ha convertido en un desafío socio-económico fundamental.

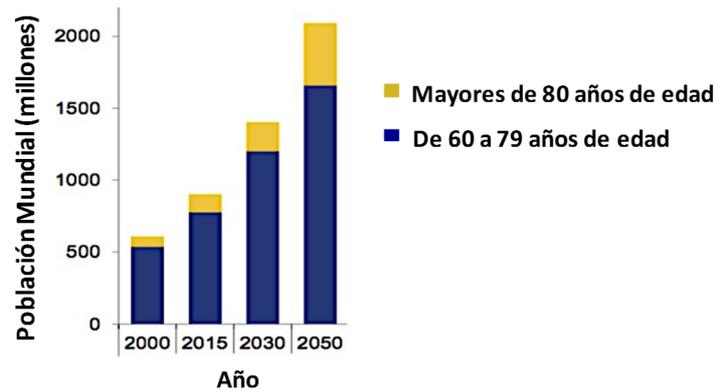


Figura 2. Distribución del crecimiento poblacional a nivel mundial en mayores de 60 años. Tomado de Perspectivas de la población mundial: Revisión de 2015; División de Población de las Naciones Unidas, Departamento de Asuntos Económicos y Sociales.

Es por esto que el envejecimiento se ha convertido en un campo de investigación de gran relevancia en la actualidad, tanto a nivel básico como a nivel clínico. Los objetivos de investigar el envejecimiento implican no sólo extender la longevidad, sino esencialmente mejorar la salud durante el envejecimiento para poder aumentar el tiempo libre de enfermedad y mejorar la calidad de vida del individuo.

2.1.3. Bases moleculares y celulares del envejecimiento: puntos clave.

Concibiendo al proceso de envejecimiento fisiológico como un estado de mayor vulnerabilidad del organismo (Cowdry *et al.*, 1942; Hayflick *et al.*, 1994; Taffet *et al.*, 2003), que se corresponde a nivel celular con alteraciones que llevan a un deterioro de la función de las células madre y a la disminución de su capacidad para regenerar los tejidos, López-Otín *et al.* (2013), realizaron una revisión exhaustiva de la literatura proponiendo nueve marcadores distintivos del envejecimiento celular. Los criterios ideales que deben cumplir estos marcadores son: (1) deben manifestarse durante el envejecimiento normal; (2) su agravamiento experimental debería acelerar el envejecimiento; y (3) su mejoría experimental debería retardar el proceso de envejecimiento normal y, por lo tanto, aumentar el tiempo de vida saludable.

Los marcadores propuestos son: inestabilidad genómica, acortamiento de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de la homeostasis proteica, alteración en la regulación de la detección de nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento del nicho de células madre y alteración en la comunicación intercelular (Figura 3).



Figura 3. Marcadores del envejecimiento. Esquema que muestra las nueve características del envejecimiento descritas en la revisión de López-Otin *et al.*, 2013.

Los autores proponen además que estos marcadores se agrupan en tres categorías, como esquematizan en la figura 4. Los marcadores primarios son aquellos signos considerados como las principales causas de daño celular. Los marcadores antagonísticos están constituidos por las respuestas que inicialmente mitigan el daño, pero eventualmente, si son crónicas o exacerbadas, se vuelven deletéreas para las células por sí mismas. La tercera categoría la conforman los marcadores de integración de los dos grupos anteriores, y son en última instancia los responsables de la disminución funcional asociada con el envejecimiento. A continuación los describiremos detalladamente.

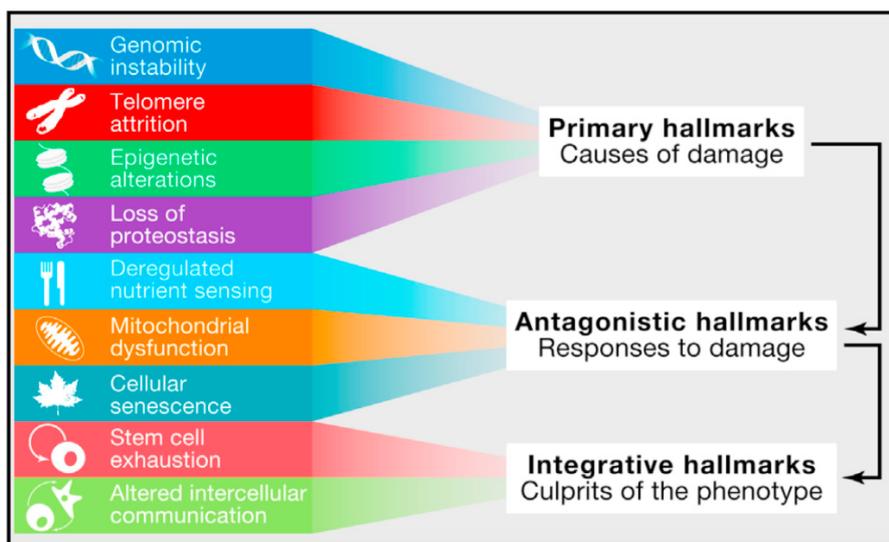


Figura 4. Interconexiones funcionales entre los marcadores del envejecimiento. López-Otin *et al.*, 2013.

2.1.3.1. Marcadores primarios: principales causas del daño celular.

2.1.3.1.1. Inestabilidad genómica

En el envejecimiento fisiológico como en los síndromes de envejecimiento prematuro, las células acumulan daño genómico a lo largo de la vida (Vijg y Suh, 2013). López-Otín *et al.*, (2013) proponen que éste es el denominador común del envejecimiento, lo cual implica daño al DNA genómico, al DNA mitocondrial y alteraciones en la arquitectura nuclear. La integridad y la estabilidad del DNA son desafiadas continuamente por agentes físicos, químicos y biológicos exógenos, así como por amenazas endógenas, incluyendo errores de replicación del DNA, reacciones hidrolíticas espontáneas y especies reactivas del oxígeno (ROS) (Hoeijmakers, 2009).

Además de estas lesiones potenciales que atañen directamente al DNA, los defectos en la arquitectura nuclear presentes en las laminopatías (patologías causadas por alteraciones en el gen *LMNA* o en factores esenciales para el procesamiento de sus productos proteicos) pueden causar inestabilidad genómica y determinar síndromes de envejecimiento prematuro (Worman, 2012). Por ejemplo, se ha observado que los fibroblastos de una de estas laminopatías que cursa con envejecimiento prematura, como es el síndrome de Hutchison-Gilford Progeria (HGPS), tienen una menor capacidad de respuesta de daño al DNA debido a una alteración en el reclutamiento de los factores que intervienen en la maquinaria de reparación (Richards *et al.*, 2011; Camozzi *et al.*, 2014).

2.1.3.1.2. Acortamiento de los telómeros

Blasco *et al.* (1997) observaron el acortamiento de los telómeros durante el envejecimiento normal tanto en humanos como en ratones, y lo han relacionado a una disminución de la esperanza de vida. Se destaca en este punto el concepto de senescencia replicativa o límite de Hayflick (Hayflick y Moorhead, 1961) que implica la capacidad de proliferación limitada que tienen algunos tipos celulares cultivados *in vitro* como causa del agotamiento de los telómeros. Además de la senescencia replicativa mediada por la longitud de los telómeros, se ha demostrado en células humanas que el acortamiento de los telómeros afecta la regulación génica, en particular de genes localizados en regiones cromosómicas cercanas a los extremos (Stadler *et al.*, 2013; Robin *et al.*, 2014).

Debido a que la capacidad de reparación del DNA es restringida en los telómeros, el daño que se acumula en la región telomérica es persistente y altamente eficiente en la inducción de senescencia y/o apoptosis celular (Fumagalli *et al.*, 2012; Hewitt *et al.*, 2012). Los telómeros están unidos al complejo de proteínas denominadas *shelterin* (Palm y Delange, 2008), cuya

función principal consiste en no permitir el acceso de las proteínas de reparación del DNA e impedir así la fusión de los cromosomas. La pérdida de los componentes del complejo *shelterin* se caracteriza por el deterioro rápido de la capacidad regenerativa de los tejidos y un envejecimiento acelerado, fenómeno que ocurre aún en presencia de telómeros con una longitud normal (Martínez y Blasco, 2010). La asociación del factor repetición de unión a los telómeros 2 (TRF2), miembro principal del complejo *shelterin*, con las secuencias teloméricas es estabilizada mediante su localización conjunta con las láminas de tipo A. Las mutaciones en gen *LMNA* pueden generar la alteración de esta asociación con TRF2 y determinar la pérdida de regiones teloméricas (Wood *et al.*, 2014). A su vez, Cao *et al.*, (2011) demostraron que la expresión ectópica de progerina (precursor aberrante de Lamin A que causa HGPS) en fibroblastos normales determina una acumulación de daño al DNA en la región telomérica y una senescencia celular acelerada. Un meta análisis realizado en humanos apoya la existencia de una fuerte relación entre los telómeros cortos y el riesgo de mortalidad, particularmente en individuos de edades más jóvenes (Boonekamp *et al.*, 2013). Los telómeros cortos bloquean la capacidad proliferativa de las células madre, afectando su potencial para regenerar los tejidos, desencadenando el desarrollo de enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Martínez y Blasco, 2017).

2.1.3.1.3. Alteraciones epigenéticas

Los cambios epigenéticos afectan a todas las células a lo largo de la vida (Talens *et al.*, 2012), e implican alteraciones en los patrones de metilación del DNA, modificación post-traducciona l de las histonas y remodelación de la cromatina (López-Otín *et al.*, 2013). No obstante, aún no se ha dilucidado si las enzimas modificadoras de histonas pueden influir en el envejecimiento a través de mecanismos puramente epigenéticos, impidiendo la reparación del ADN y alterando la estabilidad del genoma, o se realiza a través de alteraciones transcripcionales que afecten vías metabólicas o de señalización fuera del núcleo (López-Otín *et al.*, 2013).

La remodelación de la cromatina desempeña un papel fundamental en la regulación de la expresión génica, con lo cual las modificaciones en la estructura de la cromatina que ocurren durante el envejecimiento se ha asociado con alteración del perfil de expresión génica (Chandra *et al.*, 2015). Las comparaciones basadas en estudios de microarrays de tejidos jóvenes y viejos de varias especies han identificado cambios transcripcionales relacionados con la edad en genes que codifican componentes claves de las vías inflamatorias, mitocondriales y las vías de degradación lisosómicas (de Magalhães *et al.*, 2009). Se ha observado además, que las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) derivadas de progeria pierden características específicas de

esta enfermedad, como por ejemplo, la expresión de progerina demostrando así que las marcas asociadas a la edad se pueden borrar o modificar (Lo Cicero y Nissan, 2015; Soria-Valles *et al.*, 2015).

2.1.3.1.4. Pérdida de la homeostasis proteica

Las células tienen mecanismos que les ayudan a mantener su estabilidad y funcionalidad, entre ellos se encuentran los procesos de macroautofagia, microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (Cuervo *et al.*, 2005; Klionsky *et al.*, 2016). Todos estos sistemas funcionan de manera coordinada para restaurar la estructura de las proteínas con un plegamiento incorrecto o para degradarlas y eliminarlas completamente, evitando así que se acumulen componentes dañados y asegurando la renovación continua de las proteínas intracelulares (López-Otín *et al.*, 2013).

Dado que la mayoría de las funciones celulares son desempeñadas por proteínas, se plantea que el envejecimiento ocurra al menos en parte, como consecuencia de la alteración de la regulación de la homeostasis proteica (Höhn *et al.*, 2017). Numerosos estudios han demostrado que la homeostasis de los sistemas de degradación de proteínas se alteran con el envejecimiento (Koga *et al.*, 2011), debido a que las funciones de las células y del organismo en su conjunto se encuentra gradualmente comprometida, tanto en condiciones basales como en condiciones de estrés (Labbadia y Morimoto, 2015). Existen muchos ejemplos de enfermedades por acumulación crónica de proteínas con una conformación anómala, como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, cataratas (Powers *et al.*, 2009) entre otros. A su vez, existe evidencia de que el mantenimiento de la homeostasis proteica es uno de los procesos clave para mantener la longevidad (Susmita y Cuervo, 2015).

2.1.3.2. Marcadores antagónicos: de respuesta al daño que sufre la célula.

2.1.3.2.1. Alteración en la regulación de la detección de nutrientes

López-Otín *et al.*, (2013) destacan en este punto la vía de señalización de la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), así como otros sistemas de detección de nutrientes: mTOR, AMPK y Sirtuinas. Ratones con disfunción de los telómeros muestran una marcada deficiencia en la vía de señalización IGF-1-mTOR y alteración de la homeostasis energética (Missios *et al.*, 2014), esta vía de señalización de la insulina e IGF-1 se encuentra estrechamente relacionada con el envejecimiento (Lin *et al.*, 1997; Ogg *et al.*, 1997; Kenyon, 2010). La evidencia actual apoya firmemente la idea de que la señalización anabólica acelera el envejecimiento y la disminución de la señalización de nutrientes prolonga la longevidad (Fontana

et al., 2010).

2.1.3.2.2. Disfunción mitocondrial

Los autores engloban aquí tres ítems: las especies reactivas del oxígeno (ROS), la integridad mitocondrial y biogénesis, y la mitohormesis.

Las mitocondrias disfuncionales pueden contribuir al envejecimiento independientemente de ROS. Las disfunciones mitocondriales durante el envejecimiento también están relacionadas con la hormesis. De acuerdo con este concepto, los tóxicos que generan daños leves desencadenan respuestas compensatorias beneficiosas que determinan la reparación del daño desencadenante y producen realmente una mejora en la aptitud celular en comparación con las condiciones previas a la generación del daño. Por lo tanto, aunque la disfunción mitocondrial severa es patológica, las deficiencias leves de la cadena respiratoria podrían aumentar la esperanza de vida (Haigis e Yanker, 2010).

En cuanto a ROS, este puede considerarse como una señal de supervivencia estimulada por el estrés conceptualmente similar a adenosina monofosfato (AMP) o el dinucleótido de nicotinamida y adenosina (NAD⁺). En este sentido, el efecto primario de ROS será la activación de respuestas homeostáticas compensatorias. A medida que avanza la edad cronológica, el estrés y el daño celular aumentan y los niveles de ROS aumentan paralelamente en un intento de mantener la supervivencia. Más allá de un determinado umbral, los niveles de ROS traicionan su propósito homeostático original y eventualmente agravan, en lugar de mejorar el daño asociado con la edad (Hekimi *et al.*, 2011).

2.1.3.2.3. Senescencia celular

Aunque el envejecimiento involucra diferentes marcadores independientes (aunque interrelacionados), como han propuesto López-Otín *et al.*, (2013), que intervienen a nivel molecular, celular y del organismo en su conjunto, la senescencia es un contribuyente mayor en este proceso (Höhn *et al.*, 2017). La senescencia celular inicialmente descrita por Hayflick y Moorhead (1961) como fenómeno de senescencia replicativa debido al acortamiento de los telómeros, puede definirse como una detención estable del ciclo celular y pérdida de su capacidad replicativa, asociada a cambios fenotípicos característicos (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007; Collado *et al.*, 2007; Kuilman *et al.*, 2010; van Deursen, 2014). Estos cambios fenotípicos incluyen aumento de tamaño de la célula, así como incremento en la acumulación de proteínas intra-celulares (Kurz *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2009), mayor volumen del núcleo celular y aumento de los lisosomas con elevada actividad de la proteína asociada a senescencia β -galactosidasa (SA- β -gal), uno de los marcadores más utilizados para la identificación de

senescencia (Kurz *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006). Numerosos estímulos asociados al paso del tiempo pueden desencadenarla, López-Otín *et al.*, (2013) citan principalmente e independientemente del daño a nivel de los telómeros, el daño en otras regiones del DNA y la alteración de la regulación del locus INK4/ARF (Collado *et al.*, 2007).

La senescencia, sin embargo, no es un proceso generalizado en todos los tejidos del organismo, debido a que hay órganos como corazón, músculo esquelético y riñones que no presentan un aumento en el porcentaje de senescencia en sus células con el envejecimiento fisiológico (Wang *et al.*, 2009). López-Otín y colaboradores (2013), proponen a la senescencia celular como una respuesta inicial al daño compensatoria o beneficiosa, que se convierte en deletérea y acelera el envejecimiento cuando los tejidos agotan su capacidad regenerativa.

2.1.3.3. Marcadores de integración: responsables finales de los fenotipos.

2.1.3.3.1. Agotamiento del nicho de células madre

El proceso de envejecimiento se acompaña de la disminución en la capacidad de regeneración de los tejidos y de la capacidad de homeostasis celular, debido a la alteración de la función de las células madre (Behrens *et al.*, 2014; Carrero *et al.*, 2016). La acumulación de progerina reduce la capacidad de proliferación y diferenciación de las células multipotentes y pluripotentes tanto en ratones como en humanos (Rosengardten *et al.*, 2011; Pacheco *et al.*, 2014). El agotamiento de las reservas de células madre se desarrolla como la consecuencia integradora de múltiples tipos de daños asociados con el envejecimiento y constituye probablemente uno de los responsables finales del envejecimiento de los tejidos y de los organismos en general (López-Otín *et al.*, 2013; Behrens *et al.*, 2014; Carrero *et al.*, 2016).

2.1.3.3.2. Alteración en la comunicación intercelular

El envejecimiento no es un fenómeno exclusivamente intra-celular, sino que está íntimamente relacionado a una alteración general en la comunicación inter-celular. Fenómenos como la inflamación pueden alterar la comunicación inter-celular generando un ambiente pro-inflamatorio a su alrededor (término al que se ha denominado en inglés *inflammaging*) (Salminen *et al.*, 2012), o alterar otras rutas metabólicas como la autofagia y contribuir al envejecimiento (López-Otín *et al.*, 2013). Los cambios relacionados con el envejecimiento en un tejido pueden conducir al deterioro específico de otros tejidos, así como también existe evidencia de que la secreción de factores a nivel de la circulación puede alterar estas señales y mejorar los fenotipos de envejecimiento (Conboy *et al.*, 2005; Villeda *et al.*, 2011; Loffredo *et al.*, 2013). De hecho, se ha descrito que las células senescentes exhiben un fenotipo de secreción asociado a

senescencia que se caracteriza por la secreción de niveles aumentados de factores que alteran el microambiente de forma paracrina, contribuyendo a aumentar aún más la senescencia y activando la vigilancia inmunológica (Carrero *et al.*, 2016). Este proceso está regulado principalmente por NF- κ B (Acosta *et al.*, 2013), cuya activación induce el aumento de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias que contribuyen al proceso de envejecimiento (Osorio *et al.*, 2012; Jurk *et al.*, 2014).

En la figura 5 se resumen de forma esquemática los cambios generales que suceden durante el envejecimiento celular, como consecuencia de todas las alteraciones anteriormente descritas.

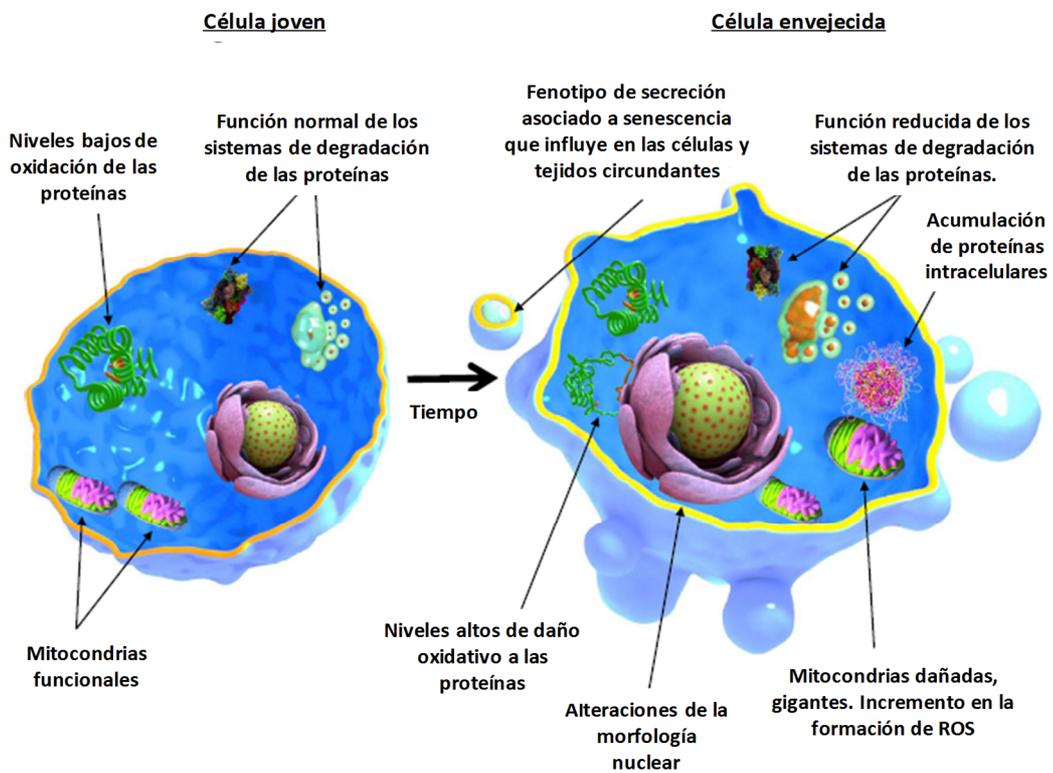


Figura 5. Esquema de las alteraciones que ocurren a nivel celular durante el envejecimiento. Modificado de Höhn *et al.*, 2017.

2.1.4. Patologías asociadas con el envejecimiento prematuro y su relación con el envejecimiento fisiológico.

Los síndromes progeroides constituyen un grupo de enfermedades muy heterogéneas desde el punto de vista clínico, en las que característicamente se produce el desarrollo prematuro de fenotipos o rasgos de envejecimiento, que determinan una reducción considerable de la longevidad de los individuos, así como en su calidad de vida. Estos síndromes progeroides han resultado ser valiosas herramientas para comprender los mecanismos moleculares que gobiernan el envejecimiento humano (Burtner *et al.*, 2010; Trigueros-Motos *et al.*, 2011). Basados en los síndromes progeroides se han desarrollado modelos experimentales humanos *in vitro* que tienen la ventaja de que sólo requieren días o semanas para la manifestación de los fenotipos asociados con el envejecimiento celular en las células progeroides, a diferencia de las muchas décadas necesarias para alcanzar el envejecimiento humano fisiológico.

Entre los genes asociados con las enfermedades progeroides, el gen *LMNA* es responsable de al menos 10 enfermedades diferentes que se denominan laminopatías (Capell *et al.*, 2006). La mayoría de las laminopatías tienen un origen genético, como el síndrome de Hutchison-Gilford Progeria (HGPS), enfermedad que se caracteriza por una mutación puntual en el gen *LMNA*. Sin embargo, otros como el síndrome lipodistrófico asociado con el uso de inhibidores de la proteasa del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) que interfieren con el procesamiento correcto de lamin A son adquiridos (Caron *et al.*, 2003). HGPS y las laminopatías asociadas a *LMNA* se caracterizan por la acumulación de los productos génicos aberrantes de *LMNA*: progerina y prelamin A, respectivamente. Estas acumulaciones patológicas causan una estructura nuclear anormal y alteran funciones biológicas que preceden a los fenotipos de envejecimiento prematuro (Schreiber *et al.*, 2013). El vínculo entre estos síndromes de envejecimiento prematuro patológico con el envejecimiento fisiológico ha adquirido especial relevancia debido a que se ha demostrado que se acumula progerina (Scaffidi y Misteli, 2006) y la presencia de niveles bajos de prelamin A en células envejecidas fisiológicamente (Ragnauth *et al.*, 2010). Como se esquematiza en la figura 6, modificada de Trigueros-Motos *et al.* (2011), se compara el envejecimiento fisiológico (asociado con la acumulación de bajas concentraciones de prelamin A en las células del organismo) y el envejecimiento prematuro (en pacientes con progeria). Las similitudes a nivel celular y molecular de estos dos modelos nos demuestra la existencia de un amplio campo de investigación que puede llevar a identificar en última instancia los mecanismos responsables del envejecimiento y consecuentemente desarrollar estrategias dirigidas a aumentar el tiempo de vida libre de enfermedad.

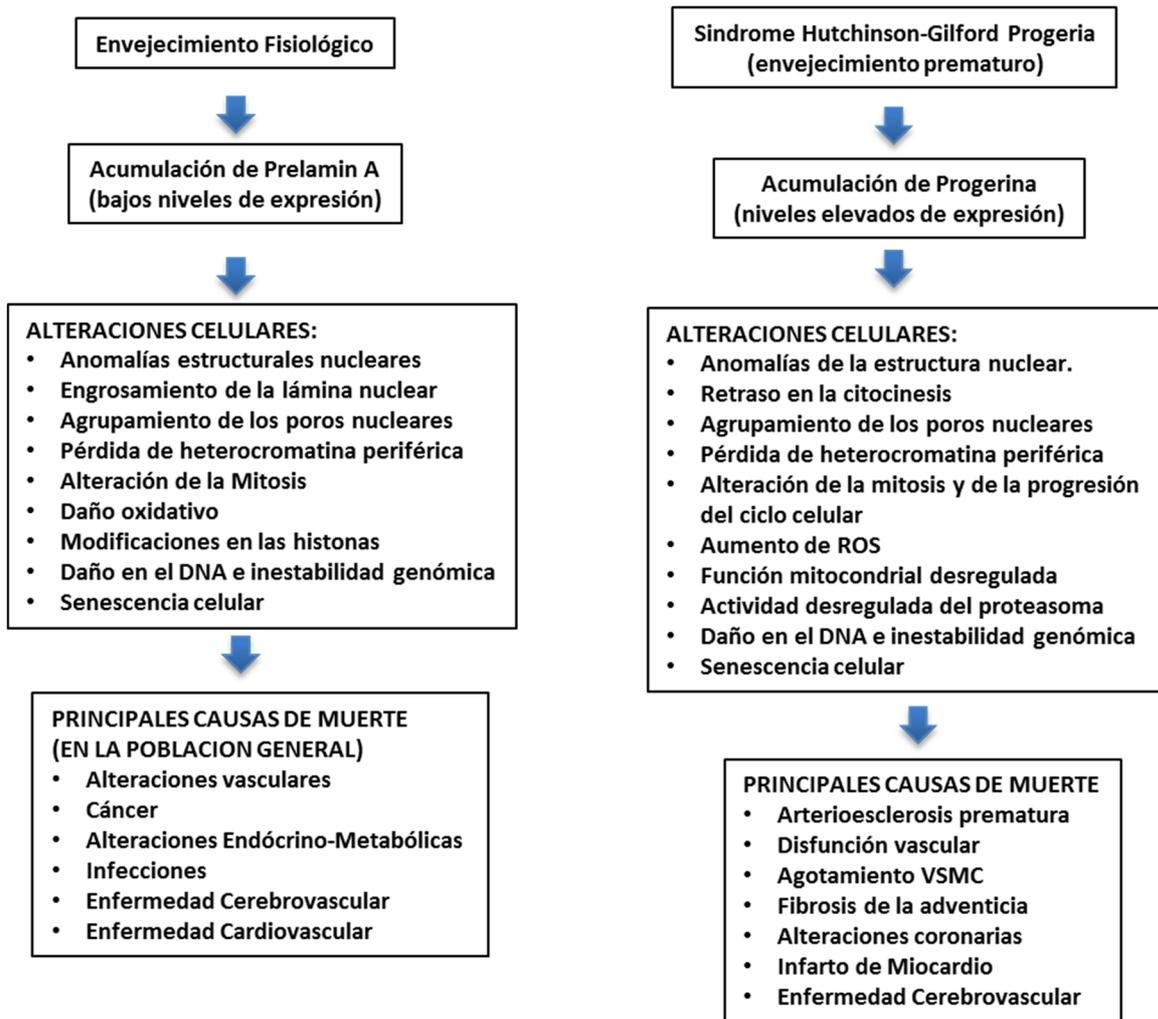


Figura 6. Esquema de las alteraciones que se producen en los pacientes, asociadas al envejecimiento fisiológico y patológico. ROS: especies reactivas del oxígeno. VSMC: células del músculo liso vascular. Modificado de Trigueros-Motos *et al.*, 2011.

2.2. LÁMINA NUCLEAR Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS

2.2.1. Lámina nuclear

La lámina nuclear es uno de los tres componentes de la envoltura nuclear, conjuntamente con el complejo de poros nucleares y la membrana nuclear. Es una red tridimensional de filamentos intermedios del tipo V compuesta de proteínas llamadas, láminas situadas por dentro de la envoltura nuclear de todas las células somáticas (Figura 7) (Albi *et al.*, 1986; Broers *et al.*, 2006; Dechat *et al.*, 2008).

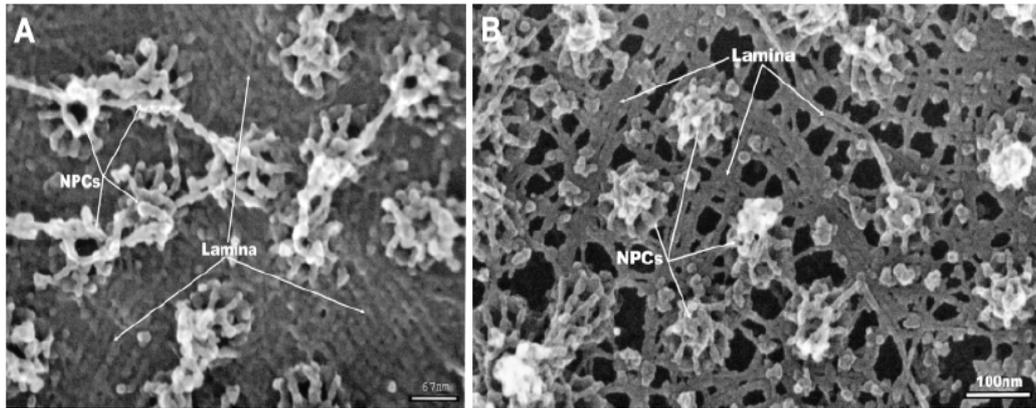


Figura 7. Morfología de la Lámina Nuclear. Imágenes de microscopía de barrido que muestran la organización de la lámina nuclear de vesículas germinales de oocitos de *Xenopus* sometidas a diferentes condiciones de fijación (A y B). Se observan los filamentos de la lámina nuclear que se extienden entre los complejos de poros nucleares (NPC). Imagen obtenida de Broers *et al.*, 2006).

En los organismos vertebrados existen dos clases de láminas: tipo A y tipo B, que se polimerizan para formar la lámina nuclear de la membrana nuclear interna. Las láminas tipo A (láminas A y C) están codificadas por el gen *LMNA* (Lin y Worman, 1993); mientras que las láminas de tipo B (láminas B1 y B2) están codificadas por los genes *LMNB1* y *LMNB2* respectivamente (Biamonti *et al.*, 1992; Lin y Worman, 1995). Aunque las láminas de tipo B se expresan en todas las células somáticas, las láminas tipo A y C están ausentes en las células madre embrionarias (Stewart *et al.*, 1987; Constantinescu *et al.*, 2006). Las laminas de tipo A son determinantes clave de la arquitectura nuclear, proporcionando una plataforma para la organización de las funciones nucleares (Dechat *et al.*, 2010; Wilson y Foisner, 2010). La lámina nuclear ayuda a mantener la forma del núcleo proporcionando estabilidad y rigidez contra el estrés mecánico, ya que está involucrada en la distribución de los poros nucleares, desempeñando un papel importante en el transporte bidireccional de moléculas del citoplasma al núcleo y viceversa (Wilson y Foisner, 2010; Verstraeten *et al.*, 2007, Broers *et al.*, 2006). Aunque inicialmente se pensó que la función de la lámina se limitaba a proporcionar estabilidad mecánica al núcleo celular, la literatura de la última década la ha implicado en una amplia variedad de funciones. Por lo tanto, además de su función estructural la evidencia actual indica que la lámina nuclear modula la expresión génica ya sea por interacción directa con la cromatina (Verstraeten *et al.*, 2007; Lattanzi *et al.*, 2007; Reddy *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009), o reteniendo factores de transcripción en la periferia nuclear (Capanni *et al.*, 2005; Ivorra *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008; Ruiz de Eguino *et al.*, 2012; Kubben *et al.*, 2016). Las laminas de tipo A actúan como andamios para proteínas que regulan la síntesis de DNA, la respuesta al daño al DNA, la organización de la cromatina, la transcripción génica, la progresión del ciclo celular, la migración y diferenciación celular (Gruenbaum *et al.*, 2005; Broers *et al.*, 2006; Verstraeten *et al.*, 2007;

Andrés *et al.*, 2009, Wilson y Foisner, 2010; Burke y Stewart, 2013). Por tanto, la lámina nuclear desempeña funciones tanto estructurales como de regulación (Figura 8).

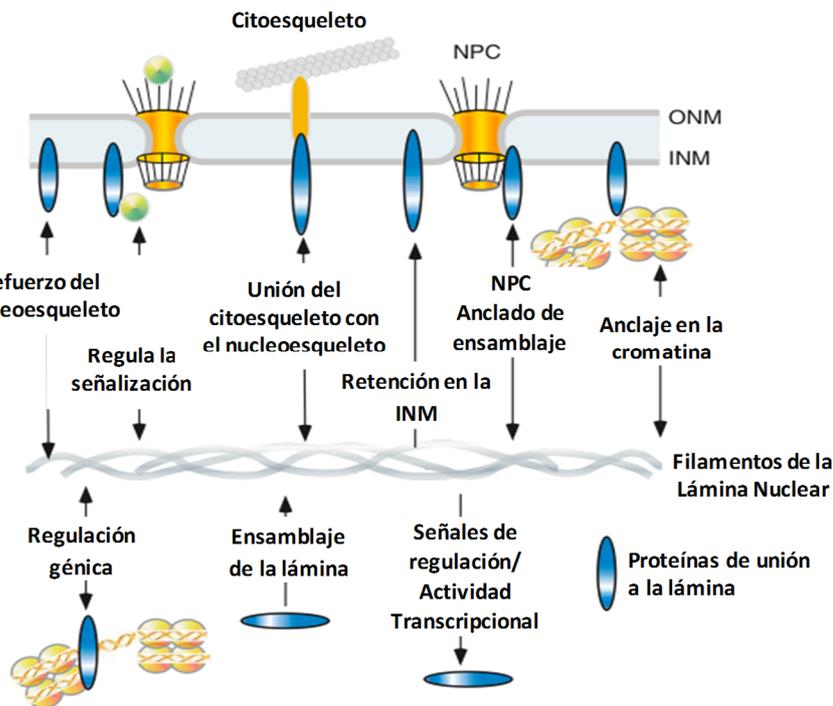


Figura 8. Modelo de la localización de las láminas nucleares y su interacción con las diversas moléculas intranucleares. La lámina se une directamente a las proteínas de unión a la lámina nuclear, que podrían estar localizadas en la membrana nuclear interna (INM), en la cromatina o en el nucleoplasma. Estas proteínas de unión a la lámina nuclear tienen funciones mecánicas y estructurales, tales como reforzar el nucleoesqueleto, interconectar el nucleoesqueleto y el citoesqueleto, anclar los complejos de poros nucleares (NPC) y restringir la cromatina a la envoltura nuclear. Algunas de ellas regulan la señalización o la transcripción génica. Muchas proteínas de unión a la lámina requieren de las láminas para su correcta localización, mientras que otras regulan o facilitan el ensamblaje de la lámina nuclear. Abreviaturas: ONM, membrana nuclear externa; INM, membrana nuclear interna; NPC, complejo de poros nucleares. Esquema modificado de Wilson y Foisner, 2010.

2.2.2. Procesamiento de prelamin A.

El gen *LMNA* codifica las láminas de tipo A, mediante el corte y empalme alternativo de un solo RNA mensajero (mRNA), produciendo cuatro proteínas: láminas A y C como productos principales, y las láminas minoritarias A Δ 10 y C2. Este gen consta de 12 exones, se encuentra en el cromosoma 1 (1q21.1-21.3) y se expresa en la mayoría de las células somáticas diferenciadas (Broers *et al.*, 2006). La lámina C es similar a la lámina A, pero pierde parte de los exones (10, 11 y 12), y tiene cinco aminoácidos básicos únicos. Lámina A Δ 10 pierde parte del exón 10 y se ha encontrado en líneas celulares tumorales y en algunas líneas celulares normales, mientras que la lámina C2 es específica de la línea germinal (Broers *et al.*, 2006). En las células somáticas de mamíferos, las laminas de tipo A están representadas por las laminas A y C que se originan a partir del corte y empalme alternativo del gen *LMNA* y sólo difieren en su dominio carboxilo

terminal. En individuos sanos prelamina A es el producto intermedio de traducción del mRNA de la proteína lamin A madura. Tiene un motivo de finalización CaaX (donde "C" es una cisteína, "a" es a menudo un aminoácido alifático, y "X" es uno de muchos residuos diferentes). El motivo CaaX desencadena tres modificaciones enzimáticas secuenciales (Clarke, 1992; Zhang y Casey, 1996) (Figura 9).

En el primer paso de la maduración de la proteína lamin A, se añade un lípido farnesilado de 15 carbonos al residuo de cisteína por la enzima farnesiltransferasa (FTasa). Después de la farnesilación (que es una forma de prenilación de las proteínas) de prelamina A, los últimos tres aminoácidos (-aaX) son eliminados por una endoproteasa específica para proteínas preniladas. Para las proteínas lamin B1 y otras con motivo CaaX, esta etapa de procesamiento proteolítico es llevada a cabo por un homólogo de la proteína peptidasa de prenilación (*prenylproteinpeptidase*, RCE1) (Maske *et al.*, 2003). En el caso de prelamina A, este paso es probablemente una función redundante de RCE1 y la metalopeptidasa de zinc STE24 (ZMPSTE24) (Bergo *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2005; Corrigan *et al.*, 2005).

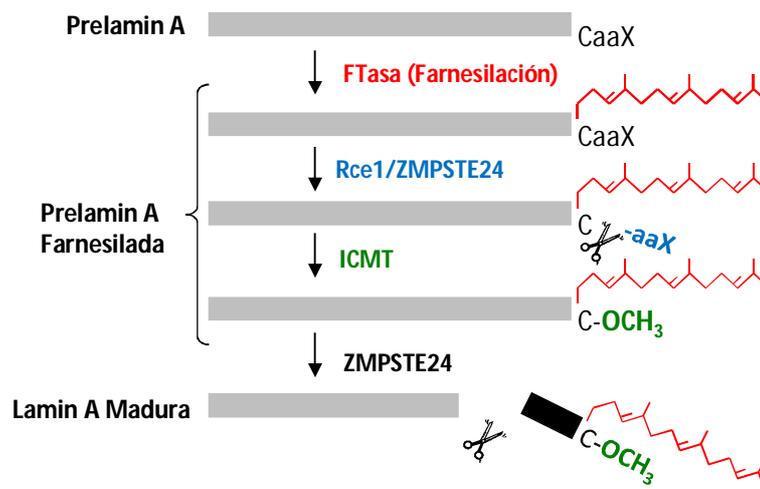


Figura 9. Representación esquemática de las modificaciones que se suceden en el procesamiento post-traduccional de prelamina A.

A continuación, la farnesil-cisteína recién expuesta es metilada por una metiltransferasa de membrana, la isoprenilcisteína carboximetil transferasa (ICMT) (Clarke *et al.*, 1992; Dai *et al.*, 1998). Los últimos 15 aminoácidos de prelamina A, incluyendo el α -metil éster de farnesil-cisteína, son escindidos por la enzima ZMPSTE24 y degradados, generando la forma final madura de la proteína: lamin A (Weber *et al.*, 1989; Beck *et al.*, 1990; Young *et al.*, 2005). Es importante destacar que esta etapa final de procesamiento endoproteolítico no se produce en ausencia de

ZMPSTE24, lo que indica que la función de esta metalopeptidasa es esencial y necesaria para el procesamiento final de prelamin A (Bergo *et al.*, 2002; Pendás *et al.*, 2002). Cabe aquí hacer una digresión y señalar que el símbolo oficial actual aprobado por el HGNC (*HUGO Gene Nomenclature Committee*) de acuerdo con las guías para la nomenclatura de genes humanos para la metalopeptidasa de zinc STE24 es *ZMSPTE24*. Esta enzima originalmente fue descrita como FACE-1 por Freije *et al.* (1999), por lo que muchas veces se les llama indistintamente. En el presente trabajo de tesis se utilizará el símbolo oficial actual para evitar confusiones.

El significado fisiológico de este complejo proceso post-traducciona del gen *LMNA* permanece incierto. Inicialmente se hipotetizó que este proceso se llevaba a cabo para facilitar el direccionamiento de la prelamin A farnesilada a la envoltura nuclear, que posteriormente se escinde por ZMPSTE24 para eliminar los grupos farnesilo y producir una lámina A madura, capaz de ensamblarse a la lámina nuclear (Sinensky *et al.*, 1994). Sin embargo, trabajos posteriores han demostrado en fibroblastos embrionarios y queratinocitos de ratón, que la incorporación al núcleo celular por parte de prelamin A no depende de su farnesilación (Davies *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011).

2.2.3. Laminopatías

Las mutaciones en el gen *LMNA*, así como alteraciones en factores esenciales para el procesamiento de su proteína Lamin A (por ejemplo, mutaciones en el gen *ZMPSTE24*), son responsables de más de diez enfermedades diferentes denominadas laminopatías, que incluyen tanto trastornos con afectación sistémica como enfermedades restringidas a un tipo tisular (Capell *et al.*, 2006; Verstraeten *et al.*, 2007; Broers *et al.*, 2006). Las laminopatías asociadas a *LMNA* incluyen principalmente al síndrome de Hutchinson-Gilford Progeria (HGPS), la Displasia Mandibulo Acral de tipo A (MADA), la Dermopatía Restrictiva (RD), el Síndrome Werner atípico, la Lipodistrofia familiar parcial tipo Dunningan (FPLD2) y la lipodistrofia generalizada de inicio en la pubertad (Novelli *et al.*, 2002; de Sandre-Giovannoli *et al.*, 2003; Eriksson *et al.*, 2003; Jeninga *et al.*, 2010; Villarroya *et al.*, 2010). En el caso de algunas lipodistrofias parciales, como las lipodistrofias adquiridas y algunas congénitas (MADB), se inhibe la actividad de ZMPSTE24 lo que determina la acumulación anómala de prelamin A farnesilada (Agarwal *et al.*, 2003; Coffinier *et al.*, 2007) (Figura 10).

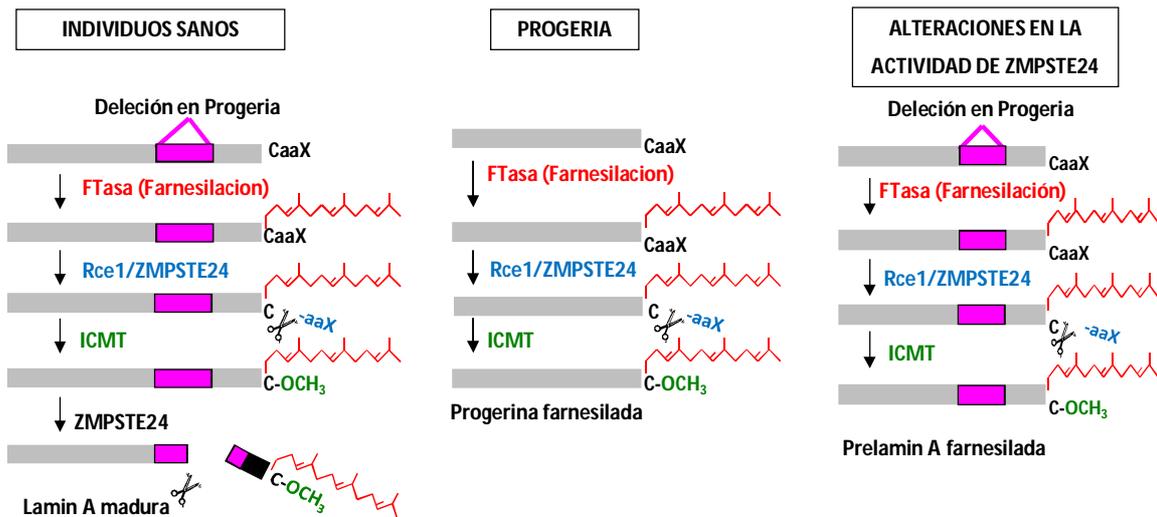


Figura 10. Maduración de la proteína Lamin A y formación de progerina y prelamin A permanentemente farnesiladas. La región suprimida en progerina se destaca en color rosa.

Las mutaciones en el gen *LMNA* son extremadamente pleiotrópicas, causando diferentes fenotipos dependiendo de la mutación en el gen (Tabla 1). De hecho, la misma mutación puede ser asociada con diferentes formas de la misma enfermedad (Garg *et al.*, 2011; Bidault *et al.*, 2011).

Tabla 1. Patologías más relevantes ligadas a *LMNA*.

Denominación	Símbolo	Nº OMIM	Tipo de Herencia
Cardiomiopatía Dilatada, tipo 1A	CMD1A	115200	AD
Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, tipo 2B1	CMT2B1	605588	AR
Distrofia muscular de Emery-Dreifuss 2	EDMD2	181350	AD
Distrofia muscular de Emery-Dreifuss 3	EDMD3	616516	AR
Síndrome del mano-corazón, tipo Esloveno	-	610140	AD
Progeria Hutchinson-Gilford	HGPS	176670	AR, AD
Lipodistrofia Familiar Parcial, tipo 2	FPLD2	151660	AD
Síndrome de Malouf	-	212112	AD
Displasia Mandibulo Acral	MADA	248370	AR
Distrofia Muscular Congénita	MDCL	613205	AD
Distrofia Muscular Proximal, tipo 1B	-	159001	AD
Dermopatía Restrictiva Letal	RD	275210	AR

AD: autosómico dominante. AR: autosómico recesivo. Modificada de *OMIM database. Johns Hopkins University*.

A continuación, haremos referencia a algunas de las laminopatías que presentan fundamentalmente fenotipos de envejecimiento, las cuales han ayudado a mejorar el conocimiento de los mecanismos subyacentes al envejecimiento humano (Burtner *et al.*, 2010).

2.2.3.1. Progeria

El Síndrome de *Hutchinson-Gilford* (HGPS: *Hutchinson-Gilford Progeria Síndrome*) o Progeria es el principal ejemplo de envejecimiento prematuro. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad comienzan alrededor del primer año de vida (Gordon *et al.*, 2003; Goldman *et al.*, 2004; Bidault *et al.*, 2011). Los niños no muestran ningún fenotipo al nacer, pero durante el primer año comienzan las primeras manifestaciones de esta enfermedad caracterizada por fracaso en el crecimiento, lipodistrofia generalizada, muy bajo peso corporal y estatura, características faciales de retrognatia, puente nasal estrecho y narices puntiagudas (similares a personas de edad avanzada), pérdida temprana del cabello, esclerodermia, contracturas de las articulaciones, cambios óseos, distrofia de las uñas y retraso en la erupción de los dientes primarios. Su desarrollo cognitivo es normal. A su vez, los hallazgos posteriores incluyen pérdida auditiva de conducción de baja frecuencia, apiñamiento dental y falta parcial de erupción secundaria de los dientes. La causa de muerte en la mayoría de estos pacientes es la enfermedad cardiovascular como resultado de complicaciones de aterosclerosis severa, enfermedad cardíaca (sobre todo infarto de miocardio) o enfermedad cerebrovascular. El promedio de vida de estos niños es de aproximadamente 14,6 años (Gordon *et al.*, 2014).

El diagnóstico de esta enfermedad letal se basa en el reconocimiento de características clínicas y en la detección de la mutación *LMNA* clásica c.1824C> T (p.Gly608Gly) o una de las tres mutaciones *LMNA* heterocigotas en los casos de HGPS atípica: c.1822 G > A (p.Gly608Ser), c.1821 G> A (p.Val607Val), o c.1968 + 1G> A. Estas mutaciones puntuales *de novo* interfieren con la conversión de prelamin A farnesilada a la forma madura de lamin A (Eriksson *et al.*, 2003; De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2003). Esto conduce a la producción de una forma truncada (o incompleta) de la proteína lamin A, debido a la delección interna de 50 aminoácidos en el dominio C-terminal de la misma. La secuencia que falta en esta mutación involucra al sitio de escisión proteolítico reconocido por la enzima ZMPSTE24. La proteína mutante que resulta, denominada progerina está permanentemente farnesilada y queda anclada en la membrana nuclear (Capeau *et al.*, 2010) (Figura 10).

Los mecanismos exactos responsables del proceso de envejecimiento prematuro de HGPS no se han dilucidado completamente, pero se ha demostrado que la acumulación gradual de progerina conduce a graves defectos en la arquitectura y la función del núcleo celular (Goldman *et al.*, 2004), impidiendo el reclutamiento de elementos de reparación del DNA (Dechat *et al.*, 2008) y otras proteínas reguladoras que conducen a una inestabilidad genómica (Liu *et al.*, 2005). Recientemente, Kubben *et al.* (2016) han señalado que la supresión de la respuesta antioxidante

mediada por el factor nuclear eritroide 2 (NRF2), es clave en la generación del envejecimiento prematuro en células de pacientes con HGPS. En dicho estudio han demostrado que progerina altera la actividad transcripcional de NRF2, secuestrándolo a nivel nuclear y generando como consecuencia un aumento del estrés oxidativo crónico, capaz de recapitular los fenotipos relacionados al envejecimiento que se observa en los pacientes con progeria. Más aún, la restauración de la actividad de NRF2 rescata los fenotipos de envejecimiento y la viabilidad *in vivo* de las MSC en un modelo animal (Kubben *et al.*, 2016).

Las mutaciones en *LMNA* pueden causar además alteraciones durante la mitosis como el des-ensamblaje incompleto de la envoltura nuclear, errores en la segregación de los cromosomas y formación de núcleos bilobulados (Cao *et al.*, 2007; Dechat *et al.*, 2007). La progerina afecta a su vez a las células madre mesenquimales alterando su diferenciación a los diversos linajes celulares de una manera específica (Scaffidi y Misteli, 2008). Esta observación es de suma importancia ya que los tejidos afectados en las laminopatías son principalmente de origen mesenquimal. La presencia de progerina altera la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales humanas (hMSC), como se ha demostrado en el estudio realizado por Scaffidi y Misteli (2008), donde describieron que la diferenciación a adipocitos a partir de hMSC se redujo notablemente en hMSC que expresaban progerina.

Varios estudios han detectado niveles bajos de expresión de progerina en células envejecidas fisiológicamente (Scaffidi y Misteli, 2006; McClintock *et al.*, 2007; Olive *et al.*, 2010). Se ha planteado la hipótesis de que la presencia de progerina sería desencadenada de alguna manera por el acortamiento de los telómeros y, por lo tanto, podría estar asociada a la senescencia celular (Cao *et al.*, 2011). No hay duda de que los nuevos hallazgos sobre las laminopatías, en particular las causadas por la producción de progerina, ampliarán el conocimiento sobre el proceso de envejecimiento. Esta es una de las razones por las que el estudio de las laminopatías es un área de investigación muy activa.

2.2.3.2. Displasia mandibulo acral tipo A

La displasia mandibulo acral tipo A (MADA) es un trastorno autosómico recesivo raro caracterizado por anomalías craneo-faciales con hipoplasia mandibular, retardo de crecimiento, voz aguda, pigmentación moteada de la piel, contracturas articulares y anomalías esqueléticas como osteolisis progresiva de clavículas y falanges distales (Agrawl *et al.*, 2006; Garg, 2004; Garg *et al.*, 2009; Garg, 2011). Algunos pacientes con MADA tienen características progeroides tales como atrofia de la piel, vasculatura superficial, alopecia, estatura baja y nariz puntiaguda. La pérdida de tejido adiposo acral con tejido adiposo normal o excesivo en la cara, el cuello y las

regiones troncales es una característica distintiva de esta enfermedad. (Agrawl et al., 2006; Garg et al., 2011; Simha y Garg, 2002). Muchos estudios sobre las bases moleculares de MADA enfatizan la variabilidad fenotípica que existe en pacientes que tienen mutaciones de *LMNA*. Novelli *et al.* identificaron una mutación homocigota (R527H) en el gen *LMNA* en 2002, asociada a este síndrome. También se han identificado mutaciones en la región C-terminal del gen *LMNA*, ambas heterocigotas (R472C / R527C), y homocigotas (A529V y K542N) (Cao y Hegele, 2003; Plasilova *et al.*, 2004). El mecanismo exacto por el cual la acumulación resultante de prelamin A provoca estas alteraciones fenotípicas no se ha dilucidado aún. Entre algunas de las numerosas alteraciones celulares asociadas a las mutaciones de *LMNA* en esta enfermedad se encuentran las interacciones de la cromatina, los cambios epigenéticos, la formación de invaginaciones o alteraciones estructurales nucleares, el ensamblaje anómalo de la lámina nuclear y la disminución de la resistencia al estrés mecánico (Filesi *et al.*, 2005; Capanni *et al.*, 2012).

2.2.3.3. Displasia mandibulo acral tipo B

La displasia mandibulo acral con lipodistrofia tipo B es una forma generalizada de lipodistrofia, causada por mutaciones heterocigotas en el gen *ZMPSTE24* (Agarwal *et al.*, 2003). *ZMPSTE24* codifica la metaloproteinasa de zinc implicada en el procesamiento proteolítico post-traduccional de lamin A, cuya alteración resulta en la acumulación de prelamin A farnesilada (Agarwal *et al.*, 2003; Garg A, 2011; Yaou *et al.*, 2011). Los pacientes presentan características similares a las descritas anteriormente en MADA. Las características distintivas de MADB incluyen el nacimiento prematuro, inicio temprano de manifestaciones, enfermedad renal, nódulos calcificados en la piel y la falta de acantosis *nigricans*, a pesar de asociarse con resistencia a la insulina y sus complicaciones metabólicas (Ahmad *et al.*, 2010; Garg A, 2011).

2.2.3.4. Dermopatía restrictiva letal

La dermatopatía restrictiva letal es una genodermatosis rara con manifestaciones características que son fácilmente reconocibles al nacer: piel translúcida delgada, firmemente adherida con erosiones en sitios de flexión, vascularización superficial, dimorfismo facial típico y anquilosis articular generalizada. Los signos prenatales pueden incluir retardo del crecimiento intrauterino, reducción de los movimientos fetales, poli hidramnios y rotura prematura de las membranas. La mayoría de los niños mueren en la primera semana de vida (Smigiel *et al.*, 2010). Las mutaciones que causan esta enfermedad son variables. En 2 de 9 casos con dermatopatía restrictiva, Navarro *et al.* (2004) identificaron mutaciones heterocigotas de corte y empalme en el gen *LMNA*, resultando en la pérdida completa o parcial del exón 11. En los otros 7 pacientes, identificaron una inserción heterocigota de 1 pb que generaba un codón de finalización

prematureo en el gen *ZMPSTE24*. Esta metaloproteinasas está específicamente implicada en el procesamiento post-traduccionales del precursor de lamin A. De hecho, en todos los pacientes que tenían una mutación en *ZMPSTE24* se observó la pérdida de expresión de la lamin A, así como los fenotipos asociados de alteraciones en el tamaño y la forma del núcleo, errores en el ensamblaje de la lámina nuclear y alteraciones en las proteínas asociadas a las láminas. Navarro *et al.* (2004) concluyeron que los defectos de la lámina nuclear son los causantes del fenotipo en la dermatopatía restrictiva letal.

2.2.3.5. Lipodistrofia asociada al VIH

La lipodistrofia relacionada con el VIH es la forma más frecuente de laminopatía adquirida. La prevalencia de esta enfermedad varía dependiendo de los diferentes estudios, se estima entre un 20 a un 80% de las personas infectadas por el VIH, por lo cual, de 5 a 10 millones de personas pueden desarrollar esta enfermedad (Chen *et al.*, 2002; Informe de UNAIDS 2012). Las características clínicas de la lipodistrofia relacionada con el VIH son fundamentalmente la pérdida de tejido adiposo en la cara, los brazos, los glúteos y las piernas. Los pacientes también pueden adquirir depósitos de grasa anormales en el tronco y parte superior de la espalda, así como el cuello que se conoce como «joroba de búfalo» (Capeau *et al.*, 2010; Garg A, 2011; Palchetti *et al.*, 2013). Además, los pacientes infectados por el VIH presentan rasgos de envejecimiento prematuro que afectan el hueso, el cerebro, las paredes vasculares, los músculos, el riñón y el hígado. Aunque los mecanismos siguen siendo poco claros, la infección por el VIH de larga evolución, el agotamiento de las reservas inmunológicas y los efectos adversos de algunos antirretrovirales están claramente involucrados (Caron-Debarle *et al.*, 2010). Debido a que es una enfermedad compleja, es difícil asegurar la contribución de diversos factores en su etiología. Sin embargo hay evidencia inequívoca sobre el papel desempeñado por los medicamentos utilizados en el tratamiento de la infección por el VIH. Desde 1996, poco después de la introducción de los inhibidores de la proteasa (IP) en la terapia antirretroviral, se informó que los pacientes tratados desarrollaron lipodistrofia (Grinspoon y Carr, 2005). Los inhibidores de proteasas son fármacos fundamentales en la terapia antirretroviral altamente activa (HAART), ya se ha demostrado que mejora la supervivencia de los pacientes infectados por el VIH. Los IP bloquean la aspartil proteasa del VIH, una enzima esencial para la replicación viral (Coffinier *et al.*, 2007). Sin embargo, algunos de estos IP interfieren además en el procesamiento de lamin A (Caron *et al.*, 2003) inhibiendo la actividad de la proteasa *ZMPSTE24* (Coffinier *et al.*, 2007). Esta inhibición conduce a una acumulación significativa de prelamin A farnesilada como efecto secundario.

2.2.4. Modelos murinos relevantes para el estudio de las laminopatías asociadas a fenotipos de envejecimiento

Los modelos animales y especialmente los murinos han desempeñado un papel fundamental en la comprensión y el estudio de varias enfermedades humanas. Específicamente con respecto a las laminopatías, se han hecho progresos considerables en el conocimiento de cómo las mutaciones en un solo gen pueden producir un espectro tan amplio de fenotipos, gracias a los abundantes modelos en ratón de laminopatías que se han generado (Capell y Collins, 2006), tal y como se resume en la tabla 2. Los cuales han permitido identificar las bases moleculares y ampliar así el conocimiento sobre la fisiopatología de estas enfermedades (Benavides & Guénet, 2001). Más aún, en algunos casos estos modelos murinos (Yang *et al.*, 2006; Capell *et al.*, 2008) han sido cruciales para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que han sido evaluadas posteriormente en ensayos clínicos de pacientes con progeria (Gordon *et al.*, 2012; Gordon *et al.*, 2014; Gordon *et al.*, 2016).

Tabla 2. Principales modelos de ratón utilizados para el estudio de laminopatías asociadas a fenotipos de envejecimiento.

Modelo	Fenotipo	Comentarios	Bibliografía
<i>Lmna</i> ^{-/-}	Normal al nacer, presentan retraso en el crecimiento, distrofia muscular y cardiomiopatía, con letalidad postnatal.	La vía de mTORC1 está regulada positivamente en el músculo esquelético y en el músculo cardíaco del ratón. El tratamiento de los ratones mutantes con rapamicina, un inhibidor de mTOR, fue capaz de revertir la señalización aumentada de la vía de mTORC1, rescatando la función del músculo cardíaco y esquelético, así como de prolongar la vida de los ratones.	Ramos <i>et al.</i> , 2012.
G608G	No muestra características externas de progeria. Pérdida progresiva de células del músculo liso vascular de la capa media de las grandes arterias.	El fenotipo está limitado a las células del músculo liso vascular por lo que se ha propuesto que estas regiones son más susceptibles al estrés mecánico.	Varga <i>et al.</i> , 2006.
<i>Lmna</i> ^{L530P/L530P (1)} y <i>Lmna</i> ^{Δ9/Δ9 (1)}	Completa ausencia de grasa subcutánea, retraso severo del crecimiento, degeneración del músculo cardíaco y esquelético, reducción de vida útil de los fibroblastos, dentición anormal.	Un esfuerzo para crear un modelo de ratón de Distrofia Muscular de Emery Dreifuss autosómico dominante, dio lugar a un modelo de ratón de progeria.	Mounkes <i>et al.</i> , 2003.
	La misma patología asociada con progeria. Señalización defectuosa de las vías Wnt, afectando la síntesis de la matriz extracelular.	Establecimiento de un enlace funcional entre la lamin A y la matriz extracelular.	Hernández <i>et al.</i> , 2010.
<i>Zmpste24</i> ^{-/-}	Retraso del crecimiento y muerte prematura. Cardiomiopatía, distrofia muscular, fracturas óseas y lipodistrofia.	Identificación de prelamin A como sustrato específico de Zmpste24.	Pendás <i>et al.</i> , 2002.
	Fenotipo progeroide, menor pérdida de grasa subcutánea, fracturas costales.	FTI podría rescatar algunos fenotipos de envejecimiento.	Fong <i>et al.</i> , 2006.
	Fenotipo progeroide, retraso del crecimiento, senescencia celular aumentada, disminución de la supervivencia del ratón, alteración del perfil de expresión génica.	La acumulación de prelamin A en la envoltura nuclear es la responsable de las alteraciones fenotípicas observadas en el modelo de ratón, incluyendo las características progeroides.	Varela <i>et al.</i> , 2005.

		Rescate parcial de fenotipos progeroides.	
	Fenotipo progeroide, con disminución marcada del peso corporal y la densidad mineral ósea de los ratones, así como alteraciones en la morfología nuclear celular.	El tratamiento combinado con estatinas y amino-bifosfonatos rescata los fenotipos de envejecimiento y prolonga la vida de los ratones.	Varela <i>et al.</i> , 2008.
	Retraso del crecimiento y muerte prematura. Cardiomiopatía, distrofia muscular, fracturas óseas y lipodistrofia.	Los ratones muestran una hipermetilación del DNA ribosomal que se puede revertir; así como una hipoacetilación global de las histonas H2B y H4 que altera la expresión génica, contribuyendo al fenotipo progeroide.	Osorio <i>et al.</i> , 2010
	Retraso del crecimiento y muerte prematura. Cardiomiopatía, distrofia muscular, fracturas óseas y lipodistrofia.	miR-29 es un micro-RNA que se acumula durante el envejecimiento.	Ugalde <i>et al.</i> , 2011.
	Fenotipo severo de progeria.	Rescate del fenotipo de envejecimiento mediante la expresión aumentada de la acetiltransferasa de histonas <i>Mof</i> o por la inhibición de la desacetilasa de histonas.	Krishnan <i>et al.</i> , 2011.
	Los ratones se desarrollaron normalmente y fueron fértiles.	Prelamin A tiene una baja expresión en el neuronas o células de la glia, probable razón por la cual los pacientes con HGPS no muestran deterioro de las funciones cognitivas.	Jung <i>et al.</i> , 2012.
	Fenotipo severo de progeria.	El alelo hipomorfo de la isoprenilcisteina carboxi-metiltransferasa (ICMT) aumentó el peso corporal, normalizó la fuerza de prensión, previno las fracturas óseas y la muerte en ratones con deficiencia de <i>Zmpste24</i>	Ibrahim <i>et al.</i> , 2013.
<i>Zmpste24</i>^{-/-} <i>Lmna</i>^{+/-}	Disminución de Prelamin A farnesilada. Los MEF mostraron reducción de las alteraciones morfológicas nucleares.	La toxicidad celular se debe a la acumulación de prelamina A farnesilada.	Fong <i>et al.</i> , 2004.
<i>Lmna</i>^{HG/HG}	Fenotipo de enfermedad severa de progeria en MEF.	Primera confirmación de la efectividad de FTI.	Yang <i>et al.</i> , 2005.
	Pérdida de grasa subcutánea, osteoporosis severa y fracturas óseas espontáneas. Muerte prematura.	FTI aumentan el tejido adiposo	Yang <i>et al.</i> , 2006.
		FTI mejora la supervivencia	Yang <i>et al.</i> , 2008.
<i>Lmna</i>^{nHG/+}	Fenotipo severo de progeria en MEF.	La progerina no farnesilada es menos tóxica que la versión farnesilada.	Yang <i>et al.</i> , 2008.
<i>Lmna</i>^{csHG/+}	Expresión de progerina no farnesilada. No hay fenotipo de la enfermedad	Los cambios estructurales en el extremo carboxilo del gen <i>Lmna</i> podrían ser responsables de la variabilidad en la severidad de los fenotipos.	Yang <i>et al.</i> , 2011.
<i>Lmna</i>^{LAO/LAO}	Producción directa de lamin A, que evita el proceso de formación de prelamina A. No hay fenotipo de la enfermedad.	Sugiere que el procesamiento de prelamina A puede ser dispensable, si se encuentra presente la proteína Lamin A madura.	Coffinier <i>et al.</i> , 2010.
<i>Lmna</i>^{G609G}	La acumulación de progerina farnesilada por corte y empalme defectuoso del gen <i>Lmna</i> presente en pacientes con HGPS. Principales características de los síndromes relacionados con el envejecimiento.	Demostración de que la progerina se acumula en el envejecimiento fisiológico. Uso de oligonucleótidos morfolino antisentido como terapia para los síndromes progeroides. Estrategia de corte y empalme dirigido como un enfoque terapéutico.	Osorio <i>et al.</i> , 2011.
<i>Lmna</i>^{GT-/-}	Retardo del crecimiento, hipotrofia del músculo esquelético, disminución del tejido adiposo subcutáneo y trastornos metabólicos. Alteración de la diferenciación adipogénica de MEF.	Efectos críticos de la pérdida de lamin A/C en el desarrollo postnatal temprano.	Kubben <i>et al.</i> , 2011.

Mosaico para <i>Zmpste24</i>	Los ratones no muestran fenotipo progeroide ni tienen una disminución de la duración de su vida.	Importancia de los mecanismos de comunicación inter-celular para el desarrollo de progeria.	de la Rosa <i>et al.</i> , 2013.
-------------------------------------	--	---	----------------------------------

MEF: fibroblastos embrionarios de ratón; mTORC1: del inglés: *mammalian target of rapamycin complex 1*; FTI: Inhibidor de la farnesiltransferasa. ¹ Corresponden al mismo modelo de ratón a los que los autores han dado diferentes nombres: *Lmna*^{L530P/L530P} (Mounkes *et al.*, 2003) y *Lmna*^{Δ9/Δ9} (Hernández *et al.*, 2010). Tabla modificada de Infante A *et al.*, ISBN: 978-1-62808-750-5. 2013: 35-93.

Nos centraremos a continuación en el modelo de ratón con mutaciones en el gen *Zmpste24*, caracterizado en la mayoría de los casos por un fenotipo de envejecimiento prematuro muy severo. Estos ratones acumulan prelamin A, de manera similar a lo que ocurre en el modelo celular de envejecimiento humano propuesto en esta tesis, aunque en nuestro caso los niveles de prelamin A detectados son considerablemente inferiores.

En el año 2002 Pendas *et al.* generaron un modelo de ratón *knockout* o nulo mediante la mutación homocigota del gen *Zmpste24* (*Zmpste24*^{-/-}). Estos animales presentaron un retraso severo en su crecimiento, miocardiopatía dilatada, distrofia muscular, lipodistrofia y muerte prematura; alteraciones similares a las desarrolladas por los ratones *knockout* para *Lmna*, y que se observan en pacientes con laminopatías congénitas, como EDMD, CMD1A y FPLD2. Los ratones *Zmpste24*^{-/-} presentan un procesamiento de prelamin A defectuoso, demostrando que prelamin A es un sustrato específico de ZMPSTE24. Esto produce alteraciones de la arquitectura nuclear, que subyacen a los fenotipos observados tanto en ratones como en seres humanos que presentan mutaciones asociadas al gen *LMNA*. Los ratones *Zmpste24*^{-/-} presentaron además desnutrición y pérdida progresiva de cabello, así como fracturas óseas múltiples espontáneas por disminución de los volúmenes óseos corticales y trabeculares, similares a lo que ocurre en modelos de ratón de osteogénesis imperfecta (Bergo *et al.*, 2002). A su vez, Liu *et al.* (2005) observaron mayor daño al DNA, aberraciones cromosómicas y sensibilidad a los agentes dañinos del DNA en los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) deficientes en *Zmpste24*. El reclutamiento de la proteína de unión a p53-1 (TP53BP1) y Rad51 a los sitios de lesión de DNA se vio afectado en los MEF de ratones *Zmpste24*^{-/-} así como en los fibroblastos de pacientes con progeria, resultando en un retraso en los puntos de control de daño al DNA y, por tanto, en una reparación defectuosa. Además, los MEF de ratones sanos que expresan ectópicamente prelamin A mostraron defectos similares en la respuesta de reparación de daño al DNA. Esto sugiere que prelamin A actúa de manera dominante negativa, alterando la respuesta de reparación de daño al DNA, lo que determina una inestabilidad genómica que podría contribuir al envejecimiento prematuro observado en las laminopatías.

Posteriormente Varela *et al.* (2005) analizaron las alteraciones transcripcionales que

ocurren en tejidos de ratones *Zmpste24*^{-/-} y demostraron que la deficiencia de *Zmpste24* provoca una ruta de señalización de estrés que se evidencia por una marcada regulación positiva de genes diana de p53, acompañada por un fenotipo senescente a nivel celular y un envejecimiento acelerado a nivel de organismo. Estos fenotipos fueron rescatados en gran medida en ratones *Zmpste24*^{-/-}/*Lmna*^{+/-}, y son parcialmente revertidos en ratones *Zmpste24*^{-/-}/*p53*^{-/-}. Estos hallazgos proporcionan evidencia de que existe una activación de la respuesta de puntos de control (*checkpoint*) del ciclo celular, que atribuyen a las anomalías nucleares causadas por la acumulación de prelamin A.

Mariño *et al.* (2008) demostraron que los ratones *Zmpste24*^{-/-} exhiben una activación basal de la autofagia en lugar del característico declive en este proceso que ocurre durante el envejecimiento normal. También demostraron que este aumento en la autofagia se asociaba con una serie de cambios en las vías metabólicas de los lípidos y glucosa, lo que conducía a la activación periférica de LKB1-AMPK y a la inhibición de mTOR. Proponen que las anomalías nucleares que causan el envejecimiento prematuro en los ratones *Zmpste24*^{-/-} desencadenan una respuesta metabólica que implica la activación de la autofagia. Sin embargo, la activación crónica de esta vía catabólica puede convertir esta estrategia inicialmente pro-supervivencia en un mecanismo de pro-envejecimiento, lo que podría contribuir a la degeneración sistémica del organismo y al debilitamiento observado en estos ratones progeroides.

Osorio *et al.*, (2010) demuestran que los ratones *Zmpste24*^{-/-} (generados anteriormente por Pendas *et al.*, 2002) expresan una hipermetilación del DNA ribosomal, reduciendo la transcripción de genes ribosómicos, siendo esta reducción reversible tras el tratamiento con inhibidores de ADN metiltransferasa. Esta alteración se ha descrito previamente durante el envejecimiento fisiológico en roedores, lo que sugiere su posible papel en el desarrollo de los fenotipos progeroides. A la determinación de estos fenotipos progeroides también pueden contribuir los cambios en la expresión de varios genes implicados en el control de la proliferación celular y los procesos metabólicos, debido a la hipoacetilación global de las histonas H2B y H4. Lo cual, se debe probablemente a la asociación disminuida que presenta la histona acetiltransferasa Mof con la matriz del núcleo celular que presentan estos ratones. Krishnan *et al.* (2011) rescatan el fenotipo de envejecimiento mediante la expresión aumentada de la acetiltransferasa de histonas *Mof* o a través de la inhibición de la desacetilasa de histonas, promoviendo el reclutamiento de las proteínas de reparación a las regiones de daño en el DNA.

En el año 2011, Ugalde *et al.* utilizan el modelo de ratón generado por Pendas *et al.*, (2002) con fenotipo severo de progeria para estudiar el papel de los micro-RNA (miRNA) en la regulación génica del envejecimiento. Demuestran que la familia de miRNA denominada miR-29, se acumula

en los ratones *Zmpste24*^{-/-} así como durante el envejecimiento normal. Proponen que miR-29 tiene un papel fundamental en la regulación de la supervivencia y proliferación celular a través de la modulación de la respuesta de daño al DNA de forma dependiente de p53.

Una mención especial merece el ratón mosaico para *Zmpste24*, generado por de la Rosa et al. (2013), debido a la importancia capital de sus conclusiones respecto a la comunicación intercelular. Estos ratones mantienen proporciones similares de las células normales y deficientes en *Zmpste24* (que acumulan prelamin A) a lo largo de la vida, se desarrollan normalmente y no muestran fenotipo de progeria. Esto subraya la importancia que tienen los mecanismos de comunicación inter-celular en el desarrollo de progeria, puesto que las células normales son capaces de compensar las alteraciones causadas por las células deficientes para *Zmpste24*, por ejemplo, restaurando a valores normales los niveles sistémicos del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) que está involucrado en el envejecimiento (Lin et al., 1997; Ogg et al., 1997). En este estudio los autores señalan a su vez, que la acumulación de prelamin A tiene implicaciones en el desarrollo de otras patologías como el cáncer. Demuestran que la acumulación de prelamin A no altera el inicio ni el crecimiento del tumor, pero disminuye la incidencia de carcinomas orales infiltrantes, por lo que concluyen que el silenciamiento de *ZMPSTE24* reduce la capacidad de invasión de las células cancerosas humanas. Sus resultados apoyan el potencial de la terapia celular y sistémica para la progeria y señalan a *ZMPSTE24* como una nueva diana contra el cáncer.

Todos estos ejemplos de modelos de ratón ilustran la valiosa herramienta que constituyen para el estudio de patologías humanas, así como para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

2.3. ANTECEDENTES DE TRABAJO Y GENERACIÓN DEL MODELO PROPUESTO.

Como ha sido explicado previamente el proceso de envejecimiento es multifactorial, complejo y está lejos de ser completamente comprendido. Sin embargo, gracias a los estudios realizados en nematodos, moscas y murinos, el conocimiento sobre las bases moleculares del envejecimiento ha aumentado significativamente en los últimos años. No obstante, la elucidación de las bases moleculares del envejecimiento humano sería mejor comprendida en sistemas biológicos capaces de evitar importantes diferencias que existen entre especies y que han limitado la extrapolación adecuada de una serie de conclusiones al proceso de envejecimiento humano. Un ejemplo de ello es la longitud de los telómeros, los telómeros murinos tienen una longitud aproximada de 40 a 60 kb mientras que en humanos el tamaño promedio es de 5 a 15

kb, lo que podría estar relacionado con los diferentes mecanismos de senescencia que puedan existir entre ratones y humanos (Itahana *et al.*, 2004). Otro ejemplo sería el hecho de que los fibroblastos de pacientes con delección homocigota para *LMNA* tienen una proliferación celular disminuida (Muchir *et al.*, 2003) mientras que en el ratón con expresión suprimida para el gen *Lmna* muestran el efecto opuesto, o sea un incremento en las tasas de proliferación celular (Van Berlo *et al.*, 2005; Ivorra *et al.*, 2006). Por lo cual, los modelos experimentales humanos se posicionan como herramienta fundamental para el estudio de las bases moleculares del envejecimiento humano (Liu *et al.*, 2012).

2.3.1. Elección de las hMSC como sistema celular relevante para el estudio del envejecimiento.

Las células madre mesenquimales (MSC) son células troncales multipotentes, no diferenciadas, que residen en la mayoría de los tejidos del organismo como la médula ósea, el cordón umbilical y el tejido adiposo (Minguell *et al.*, 2001). Estas células se pueden aislar fácilmente y poseen tanto la capacidad de auto-renovarse como de diferenciarse *in vitro* e *in vivo*, en células especializadas que dan lugar al tejido muscular, tejido adiposo, cartilago y tejido óseo, entre otros (Pittenger *et al.*, 1999).

Las alteraciones del gen *LMNA* afectan principalmente a tejidos derivados del mesodermo (principalmente: tejidos óseo, muscular, cartilaginoso y adiposo), es por ello que las MSC que dan origen a los mismos constituyen uno de los sistemas celulares con mayor relevancia biológica para el estudio de estos síndromes. Los modelos experimentales humanos basados en MSC han sido herramientas valiosas para estudiar los síndromes progeroides, por ejemplo, al explorar las consecuencias de la acumulación de progerina responsable del HGPS. De hecho, la introducción de progerina en células madre mesenquimales humanas (hMSC) determina alteraciones que se asemejan a las observadas en las células de pacientes con HGPS que exhiben una disfunción de células madre adultas (Scaffidi y Misteli, 2008).

Los reservorios de células madre adultas son esenciales para la regeneración, mantenimiento y reparación de los diversos tejidos. Sin embargo, estos nichos o depósitos celulares se ven afectados por el envejecimiento causando una disminución en el número de células madre y actuando en detrimento de su función (Rao *et al.*, 2001), principalmente afectando a los tejidos que deben ser restituidos por los reservorios de células madre. De hecho, el agotamiento de las células madre es por sí mismo uno de los rasgos más característico del envejecimiento (López-Otín *et al.*, 2013). A su vez, se ha demostrado la capacidad que tienen ciertos factores obtenidos de la sangre de animales jóvenes para mejorar la funcionalidad de las

células madre envejecidas (Lavasani et al., 2012). Es por ello que la identificación y caracterización de las bases moleculares que regulan el envejecimiento de las células madre es de gran relevancia, debido a que proporcionaría información crítica para comprender cómo ciertos tejidos son capaces de mantener su capacidad regenerativa a lo largo de la vida adulta y por qué esa capacidad disminuye con la edad (Signer y Morrison, 2013).

Los modelos de envejecimiento basados en células madre humanas constituyen herramientas fundamentales para dilucidar los mecanismos que regulan el proceso de envejecimiento e incrementar el conocimiento de este proceso biológico ineludible. Además, estos modelos experimentales basados en células madre pueden ser extremadamente útiles en el estudio de las similitudes y diferencias en los mecanismos moleculares con respecto a la regulación de otros tipos celulares durante el envejecimiento.

2.3.2. Modelo experimental humano de lipodistrofia asociada a LMNA.

Como antecedente al trabajo actual, se ha desarrollado previamente en nuestro laboratorio un modelo experimental de lipodistrofia basado en la generación de adipocitos derivados de células madre mesenquimales humanas sometidas a un tratamiento farmacológico. Este procedimiento tiene como resultado la acumulación de prelamin A en estos adipocitos (Ruiz de Eguino *et al.*, 2012). Dicho modelo se fundamenta en la identificación de la lipodistrofia adquirida como efecto secundario del tratamiento anti-retroviral con inhibidores de proteasas (IP) del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Los IP inhiben la aspartil proteasa del VIH, encargada de escindir la poli proteína gag-pol del VIH en cadenas más cortas, necesarias para la producción de nuevos viriones, cortando por tanto el ciclo de infección (Flexner, 1998). Estos fármacos interfieren a su vez con la maduración de lamin A/C, como ha sido demostrado por Caron *et al.* (2003) en una línea celular de adipocitos de ratón.

El IP elegido para el modelo experimental humano de lipodistrofia fue el Tipranavir (TPV), fármaco que se utiliza en la práctica clínica como parte de una terapia combinada para el tratamiento de pacientes con VIH (aunque actualmente se utiliza como fármaco de rescate si fracasan otros IP). Coffinier *et al.* (2007) demostraron que el tratamiento con TPV (a concentraciones farmacológicas que variaron entre 20 y 100 μ M) inducía un aumento de prelamin A farnesilada, mediante la inhibición de ZMPSTE24 en fibroblastos humanos y de ratón. El esquema de tratamiento que se llevó a cabo en este caso para la realización del modelo de lipodistrofia se muestra en la figura 11.

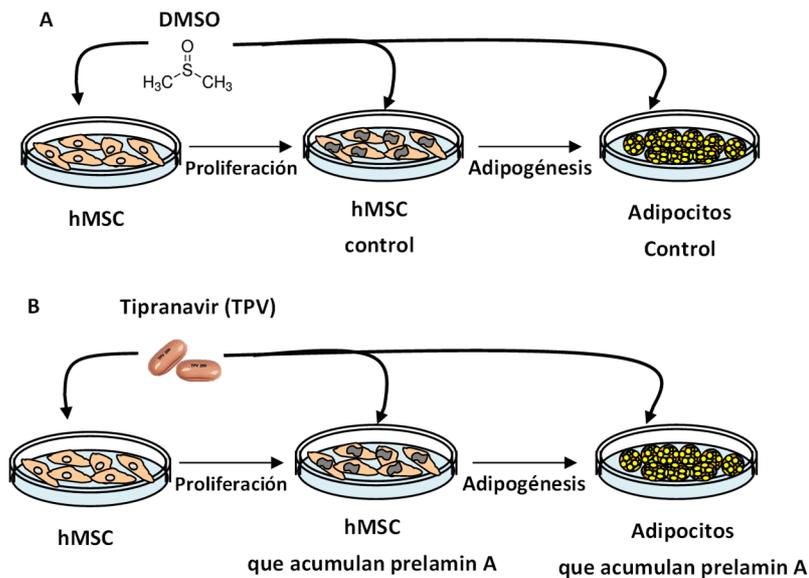


Figura 11. Esquema del modelo de lipodistrofia generado en adipocitos derivados de hMSC. A y B representan los esquemas de tratamiento donde se obtienen células control y lipodistróficas, respectivamente.

Con la premisa de que las lipodistrofias tanto adquiridas como congénitas relacionadas con *LMNA* afectan principalmente tejidos de origen mesenquimal, se planteó la hipótesis de que la acumulación de prelamin A podría comprometer la homeostasis de las hMSC e interferir con el proceso de diferenciación al tejido adiposo de las mismas. Además, esta hipótesis está respaldada por resultados previos en la literatura que demuestran que las vías de señalización requeridas para el mantenimiento de la función normal de las células madre se alteran en las hMSC que acumulan progerina así como en los ratones progeroides con supresión de *Zmpste24* (Scaffidi y Misteli, 2008; Espada *et al.*, 2008),

Este modelo experimental demostró por primera vez que el tratamiento con un IP induce la acumulación de prelamin A en hMSC *in vitro* (Figura 12). Además, recapituló las características previamente observadas en fibroblastos tratados con IP, así como en las lipodistrofias ligadas a *LMNA*, tales como una reducción en su capacidad de proliferación (Figura 13 A), aumento de la senescencia celular (Figura 13 B) y porcentajes significativos de núcleos con distribución alterada de la heterocromatina (Figura 15). Se observó además que el tratamiento con TPV de las hMSC dio lugar a una inhibición de la adipogénesis como consecuencia de la acumulación de prelamin A, lo que implica la alteración de la capacidad de diferenciación de las mismas. Todas estas observaciones validaron el tratamiento de las hMSC con IP como modelo experimental para el estudio de la lipodistrofia ligada a *LMNA*.

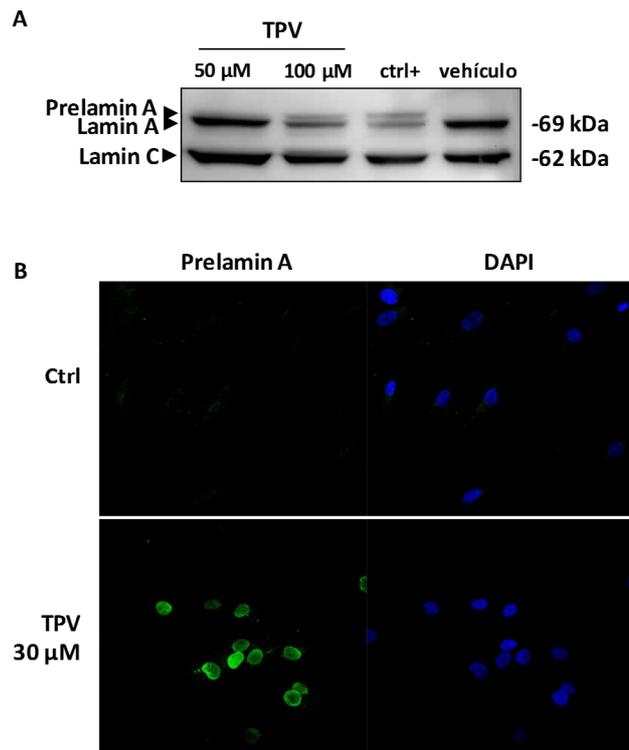


Figura 12. Acumulación de prelamina A en hMSC tratadas con TPV. Ruiz de Eguino G, Infante A, *et al.*, 2012.

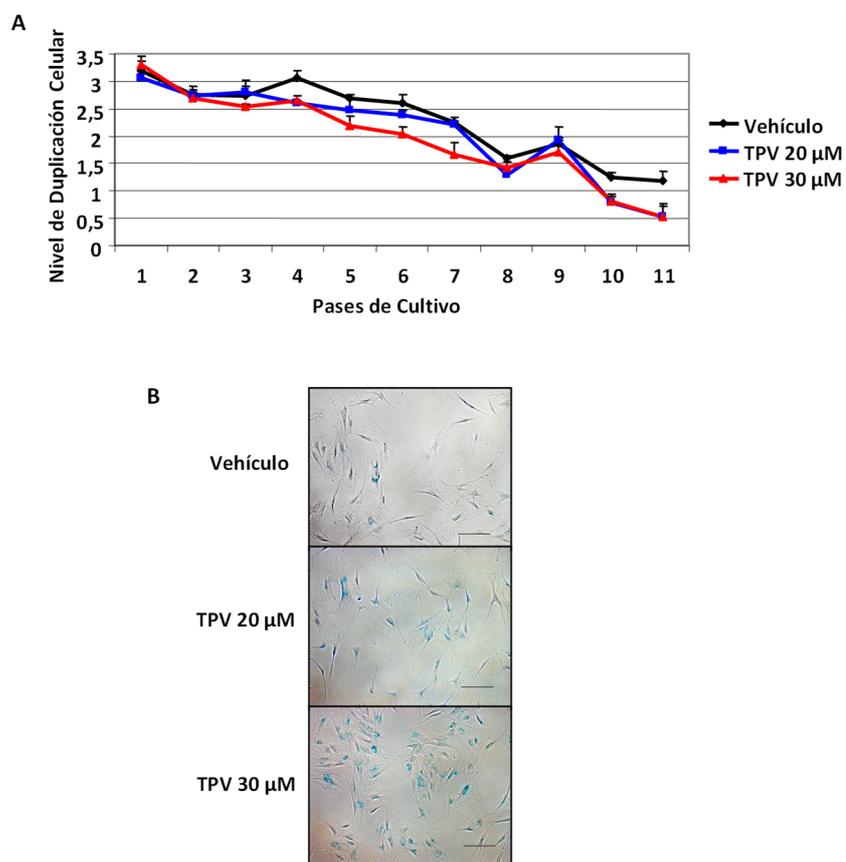


Figura 13. Las hMSC tratadas con TPV muestran una proliferación reducida (A) y una senescencia prematura (B). Ruiz de Eguino G, Infante A, *et al.*, 2012.

En cuanto a las alteraciones mencionadas anteriormente en este modelo con respecto a las modificaciones de la cromatina, se observó que las hMSC que acumulan prelamin A sin diferenciar presentaron una pérdida de focos de proteína 1 de la heterocromatina (HP1 γ) de forma dependiente de la dosis del tratamiento recibido, con una pérdida de 20% de focos a concentración de TPV de 50 μ M y 12% a 20 μ M TPV frente al 6% en las células control (Figura 14)(Ruiz de Eguino *et al.*, 2012). La pérdida de focos de HP1 γ , proteína que forma parte del complejo de focos de senescencia asociados a la heterocromatina (Zhang *et al.* 2007), implica la des-compactación de regiones de la cromatina que deberían estar compactadas y por tanto tener reprimida la transcripción génica, lo cual se ha asociado una disminución de la esperanza de vida (Narita *et al.*, 2003; Larson *et al.*, 2012). De hecho, se ha señalado que la remodelación de la cromatina asociada con senescencia determina profundos cambios en la transcripción génica (van Deursen, 2014).

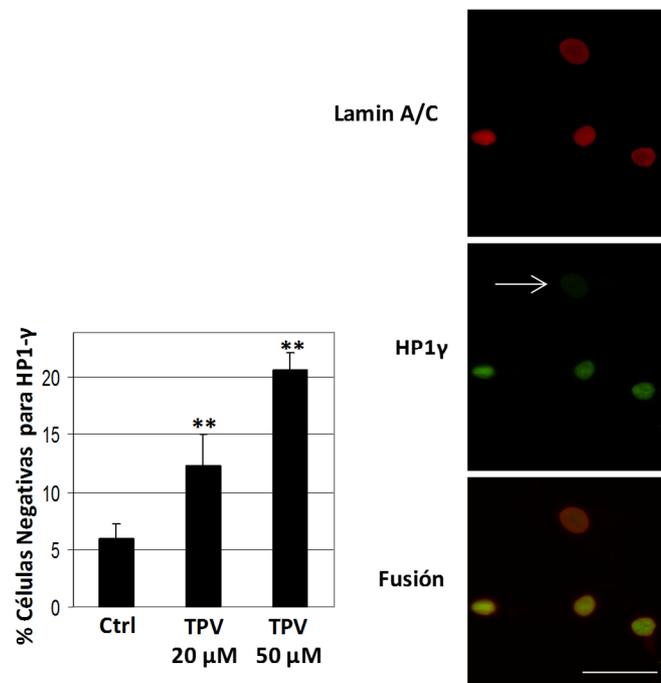


Figura 14. Las hMSC que acumulan prelamin A tienen una expresión reducida de HP1 γ . Gráfico de la cuantificación e imagen representativa de inmunofluorescencia donde se observa la pérdida de focos de HP1 γ en las hMSC que acumulan prelamin A. Ruiz de Eguino G, Infante A, *et al.*, 2012.

Ruiz de Eguino *et al.* (2012) demostraron, además de esta expresión alterada de HP1 γ en las hMSC que acumulan prelamin A, alteraciones en la organización de la cromatina por microscopía electrónica. Como se observa en la figura 15 A, Ruiz de Eguino *et al.* señalan que en las hMSC control el grosor de la disposición de la cromatina es homogéneo a lo largo de toda la bicapa lipídica en la membrana nuclear interna (INM), excepto en los complejos de los poros

nucleares (NPC) donde se interrumpe. Sin embargo, en las células que acumulan prelamin A, observaron zonas de la INM donde desapareció la cromatina, así como varias regiones con patrones de agregados de heterocromatina. Como podemos observar en el gráfico de la Figura 15 C, en las hMSC que acumulaban prelamin A la longitud media de los agregados de heterocromatina fue casi el doble de lo que sucedía en las hMSC control. A su vez, observaron una condensación aberrante de heterocromatina en el nucleoplasma de las células que acumulan prelamin A pero no en las células control (Figura 15 B). Estos resultados son consistentes con estudios previos realizados en fibroblastos de pacientes con laminopatías (Capanni *et al.*, 2003; Filesi *et al.*, 2005; Columbaro *et al.*, 2005; Lombardi *et al.*, 2007).

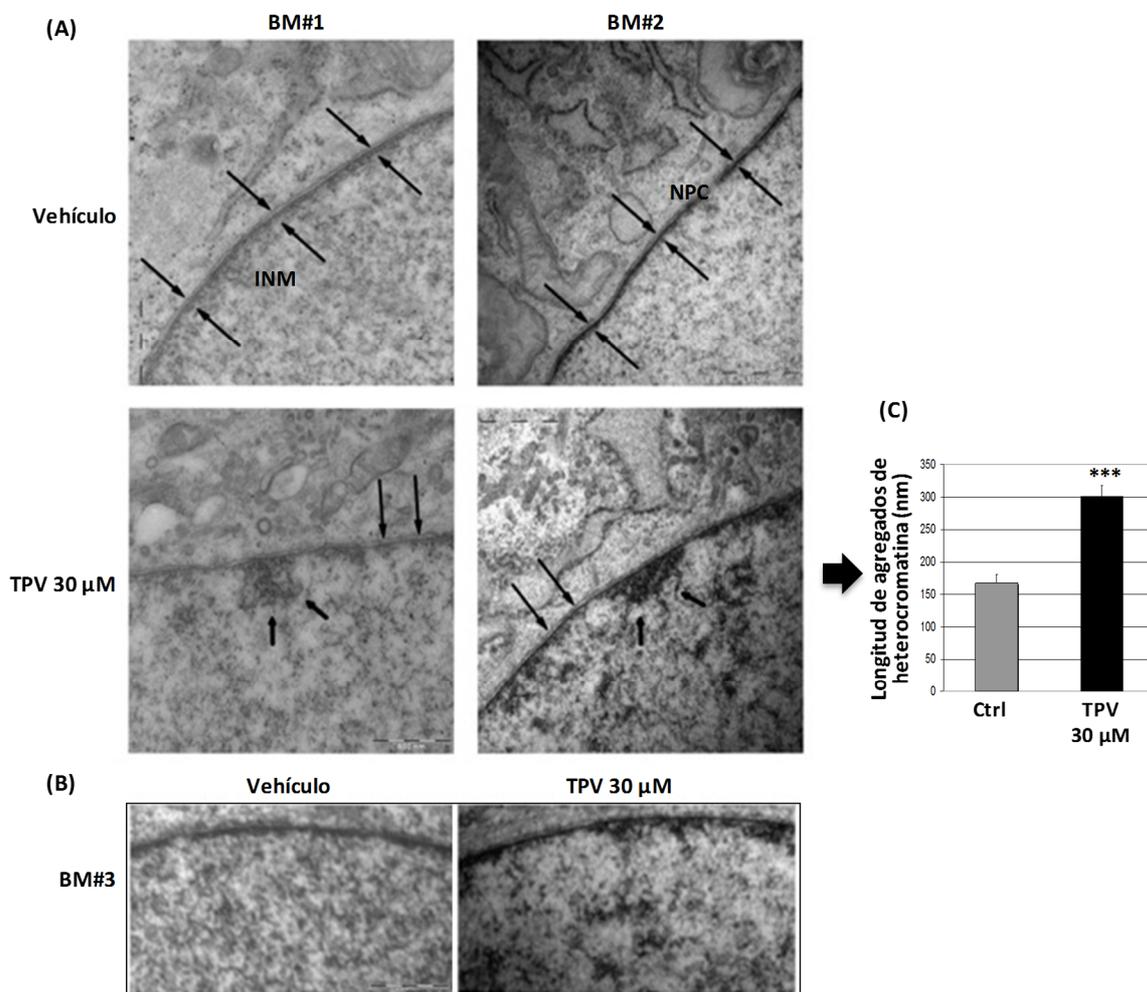


Figura 15. Disposición de la cromatina de las hMSC que acumulan prelamin A (TPV 30 μM) y sus controles (Ctrl). Imágenes representativas de microscopía electrónica A) Las flechas grandes señalan la bicapa lipídica. Las pequeñas flechas muestran los agregados de cromatina en las células que acumulan prelamin A. B) Condensación aberrante de la cromatina en las hMSC que acumulan prelamin A. C) gráfico de la cuantificación de los agregados de heterocromatina, *** $p < 0.01$. hMSC derivadas de tres donantes independientes de médula ósea (BM). INM: membrana nuclear interna. NPC: complejo poros nucleares. Barras graduadas 500 nm (A) y 2 μm (B). Ruiz de Eguino G, Infante A, *et al.*, 2012.

2.3.3. Modelo experimental humano de envejecimiento.

Como se señaló anteriormente, uno de los fenotipos observados en las hMSC que acumulaban prelamina A como consecuencia del tratamiento con TPV, fue el aumento de la senescencia que resulta en una disminución de la capacidad de proliferación, una característica establecida del envejecimiento (Ruiz de Eguino, *et al.*, 2012), y que forma parte de los fenotipos observados en fibroblastos de pacientes con Progeria y lipodistrofia ligada al gen *LMNA*, así como en modelos murinos.

En base a lo expresado previamente, en el presente trabajo se propuso determinar si el modelo experimental basado en hMSC que acumulan prelamina A (Figura 16 y Figura 17) era capaz de replicar otros fenotipos que han sido identificados por López-Otín, *et al.* (2013) como marcadores del envejecimiento, y consecuentemente constituir un modelo experimental eficaz para el estudio de mecanismos moleculares involucrados en el envejecimiento humano. El esquema de tratamiento que se llevó a cabo en este caso para la realización del modelo de envejecimiento se muestra en la figura 16. Se utilizaron las concentraciones farmacológicas de TPV de 30 μ M, descritas por Coffinier *et al.*, (2007) pero de forma continuada durante todos los días de cultivo, de la misma forma que los pacientes con VIH reciben el tratamiento farmacológico diariamente.

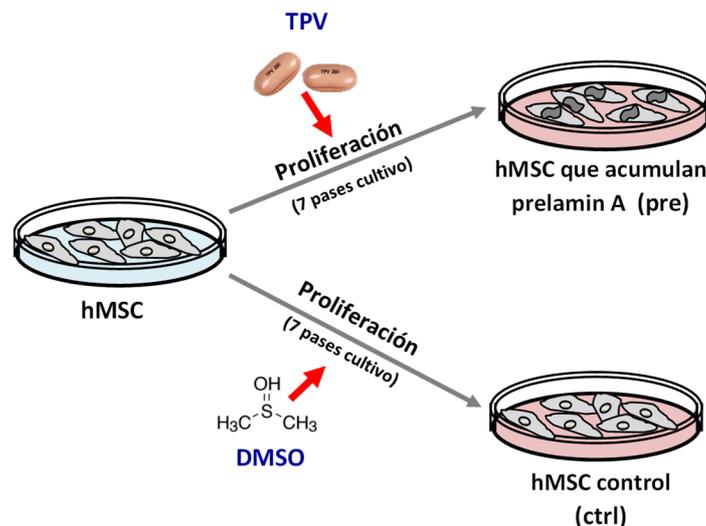


Figura 16. Esquema de la generación del modelo de hMSC que acumulan prelamina A. El tratamiento con TPV a concentración de 30 μ M se realiza de forma continuada durante todo el cultivo celular, de igual forma que los pacientes con VIH reciben su medicación antiretroviral diariamente.

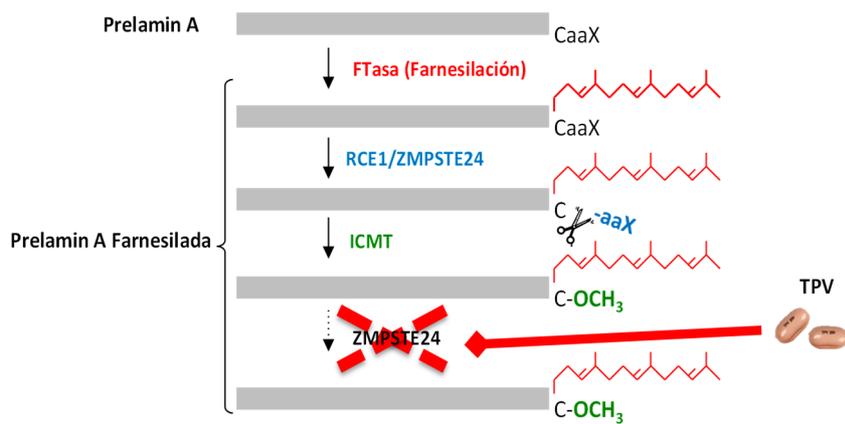


Figura 17. Representación esquemática del mecanismo de acción del fármaco con el que se genera la acumulación de prelamin A en nuestro modelo.

III. HIPÓTESIS

Las células madre mesenquimales humanas que acumulan prelamina A podrían constituir un modelo *in vitro* fisiológicamente relevante para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en el envejecimiento humano.

IV. OBJETIVOS

El **objetivo general** del presente trabajo es establecer un modelo *in vitro* fisiológicamente relevante para poder estudiar los mecanismos moleculares involucrados en el envejecimiento humano.

En este marco, los **objetivos específicos** son:

1. Inducir la acumulación de prelamin A en células madre mesenquimales humanas para generar el modelo experimental de envejecimiento.
2. Validar el modelo *in vitro* de envejecimiento basado en células madre mesenquimales humanas que acumulan prelamin A.
3. Identificar posibles mecanismos moleculares involucrados en la regulación del envejecimiento humano en células madre mesenquimales.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

5.1.1. Cultivo de células

5.1.1.1. Obtención de las muestras

Las hMSC derivadas de médula ósea utilizadas en este estudio fueron obtenidas a partir de donantes cadáveres del nodo del Banco Nacional Español de Células Madre, Fundación Inbiomed (<http://www.inbiobank.org>), adicionalmente se emplearon células mesenquimales humanas de la empresa Lonza (Walkersville, MD). Las muestras utilizadas demostraron ser negativas para: VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) tipos 1 y 2, Hepatitis B y C, Citomegalovirus y Mycoplasma. Las células fueron procesadas en Inbiobank siguiendo los procedimientos de fabricación basados en las normas ISO9001:2000 y bajo las Buenas Prácticas de Fabricación. Las hMSC generadas demostraron el perfil fenotípico característico: CD13+, CD29+, CD73+, CD90+, CD105+, CD 166+, CD34-, CD45- y CD31-; así como el potencial de generación de al menos tres linajes celulares incluyendo: osteocitos, condrocitos y adipocitos. Para la conservación de las células durante largos periodos de tiempo se prepararon viales de 1 ml que se congelaron lentamente (-1°C/min) en un contenedor de isopropanol a -80°C y posteriormente se almacenaron en nitrógeno líquido en medio de cultivo bajo en glucosa DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich*) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS), (*Sigma-Aldrich*), 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomycin y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma-Aldrich*).

5.1.1.2. Cultivo celular y tratamiento farmacológico

Los cultivos celulares se mantuvieron con humedad saturante, [CO₂]=5% a temperatura de 37°C. La acumulación de la proteína Prelamin A se obtuvo mediante el tratamiento de las hMSC con el inhibidor de proteasa del VIH Tipranavir (TPV) (*Boehringer Ingelheim*), preparado de una solución stock a 19 mM en el solvente DMSO. Durante todo el período de tratamiento, cada 48-72 horas se cambió el medio de cultivo completo [DMEM (*Sigma-Aldrich*) con glucosa 1000 mg/L, suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) (*Sigma-Aldrich*), GlutaMAX™ 1% (*Gibco, Life Technologies*), 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycin], añadiendo nuevo TPV a concentración final 30 µM utilizando también como solvente el DMSO, (la inducción de la acumulación de Prelamin A se realizó con TPV a concentración final de 30 µM, concentración farmacológica demostrada por Coffinier *et al.*, 2007). Las células control se incubaron en el medio completo con el solvente DMSO a la misma concentración que la del TPV que se analiza. En todos los casos que nos referimos a las células tratadas y sus controles, tanto las células tratadas con

TPV como con DMSO corresponden a hMSC derivadas del mismo donante de medula ósea. Para los experimentos que requerían condiciones de privación de suero, las hMSC se cultivaron en medio sin FBS durante las últimas 24 horas, siendo sus controles mantenidos durante el mismo tiempo con el tratamiento correspondiente diluido en medio completo. A excepción de los ensayos de senescencia replicativa (donde se llegó a pase 19), todos los experimentos se han realizado en el pase 7 de cultivo.

5.1.2. Nivel de duplicación de la población celular

Para estos experimentos se sembraron 40.000 hMSC en cada pocillo, por triplicado para cada condición, en placas de 6 pocillos con tratamiento TPV 30 μM y con DMSO a la misma concentración. Cada 5 días en cultivo las células se levantaron, se contaron (de la forma que se explica a continuación) y se sembraron nuevamente a la misma concentración que al inicio. Este proceso dependiendo del experimento se repitió hasta un máximo de 19 pases.

5.1.2.1. Recuento de células

Para determinar la densidad celular presente en la suspensión se utilizó un hemocitómetro o cámara de *Neubauer*. La cámara de *Neubauer* es una cámara de recuento adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Es un portaobjetos con canales y una depresión central, en el fondo de la cual se han marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como se observa en la imagen (Figura 18), de manera que se forman 9 cuadrados de 1 mm². La depresión central del cubreobjetos tiene 0,1 mm de espesor respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubre-objetos éste dista de la superficie marcada 0,1 mm, y el volumen comprendido entre la superficie y el cubre-objetos es de 0,1 mm³ es decir 10 μl .

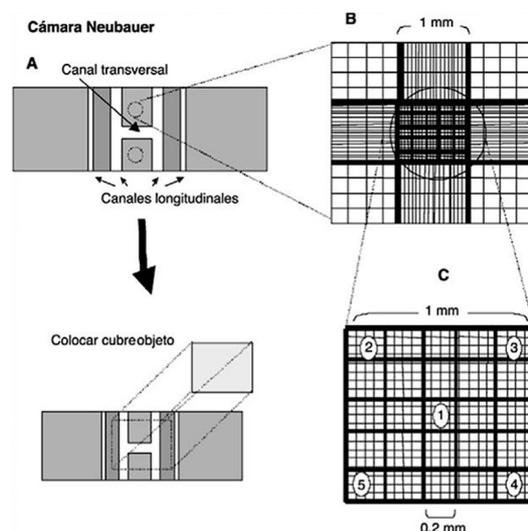


Figura 18. Esquema de la cámara de *Neubauer*.

Para determinar la viabilidad celular se empleó la tinción con el colorante de exclusión vital azul de *trypan* (*Gibco*), el cual se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana celular. Las células a contar se diluyeron con el azul de *trypan* y se observaron al microscopio. Las células que aparecían con un color claramente azul no se consideran viables y se excluyen del recuento.

5.1.3. Análisis de la apoptosis celular mediante tinción con anexina V - yoduro de propidio.

En las células que se encuentran en fases iniciales de apoptosis, la fosfatidilserina, un fosfolípido de membrana que se encuentra en la capa interna de la membrana plasmática, se trasloca a la membrana externa citoplasmática, de manera que queda expuesta al exterior celular. La presencia de fosfatidilserina en la capa externa de la membrana puede ser detectada gracias a la anexina V, una proteína con alta afinidad por este fosfolípido. El yoduro de propidio por otra parte, es un compuesto fluorescente que tiñe los núcleos de células permeabilizadas, que han perdido la integridad de la membrana, lo que ocurre al final del proceso de apoptosis o durante la necrosis.

Para la tinción de las hMSC en cultivo se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-Anexina V-FITC (*Becton Dickinson*). Inicialmente las hMSC se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 1×10^5 , en duplicado por cada condición. Se recogieron, se lavaron 2 veces con PBS (Tampón Fosfato Salino) 1X frío y se resuspendieron en 1X *Binding Buffer* [HEPES, pH 7.4 0,1M; NaCl 1,4 M; CaCl_2 25 mM]. Se transfirieron los 100 μl de esta solución al tubo de citometría y se añadieron 5 μl de anti-Anexina V-FITC y 5 μl de yoduro de Propidio, se vortexó el tubo durante 5 segundos y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 400 μl de *Binding Buffer* 1X a cada tubo y se analizaron las muestras por el citómetro de flujo FACScalibur (*Becton Dickinson*).

5.1.4. Tinción para la actividad de β -galactosidasa

La actividad de la β -galactosidasa se evaluó utilizando el set de tinción β -gal de Senescencia (*Cell Signaling*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente y se incubaron toda la noche en la solución SA- β -gal. Las células teñidas de azul (células senescentes) fueron contadas en al menos 10 campos seleccionados al azar a 20X de magnificación y expresadas como porcentaje del total de células utilizando el microscopio Nikon Eclipse TE 2000 equipado con una cámara digital *Hamamatsu*.

5.1.5. Ensayo de supervivencia celular en condiciones de hipoxia

Las células se levantaron utilizando Tripsina-EDTA 0,25% y se recogió la fracción celular mediante centrifugación. El ensayo de hipoxia fue realizado de acuerdo con Weil *et. al.* (2009), donde se sembraron 300.000 células por pocillo de cada condición, por triplicado, en placas p6. A las 24 horas se expusieron a 4 horas de hipoxia mediante su inmersión en 1 ml de aceite mineral, posteriormente se lavaron diez veces con PBS. A éste procedimiento le siguió un período de 24 horas de re-oxigenación en condiciones normales (humedad saturante, [CO₂]=5%, y temperatura de 37°C). La supervivencia celular se cuantificó utilizando la tinción Azul de *Trypan* (*Gibco*).

5.1.6. Inmunofluorescencia

Las tinciones inmunológicas se llevaron a cabo utilizando los siguientes anticuerpos: anti-fosfo H2AX JBW301 05-636 (*Millipore*), anti-Oct-1 sc-232 (*Santa Cruz*), anti-Prelamin A sc-6214 (*Santa Cruz*), anti-Lamin A/C sc-6215 (*Santa Cruz*), anti-Lamin B sc-365962 (*Santa Cruz*), anti-Progerina SAB 4200272 (*Sigma*), anti-ZMPSTE24 205-8C10 (gentileza del Laboratorio de los Dres. C. López-Otín y J.M.P. Freije), anti-β-Tubulina sc-9104 (*Santa Cruz*), y el 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, *Sigma*) se utilizó para teñir los núcleos celulares.

Se prepararon cubreobjetos de cristal recubiertos con Poli-lisina 0,01 % (*Sigma Aldrich*) en placas de 24 pocillos. Sobre los cubre-objetos se sembraron dependiendo del experimento entre 20.000 y 40.000 células, que se incubaron a 37°C y se dejaron crecer durante al menos 48-72 horas. Posteriormente durante las últimas 24 horas algunas condiciones se privaron de suero. A continuación, se fijaron las muestras con 4% de paraformaldehído (*Sigma Aldrich*) en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de dos lavados con PBS las muestras se permeabilizaron con 0,1% de Tritón X-100 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS agitando suavemente la muestra durante 5 minutos tres veces y se bloquearon las muestras con 5% de FBS a temperatura ambiente, para evitar las uniones no específicas de los anticuerpos. Transcurrido ese tiempo se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios correspondientes a cada experimento diluido en la misma solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las muestras agitando suavemente con PBST (PBS + Tritón 0,1%) 3 veces durante 5 minutos cada una, y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente a cada anticuerpo primario a diluciones entre 1:300-1:1000 en 5% de FBS en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las muestras dos veces con PBS y se tiñeron los núcleos con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (*Sigma*) a una concentración 0,5 µg/ml en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se procedió a un último lavado

en PBS y los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos de cristal con medio de montaje para fluorescencia (*Fluorescence Mounting Medium, Dako*).

El análisis de las muestras se realizó tanto en el microscopio láser confocal Olympus Fluoview FV500 así como en un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse TE2000-E empleando un objetivo 60X de inmersión en aceite. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital CCD ORCA-ER (*Hamamatsu*) y el programa de adquisición NIS-Elements (*Nikon*).

5.1.7. Proximity ligation assay (PLA)

El ensayo PLA (*Duolink®*, *Sigma Aldrich*) es un método que detecta y visualiza las interacciones entre proteínas a nivel molecular directamente en la célula, en su contexto fisiológico (Södeberg *et al.*, 2006). El principio de esta técnica (Figura 19) se basa en la utilización de dos anticuerpos primarios específicos de las dos proteínas cuya interacción se está analizando. Los anticuerpos secundarios, cada uno con una única cadena de DNA corta unida a ella, se unen a los anticuerpos primarios.

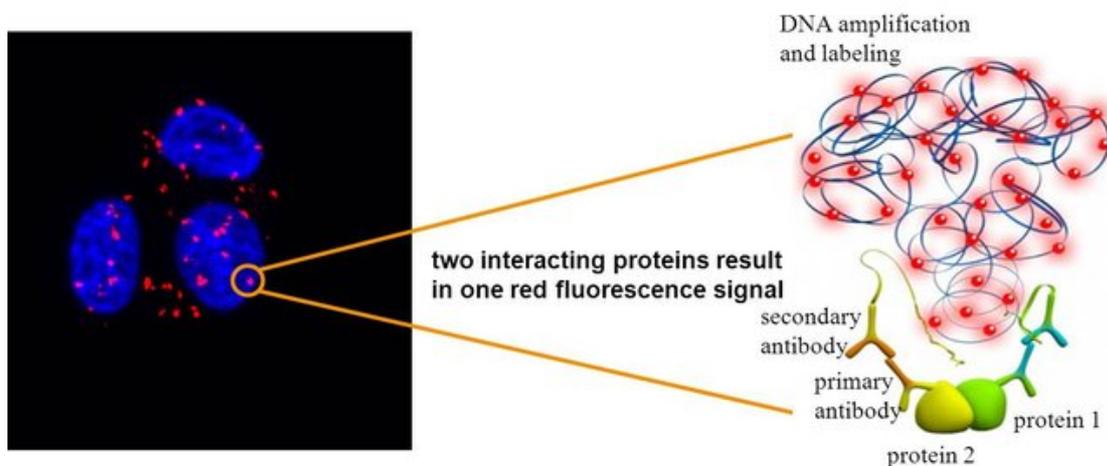


Figura 19. Esquema del principio básico del ensayo PLA.

Si las cadenas de DNA están a una distancia menor de 40 nm, interactuarán y se amplificará la señal que será visualizada posteriormente usando fluorescencia (Fredriksson *et al.*, 2002).

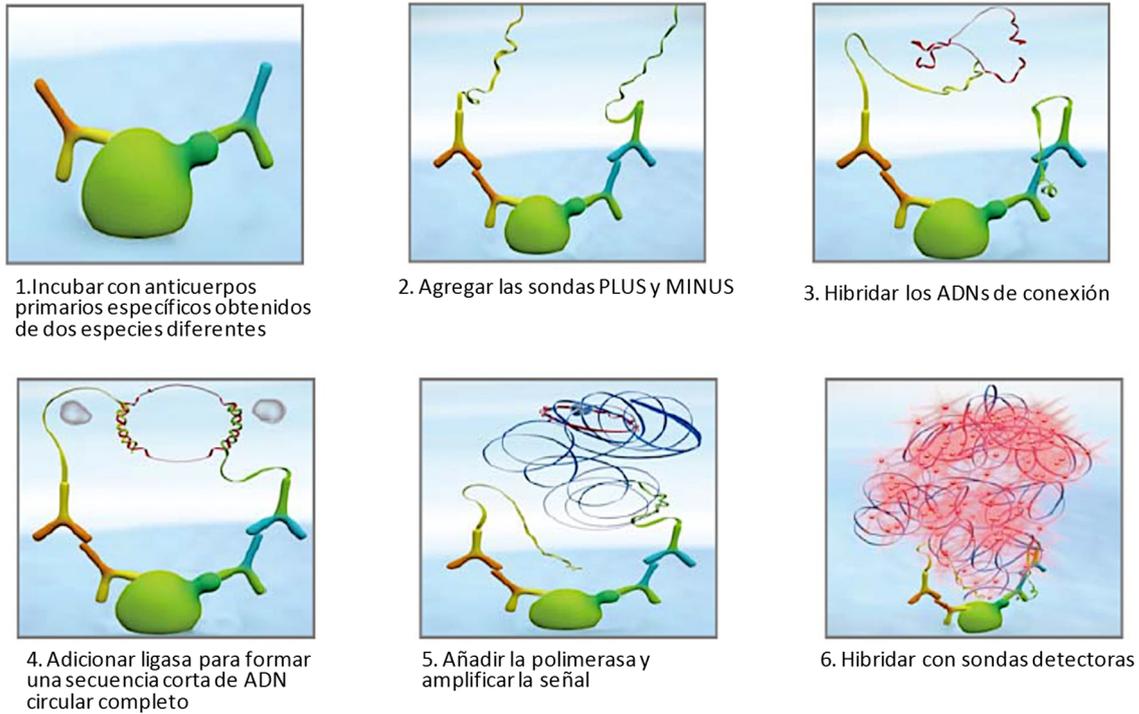


Figura 20. Representación esquemática del protocolo del PLA.

El PLA se realizó con los anticuerpos primarios anti-Prelamin A (*Santa Cruz*, sc-6214) y anti-Oct-1 (*Santa Cruz*, sc-232) y con los sets PLA anti-goat Plus y anti-rabbit Minus de Duolink (Olink Bioscience), de acuerdo con el protocolo del fabricante (Figura 20) (<http://www.olink.com/products-services/duolink/how-use-duolink>). Como control positivo (Figura 21) de la técnica utilizamos los anticuerpos primarios anti-Lamin A/C sc-6215 (*Santa Cruz*) y Lamin B sc-365962 (*Santa Cruz*), debido a que se ha descrito que estas proteínas que conforman la lámina nuclear normal de las células interactúan en diferentes grados en condiciones basales (Moir *et al.*, 2000; Delbarre *et al.*, 2006).

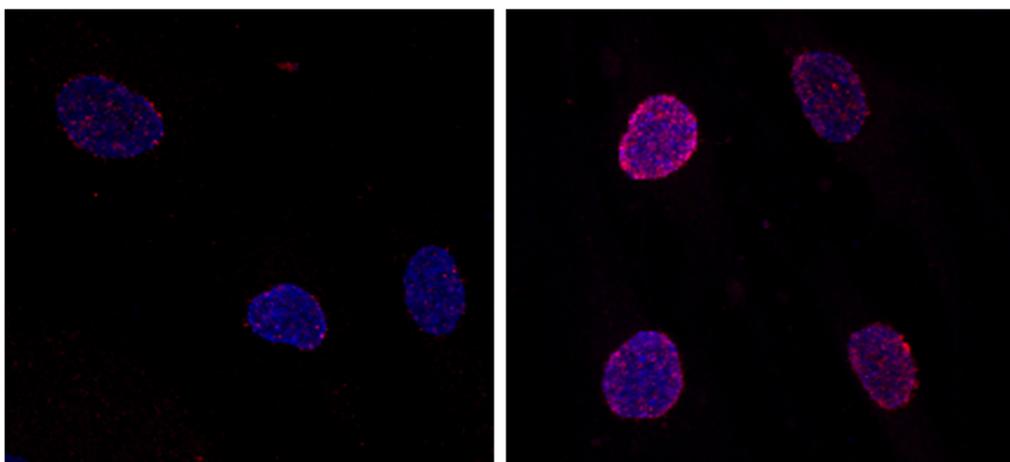


Figura 21. Control positivo de la técnica PLA en hMSC. El ensayo se realizó en hMSC derivadas de dos donantes diferentes de médula ósea. Los puntos rojos señalan la interacción de las proteínas Lamin A/C y Lamin B, como se describió previamente.

A continuación, se detalla el protocolo realizado:

1. Bloqueo: se añadió solución del bloqueo a las muestras, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y se retiró la solución de bloqueo.
2. Anticuerpos primarios: se diluyeron los anticuerpos primarios en la solución tampón y se aplicó la mezcla a las muestras. Se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron en solución tampón durante 2 a 5 minutos.
3. Sondas PLA®: se diluyeron las dos sondas de PLA 1:5 en la solución tampón apropiada, se agregó a las muestras y se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Posteriormente se lavaron con solución de lavado A (del set de PLA®) durante 2 a 5 minutos.
4. Ligadura o enlace: se preparó la mezcla de la ligasa 1:40 en solución tampón adecuada 1:5 (*Ligation Buffer*, del set de PLA®) y se aplicó a las muestras. Se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se lavaron en solución tampón durante 2 minutos.
5. Amplificación: Se preparó la mezcla con enzima Polimerasa a 1:80 en una solución con su tampón adecuado 1:5 (*Buffer Red*, del set de PLA®) y agua bi-destilada, se aplicó la mezcla a las muestras. Se incubó durante 100 minutos a 37°C. Posteriormente se lavaron en solución tampón B (del set de PLA®) 0,1X durante 2-5 minutos dos veces y luego a 0,01 x durante 1 minuto.
6. Preparación para la adquisición de las imágenes: se montaron las muestras con medio de montaje Duolink® que contiene la tinción DAPI incluida (del set de PLA®), se dejaba secar durante 30-60 minutos y se analizaron las imágenes en microscopio confocal o de fluorescencia.

5.1.8. Medida de los niveles de oxidación.

Después de 7 pases de tratamiento de las hMSC con TPV, las células se sembraron en una placa de seis pocillos a una densidad de 200.000 células por pocillo. A las 24 horas de su siembra y con objeto de inducir estrés oxidativo se privó a las células de suero durante las siguientes 24 horas. Luego, las células se despegaron de la placa utilizando la enzima tripsina y se resuspendieron en PBS 1X que contenía además la molécula fluorescente CM-H₂DCFDA (*Molecular Probes*) a una concentración final de 3 µM. Las células se incubaron a 37°C durante 30 minutos, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS 1X. La hMSC control se procesaron de forma similar, sin el tratamiento con TPV, utilizando solamente el solvente DMSO. Las células sin teñir con CM-H₂DCFDA se utilizaron para determinar auto fluorescencia, se restaron de todos los datos experimentales. Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo EPCS XL (*Beckman-Coulter*) y se analizaron con el programa de análisis FlowJo (*Tree Star*). Todos los resultados se realizaron con muestras triplicadas obtenidas en tres experimentos individuales.

5.1.9. Análisis de la longitud de los telómeros

La medida de la longitud de los telómeros se analizó en hMSC derivadas de 4 médulas óseas diferentes de donantes sometidas o no al tratamiento con TPV, fue llevada a cabo por la empresa *LifeLength*, utilizando la técnica HT-Q-FISH (Canela *et al.*, 2007). Se analizaron al menos 17.000 núcleos por muestra, asegurando la fiabilidad de las mediciones tanto de la media de la longitud telomérica como de detección de núcleos con telómeros cortos (<3 kb).

5.1.10. Ensayo del gen reportero de luciferasa

La transfección se realizó mediante nucleofección, empleando el aparato *Nucleofector*[®] y el kit de *Nucleofección*[™] (*Amaxa*[®]/*Biosystem*), siguiendo las indicaciones del proveedor. Para ello, se resuspendieron 400.000 células/hMSC en 100 µl de la solución de nucleofección (*Nucleofector*[®] *Solution V*), se añadieron 2 µg del vector pOct-1-Luc (*Signosis*) y se sometieron al programa predeterminado U-23 del *Nucleofector*[®] para transfectar mesenquimales. Después de un lavado para eliminar los restos celulares, las células transfectadas se cultivaron en medio de cultivo DMEM completo. Las transfecciones fueron efectuadas por triplicado y las células de cada transfección se sembraron en un pocillo de una placa de 6 pocillos. 24 horas después fueron privadas de suero por otro período de 24 horas (en el caso de las células que serían analizadas en condiciones de estrés, manteniéndose con medio completo las células que serían utilizadas como controles). La actividad de la luciferasa se midió por triplicados utilizando el sistema *Dual-Glo Luciferase Assay* (*Promega*) en el luminómetro *GloMax 20/20* (*Promega*). La eficiencia de la

transfección se determinó transfectando paralelamente con 2 ng del vector control Renilla-luciferasa (*Promega*) y los resultados se normalizaron de acuerdo a la cantidad de proteína y se expresaron como el cambio sobre los niveles control.

5.1.11. Transducción de hMSC

Los vectores lentivirales, a diferencia de otros vectores virales como los retrovirus, permiten la transducción de células primarias refractarias a la transfección, incluyendo las células que no se encuentran proliferando activamente, y permiten la integración de genes o secuencias de RNA interferente en el genoma de las células transducidas.

Los constructos Lentivirales NT shRNA pLKO.1 y Oct-1 shRNA pLKO.1 se obtuvieron de *Sigma*. Los vectores Lentivirales se generaron en la Plataforma de Vectores Virales de la fundación Inbiomed (<http://www.inbiomed.org>). Las hMSC entre los pases 6-8 se infectaron con una carga viral de 10 partículas por núcleo (10 MOI [Multiplicidad de Infección]) en presencia de 8 µg/ml de polibreno, de acuerdo al siguiente protocolo:

Día 1: 24 horas previas a la infección, se sembraron en placas p6 aproximadamente 150.000 células por pocillo en medio completo de proliferación, obteniendo para el día de la infección una confluencia óptima del 60-70%.

Día 2: Las alícuotas de lentivirus almacenadas a -80°C se descongelaron en hielo durante varias horas, se mezclaron gentilmente y se realizó un centrifugado rápido antes de abrir el vial que los contenía. A continuación, se prepararon las mezclas conteniendo los virus y el polibreno (a las concentraciones descritas previamente), diluidos en medio completo de proliferación, con las cuales se incubaron las hMSC durante 6 horas a 37°C y CO₂=5%. Posteriormente se retiró el medio con los virus (teniendo las precauciones necesarias para su inactivación correcta en un contenedor con lejía al 10%) y después de tres lavados sucesivos con PBS 1X se añadió nuevamente medio de proliferación completo.

Días 3 y 4: se repitió el procedimiento de realizar tres lavados sucesivos con PBS 1X y se añadió nuevamente medio de proliferación completo.

Día 5: 72 horas post infección se realizaron tres lavados sucesivos con PBS 1X, se procedió a privar de suero (FBS) durante las próximas 24 horas la mitad de las células sembradas para cada condición y se recogieron la otra mitad de células que se utilizarían luego para extraer RNA y proteínas para su análisis posterior (como condiciones control de las condiciones de estrés); además se procedió a sembrar portaobjetos para realizar posteriormente el análisis con técnicas de inmunofluorescencia.

Día 6: 96 horas post infección, se realizaron tres lavados sucesivos con PBS 1X y se recogieron las células en condiciones de privación de suero para extraer RNA y proteínas que serían analizados posteriormente.

5.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

5.2.1. Extracción de RNA total.

Para la extracción del RNA, debido a que es un material biológico muy inestable que puede degradarse fácilmente, la manipulación de las muestras se realizó en condiciones libres de RNasas. Se extrajo el RNA total correspondiente a 1×10^6 hMSC de cada condición utilizando el sistema de aislamiento *High Pure RNA isolation Kit® (Roche)*, de acuerdo al siguiente protocolo: para resuspender la fracción celular se añadieron 200 μ l de PBS por cada 1×10^6 células, luego se añadieron 400 μ l de solución de lisis y se utilizó un aparato de vórtex para agitar las muestras durante 15 segundos. Posteriormente se transfirió cada muestra a un tubo *High Pure Filter* donde se centrifugó a 8.000 rcf por 15 minutos, se añadió luego una mezcla de 90 μ l de solución tampón de DNasa + 10 μ l de DNasa I, incubándose durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron una serie de lavados, inicialmente con 500 μ l de solución tampón de lavado I y se centrifugó durante 15 segundos a 8.000 rcf, luego con 500 μ l de solución tampón de lavado II y se centrifuga durante 15 segundos a 8.000 rcf y finalmente 200 μ l de solución tampón de lavado II y se centrifuga durante 2 minutos a 14.000 rcf. Se traslada el tubo con el filtro a un tubo nuevo estéril, libre de RNasa. El último paso de elución del RNA se realiza agregando 50-100 μ l de solución *elution buffer* y posteriormente centrifugando durante 1 minuto a 8.000 rcf. La concentración y calidad del ARN extraído se determinó en un espectrofotómetro *NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific)*, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. Se consideró que la pureza del RNA era óptima cuando el ratio A 260/ A 280 se encontraba entre 1,9 y 2,1.

5.2.2. Transcripción inversa y generación de cDNA.

La transcripción inversa y generación del cDNA se realizó con el set *High-Capacity cDNA Reverse Transcript (Applied Biosystems)* a partir de 500 ng a 1 μ g de RNA de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Tabla 3. Reactivos incluidos en cada reacción de RT-PCR (*Applied Biosystems*).

Descripción	Reactivos	Volumen (μl)
RNA en solución Tampón	Muestra de 500 ng a 1 μg de RNA H ₂ O Solución Tampón 2X	10
Mezcla de reacción que incluye:	- 10X RT Buffer [2 μl] - 25X dNTP Mix (100 mM) [0.8 μl] - 10X RT Cebadores Aleatorios [2 μl] - Transcriptasa Inversa MultiScribe™ [1 μl] - Inhibidor de RNasa [1 μl] - Agua libre de Nucleasa [3.2 μl]	10

Las condiciones térmicas de la amplificación incluyeron una incubación inicial de 10 minutos a 25°C, seguida por 120 minutos a 37°C y finalmente 5 minutos a 85°C. Conservando el producto de las reacciones a -4°C hasta su utilización a corto plazo o a -20°C en caso de guardarla a más largo plazo.

5.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

La RT-qPCR se realizó por triplicado para cada condición de muestra analizada en el termociclador *Applied Biosystems 7900 HT Fast Real-Time PCR System* utilizando la mezcla maestra *Power SYBER Green (Applied Biosystems)* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El fluorocromo *SYBER Green* que se une específicamente a ácidos nucleicos de doble hebra emitiendo fluorescencia a 580 nm, de modo que al aumentar la cantidad de productos de PCR sintetizados, aumenta la intensidad de fluorescencia, que se registra a tiempo real mediante el detector de fluorescencia del termociclador y que se procesa mediante el programa *ABI Prism 7900 SDS*. Durante la PCR la fluorescencia aumenta siguiendo una curva sigmoidea como se observa en la figura 22, cuyo crecimiento resulta de la amplificación exponencial del producto de la reacción y cuya saturación está determinada por el agotamiento de los reactivos, siendo la fase exponencial el único momento del proceso en el que la cantidad de producto amplificado es proporcional a la cantidad de cDNA diana inicial. La cantidad de cDNA de una secuencia determinada se estima a partir del número de ciclos necesario (*Ct*) para que la fluorescencia del producto de la PCR alcance un umbral (*T*). Dicho umbral se establece en un nivel de fluorescencia suficientemente alto para distinguirse del ruido y ser detectable por el termociclador, que se halle en la fase en que la amplificación es todavía aproximadamente exponencial. El *software* del termociclador (*ABI Prism 7000 SDS Software*) calcula automáticamente el umbral óptimo.

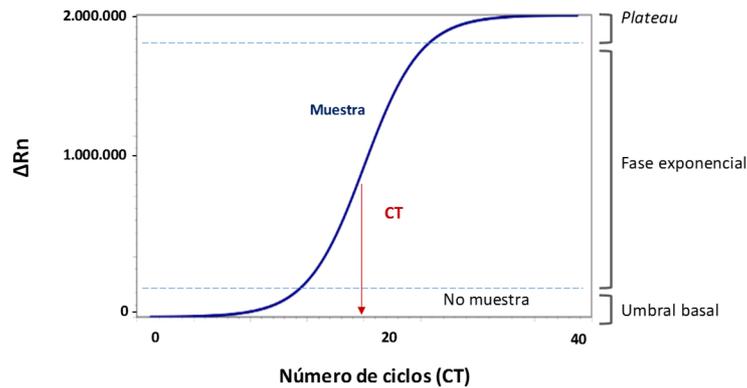


Figura 22. El proceso de PCR se puede dividir en tres fases: Fase Exponencial (utilizada para la detección de fluorescencia en la RT-qPCR) en la que a medida que se avanza de ciclo se produce exactamente el doble del producto que en el ciclo anterior (asumiendo el 100% de eficiencia); Fase Lineal en la que la reacción comienza a ralentizarse y a ser imprecisa dado que los reactivos necesarios para llevarla a cabo comienzan a consumirse; y la Fase Plato (*Plateau*) en la que la reacción se detiene y no se sintetizan más productos. En esta última fase es cuando se detectan los productos obtenidos mediante PCR tradicional, por lo que esta PCR es óptima para la detección de una secuencia de DNA diana, pero no para su cuantificación.

Para determinar la concentración inicial relativa (c) del cDNA reconocido por los cebadores, en cada ensayo se realiza una PCR a partir de unas diluciones seriadas de cDNA, y a partir de estas reacciones se calcula mediante regresión una recta estándar de Ct en función del logaritmo de las diluciones ($\log c$). La función de esta recta es:

$$Ct = m \log c + n$$

donde el programa calcula la concentración inicial relativa de cada muestra:

$$c = 10^{(Ct - n)/m}$$

La pendiente de esta recta es

$$m = \Delta Ct / \log \Delta c$$

Teniendo en cuenta que en condiciones ideales cada ciclo dobla el valor de fluorescencia, cada dilución 1/2 de la muestra aumenta el valor Ct en 1, y así, la pendiente ideal de la recta estándar es

$$m = \Delta Ct / \log \Delta c = -1 / \log 2 = -3,32$$

Pendientes menores que este valor indican una menor eficiencia, y en tal caso la PCR no es válida. La eficiencia de la PCR, e , es una medida de cuántas veces aumenta la fluorescencia por cada ciclo

$$e = 10^{-1/m} = 10^{\log \Delta c / \Delta Ct}$$

En condiciones ideales,

$$e = 10^{-1/m} = 10^{\log \Delta c / \Delta Ct} = 10^{\log 2} = 2$$

Para cada muestra, es necesario también determinar la concentración inicial relativa del cDNA de un gen *housekeeping*, del que previamente se sepa que no existe variación entre las condiciones

analizadas, y que sirve de control endógeno de la cantidad de cDNA añadida en cada reacción. Posteriormente, se calcula el valor corregido de la concentración inicial relativa:

$$C_{\text{corregido}} = C / C_{\text{housekeeping}}$$

Esta división corrige los errores acumulados en todos los procesos hasta el fin de la RT-qPCR, de manera que las muestras pueden ser comparadas linealmente entre sí mediante este valor. Se eligió el gen *GAPDH* como control endógeno, una vez comprobado que la expresión de este gen no variaba entre las muestras. Para realizar la cuantificación de la expresión génica se realizó una curva estándar empleando diluciones seriadas de un *pool* de cDNA extraído del total de las muestras a analizar en cada caso. Además, se incluyeron triplicados de cada una de las condiciones con y sin cDNA (control negativo), calculándose la media y la desviación estándar a partir de las réplicas.

Para determinar la expresión génica, se obtuvieron los valores relativos de expresión para cada gen de cada una de las muestras respecto a la curva estándar realizada para cada gen. Para cada muestra, se calculó la relación entre el valor obtenido del gen a analizar y el control endógeno. Estos datos fueron empleados en el cálculo de la expresión génica relativa de cada muestra respecto a su control correspondiente.

Los cebadores utilizados fueron diseñados con el software *Primer3Plus* o se obtuvieron de publicaciones previas por ejemplo, para los cebadores de OCT-1 (Liu *et al.*, 2015). Las secuencias utilizadas se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de oligos empleados para la amplificación por Q-RT-PCR.

GEN	Descripción	Secuencia (5'-3')
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Cebador directo: CCACCCATGGCAAATTCATGGCA Cebador reverso: TCTAGACGGCAGGTGAGTCCACC
Oct-1 /POU2F1	POU Class 2 Homeobox 1	Cebador directo: GAAGCCTTGAACCTCAGCTTT Cebador reverso: TCTCTATGCTGGTGCGTTTCT
ZMPSTE24/ FACE1	Zinc Metallopeptidase STE24	Cebador directo: CAAATTCACACCTCGCTGAGG Cebador reverso: GCATTGCTGTGGGAAGAGCGTT
GPNUMB	Glycoprotein Nmb	Cebador directo: AAGTGAAGATGTGTACGTGGTAACAG Cebador reverso: TCGGATGAATTCGATCGTTCT
CTSK	Cathepsin K	Cebador directo: CATTTAGCTGCCTTGCCTGT Cebador reverso: ATATGTGCAGAAGAACCGG
Ly96	Lymphocyte Antigen 96	Cebador directo: TCTGCAACTCATCCGATGCA Cebador reverso: CTCCCTCAGAGCTCTGCAA
GPX-3	Glutathione Peroxidase 3	Cebador directo: CGGGGACAAGAGAAGTGC Cebador reverso: CCCAGAATGACCAGACCG
DHRS9	Dehydrogenase Reductase 9	Cebador directo: CCAGAGAATGTCAAGAGGACTGC Cebador reverso: CTGTAGTCCTCTAGTGTCAGCC
RDH5	Retinol Dehydrogenase 5	Cebador directo: CTGTGACCAACCTGGAGAGTCT

		Cebador reverso: GATGCGCTGTTGCATTTTCAGGT
DHCR24	24-Dehydrocholesterol Reductase	Cebador directo: CAGGAGAACCACTTCGTGGAAG Cebador reverso: CCACATGCTTAAAGAACCACGGC
SCARA3	Scavenger Receptor Class A Member 3	Cebador directo: CTCCGAAGACATCTCCTTGACC Cebador reverso: CCAGCTTCATGGCAGAAAGAGC
MSRB1 /SEPX1	Methionine Sulfoxide Reductase B1	Cebador directo: GCGTTCACCGAGACCATTACG Cebador reverso: CCGTCGTTCAGGAACTCGTGG
BCL2	BCL2, Apoptosis Regulator	Cebador directo: ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT Cebador reverso: GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC
PIG3	p53 inducible gene 3	Cebador directo: GCAAATTCTGCCTCACTTCTCC Cebador reverso: TTATGGGCCTCCTGGATTCG

Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en un termociclador *ABI Prism 7900 HT* (*Applied Biosystems*) usando el programa SDS 2.4. Las condiciones térmicas de la amplificación incluyeron una incubación inicial a 95°C durante 20 segundos (paso necesario para activar la polimerasa), seguida de 40 repeticiones del ciclo en el que se mantiene de 10-15 segundos a 95°C (para la desnaturalización del DNA), 30-60 segundos a 58-60°C (dependiendo de cada gen, para el alineamiento de los oligos con su secuencia diana) y 15-60 segundos a 72°C (para la elongación), seguidos de un ciclo curva de disociación para verificar que se ha amplificado un único producto.

5.2.4. Análisis de expresión génica mediante *microarray*.

Para el análisis de expresión génica se extrajo RNA total de las hMSC utilizando el set *High Pure RNA Isolation Kit* (*Roche*) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se cuantificó con el equipo *NanoDrop® ND-1000* (*Thermo Scientific*), midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. Se consideró que la pureza del RNA era óptima cuando el ratio A260/ A280 se encontraba entre 1,9 y 2,1. La cantidad y la calidad del RNA se evaluaron con el set *Agilent Bioanalyzer Nanochip*.

Se llevó a cabo un análisis de expresión de todo el genoma utilizando el set *HumanHT-12 v4 Expression BeadChips* (*Illumina Inc.*), lo que permitió analizar 47.000 genes diana que cubren más de los 25.000 genes humanos registrados. La síntesis de cRNA se realizó con el set *Epicentre's TargetAmp Nanog Biotin-aRNA Labelling* para el sistema *Illumina*, y la posterior amplificación, etiquetado e hibridación se realizó de acuerdo con los protocolos del fabricante. Los datos de expresión se analizaron con el programa *R/Bioconductor Statistical Computing Environment* (www.r-project.org, www.bioconductor.org). Utilizando el programa *Lumi* (Du *et al.*, 2008) los datos de expresión crudos se transformaron en log₂ (expresando así el ratio de expresión en lo que se denomina *fold change*), y se normalizaron cuantitativamente. Para la detección de genes expresados diferencialmente, se aplicó un modelo lineal y se calculó la T-estadística de Bayes utilizando el programa *Limma* (*Smyth*) de Bioconductor. Para este

experimento se caracterizaron dos muestras biológicas y una replica técnica por condición, por lo que se realizaron finalmente tres hibridaciones independientes por condición de tratamiento. Los datos obtenidos de los microarrays se han depositado en *Gene Expression Omnibus* (GEO, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) con el número de registro GSE52563.

5.2.5. Extracción y cuantificación de proteínas

Para la detección de proteínas mediante *Western blot* se procedió a la obtención del extracto proteico mediante la incubación de 1×10^6 células en 100 μ l de tampón de lisis compuesto por NP-40 1%, Sodium deoxycholate 0,25%, NaCl 150 mM, EGTA 1 nM, PMSF 1 nM, NaF 1 mM, aprotinin 1%, leupeptin 1%, pepstatin 1% (*Thermo Fisher*), ajustado a un pH 7,4, al que se adicionó un cóctel inhibidor de proteasas (*Thermo Fisher*) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (*Thermo Fisher*) 1 mM. El extracto celular de cada muestra se incubó con el tampón de lisis durante 30 minutos a 4°C y el lisado celular resultante se centrifugó a 14.000 rcf durante 15 minutos a 4°C. Esta centrifugación permite eliminar los restos celulares particulados y obtener un sobrenadante con el lisado celular, que se almacenó a -80°C para su posterior uso.

La concentración proteica de cada muestra se cuantificó por triplicado empleando el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (*Thermo Fisher*) basado en el método del ácido bicinconínico o BCA (*Thermo Fisher*). Mediante concentraciones conocidas de Albumina Sérica Bovina (BSA) se estableció la recta de calibrado que permite calcular la absorbancia correspondiente a la concentración proteica de la muestra. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro *POLARstar® Omega* (*BMG Labtech*).

5.2.6. Western blot

Se sometieron cantidades equivalentes de los extractos de proteínas obtenidos (30-100 μ g) a electroforesis en geles de poliacrilamida *NuPAGE® Bis-Tris* al 4-12% (*Novex™, Life Technologies*) en condiciones desnaturalizantes y reductoras a un voltaje continuo de 180 V durante 1-2 horas, usando una cubeta *X CellSureLock®* (*Invitrogen*) e incluyendo un marcador de peso molecular (*Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard*, *Invitrogen*). A continuación, las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de PVDF mediante el sistema de transferencia en seco *iBlot® Gel transfer System* (*Invitrogen*).

Una vez realizada la transferencia de proteínas, se bloqueó la membrana con 5% de BSA ó 5% leche desnatada (*Sveltesse, Nestlé*) en tampón TTBS (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM y 0,1% (v/v) de Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se incubó con

el anticuerpo correspondiente (tabla 5) diluido en tampón de bloqueo a una concentración de 0.5-1 µg/ml durante toda la noche a 4°C. Después de tres lavados se incubaron las membranas con un anticuerpo secundario correspondiente diluido 1:3000 en tampón TBST con 5% BSA ó 5% de leche desnatada (*Sveltesse, Nestlé*) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, y tras tres lavados sucesivos, la inmuno-reacción se detectó por quimioluminiscencia con el kit *Supersignal West Femto (Thermo Fisher)* y se visualizó con el sistema de imagen *G: BOX* y su programa de análisis *Gene Snap (Syngene)*. Como control de carga proteica, se analizó la expresión de β-Actina con un anticuerpo específico (clon A5441, *Sigma®*) a una dilución 1:5000.

Tabla 5. Lista de Anticuerpos Primarios Utilizados.

Anticuerpo Primario	Especie	Peso Molecular	Dilución
Anti-Prelamin A sc-6214 (<i>Santa Cruz</i>)	Cabra	69 KDa	1:100
Anti-Lamin A/C sc-6215 (<i>Santa Cruz</i>)	Cabra	69/62 KDa	1:100
Anti-Progerina SAB4200272 (<i>Sigma</i>)	Ratón	67 KDa	1:400
Anti-FACE1 205-8C10*	Ratón	55 KDa	1:500
Anti-Oct-1 sc-232 (<i>Santa Cruz</i>)	Conejo	95 KDa	1:300
Anti-Oct-1 #4428 (<i>Cell Signaling</i>)	Conejo	95 KDa	1:1000
Anti-β-Actina A5441 (<i>Sigma</i>)	Ratón	42 KDa	1:3000
Anti-LC3-II (<i>Thermo Fisher</i>)	Conejo	15/19 KDa	1:2000
Anti-P62 (SQSTM1) (<i>Thermo Fisher</i>)	Conejo	62 KDa	1:3200
Anti-pS6 #2215 (<i>Cell Signaling</i>)	Conejo	32 KDa	1:1000
Anti-Total S6 #2217 (<i>Cell Signaling</i>)	Conejo	32 KDa	1:1000
Anti-P mTOR Ser 2448 D9C2 #5536 (<i>Cell Signaling</i>)	Conejo	289 KDa	1:1000

* Gentileza del Laboratorio de los Dres. C. López-Otin y J.M.P. Freije (*Navarro et al., 2005*).

5.2.6.1. Stripping de la membrana

En algunos casos se reutilizaron las membranas para hacer una segunda inmuno-detección, para lo cual se realizó el siguiente protocolo: se lavó la membrana en agua destilada durante 5 minutos y al cabo de ese tiempo se añadió solución de *stripping (Thermo Fisher)* con la cual se incubó la membrana con agitación suave a 70°C, durante 45 minutos. Luego se lavó la membrana con agua tri-destilada inicialmente y posteriormente con TTBS.

5.3. ENSAYOS FUNCIONALES *IN VIVO* EN UN MODELO MURINO DE ISQUEMIA.

5.3.1. Modelo animal y técnica quirúrgica

Para el estudio en animales se obtuvo previamente la autorización del comité de ética del CIC biomaGUNE y de las autoridades locales; y se siguieron las Directivas de la Unión Europea sobre la ética y el bienestar animal. Los ratones con Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID) (ratones de 12 semanas; *Janvier*) (n=19) fueron anestesiados con Isoflurano 4% en la inducción, dicha anestesia se mantuvo con 2% de Isoflurano y oxígeno al 100%. Posteriormente se realizó una incisión longitudinal en la piel de la parte media que cubre el miembro trasero izquierdo de cada animal. La isquemia se realizó ligando la arteria femoral con puntos de nylon de 7 ceros en dos puntos, tanto a nivel proximal como a nivel distal donde se bifurca en las arterias safena y poplítea, con el fin de evitar que posible circulación colateral pudiera suplementar el riego arterial en caso de ligar un solo punto del recorrido arterial. La arteria femoral y todas las ramas colaterales se disecaron y se extirparon. Seguidamente a la disección arterial los ratones SCID fueron asignados inmediatamente a los siguientes grupos experimentales: el grupo de hMSC tratadas con DMSO (ver sección 1.1.2) (n=7), el grupo de hMSC tratadas con TPV (ver sección 1.1.2) (n=7), y el grupo donde solo se utilizaría el vehículo o medio de cultivo (ver sección 1.1.2) (n=5). En cada animal correspondiente se inyectaron vía intramuscular en 4 sitios diferentes de la porción medial del músculo *gracilis*, un total de 3×10^6 células en un volumen total de 200 μ l de medio. La perfusión tisular y el flujo de sangre de los miembros traseros se evaluaron a los 14 días posteriores a la isquemia con tomografía por emisión de positrones (PET) y con el sistema de perfusión Laser Doppler a los 0, 7, 14 y 21 días post isquemia (Figura 23). Así como también evaluamos a los 21 días la pérdida del miembro donde se produjo la isquemia en cada animal.

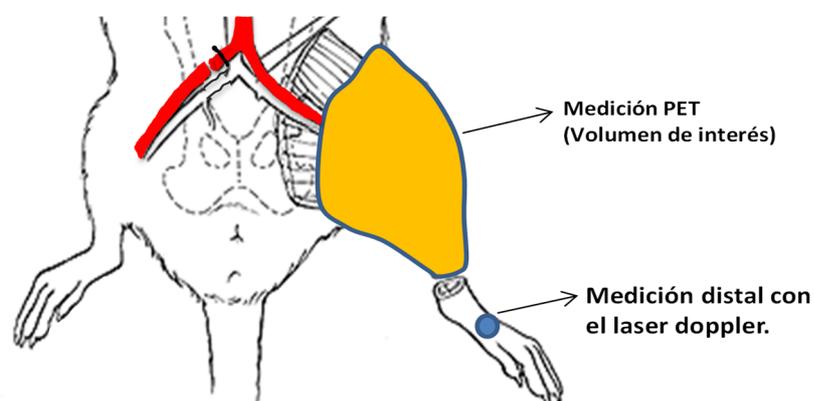


Figura 23. Esquema del modelo animal y zonas de medición.

5.3.2. Mediciones del flujo sanguíneo de los miembros inferiores del ratón.

El flujo sanguíneo de las extremidades posteriores se evaluó mediante el sistema Láser Doppler (*Perimed AB*). El día 21 post isquemia los animales fueron anestesiados con Isoflurano 4% en la inducción y posteriormente se mantuvo la anestesia con 2% de Isoflurano y oxígeno al 100%. Los ratones se colocaron en posición supina y la sonda recta del laser-doppler (calibre 1 mm) se situó sobre la zona distal de la isquemia para medir el flujo sanguíneo superficial de esas regiones. Después de lograr un registro estable, se monitorizó el flujo sanguíneo durante 10 minutos en cada miembro posterior. Para la cuantificación, la adquisición se promedió y se expresó en unidades arbitrarias (AU), posteriormente se relacionó el flujo de cada miembro posterior del animal, el isquémico y el contralateral, generando una ratio que se expresó en AU.

5.3.3. Radioquímica

Para la realización del PET, en las instalaciones de la Unidad de Imagen Molecular en el departamento de radioquímica del CICbiomaGUNE se obtuvieron las partículas marcadas. A modo de resumen, para la producción de amoníaco [^{13}N] una solución acuosa de etanol 5 mM (1,7 ml) fue bombardeada con protones de 18 MeV (objetivo actual = 20 μm) en un ciclotrón IBA 18/9 (^{13}N reacción nuclear $^{16}\text{O}(\text{p}, \alpha)$). El líquido irradiado se eluyó a través de un cartucho catiónico de intercambio de fase sólida (*CM, Wáter*) para retener selectivamente NH_4^+ [^{13}N]. Después de lavar el cartucho con 5 ml de agua para inyección (*Braun*) se eluyó el radio-trazador con 10 ml de solución salina fisiológica. Se obtuvieron alrededor de 1110 MBq (Becquerel, Unidades del Sistema internacional de radioactividad) en un tiempo de síntesis total de 4 minutos (desde el final del bombardeo).

5.3.4. Tomografía por emisión de positrones (PET) y adquisición de datos

Los escáneres PET se realizaron 14 días después de la inducción de la isquemia de la extremidad posterior en los ratones, utilizando una cámara CT *General Electric eXplore Vista*. Inicialmente se indujo la anestesia general en los ratones con Isoflurano 4% y continuó al 2% de Isoflurano y oxígeno al 100% para su mantenimiento. Los animales se colocaron en un soporte para roedores compatible con el sistema de adquisición de PET y se mantuvo su temperatura corporal normal mediante el uso de una manta generadora de calor a base de agua. Se inyectaron 50 MBq de NH_4 [^{13}N] en la vena de la cola de cada ratón 10 minutos antes del inicio de la adquisición del PET. Se obtuvieron imágenes dinámicas (30 fotogramas: 10x5, 5x15, 3x30, 4x60, 2x90, 2x120, 2x180 segundos) en la ventana energética de 400-700 KeV, con un tiempo total de adquisición de 22 minutos, proporcionando 0,387 mm de espesor de 175 cortes transaxiales y 0,775 Mm de espesor en 61 cortes axiales. Después de cada exploración de PET,

también se realizaron adquisiciones de Tomografía Computada (CT) a intensidad 140 μ A y 40 kV de voltaje, proporcionando información anatómica de cada animal, así como el mapa de atenuación para la reconstrucción de la imagen posterior. Las adquisiciones dinámicas se reconstruyeron (corregidas por la decadencia y atenuación basadas en la CT), con retroproyección filtrada (FTP) utilizando un filtro Rampa con una frecuencia de corte de 1 Hz.

5.3.5. Análisis de Imagen de la tomografía por emisión de positrones (PET)

Las imágenes de PET se analizaron utilizando el programa de análisis de imágenes POR (*POR Technologies Ltd*). Los volúmenes de interés (VOIs) se delimitaron anatómicamente desde la cresta ilíaca hasta el final de las extremidades posteriores isquémicas y las contralaterales utilizando las imágenes adquiridas con CT en cada animal. Posteriormente, las imágenes del escáner PET fueron co-registradas automáticamente a los datos anatómicos de la CT y los VOIs se utilizaron para estudiar la perfusión en ambas extremidades posteriores. Para la cuantificación se determinaron los marcos 27-30 (los últimos 10 minutos de adquisición del escáner PET y se determinó la absorción en cada VOI (media \pm desviación estándar), se expresó como porcentaje de la dosis inyectada por peso corporal (%ID/g). Se obtuvo el ratio %ID/g del miembro isquémico y su contralateral.

5.4. ANÁLISIS COMPUTACIONAL

5.4.1. Análisis de anotación funcional y clasificación de los genes

Para la clasificación funcional de los genes cuya expresión se encontraba alterada en nuestras muestras se realizó un análisis utilizando la aplicación *Gene Ontology* (GO) del programa *DAVID* (*Database, Visualization and Integrated Discovery*) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) (Denis *et al.*, 2003). De esta forma se definen categorías funcionales relacionadas a los "Procesos Biológicos" de los genes cuya regulación está alterada, en las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de estrés de una forma consensuada, por intermedio de los métodos estadísticos proporcionados por el programa informático. Mediante la aplicación *EASE* (una modificación del Test exacto de Fisher) con un valor $p < 0,05$ se seleccionaron las categorías significativamente sobre-representadas o enriquecidas en las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de estrés. A modo de confirmación de la reproducibilidad de nuestro análisis, utilizamos además la herramienta de análisis funcional *FatiGO* (Al-Shahrour *et al.*, 2004) parte de *babelomics suite* (www.babelomics.org). En el análisis de *FatiGO*, el test exacto de Fisher se utiliza para determinar

los genes significativamente sobre-representados en una lista comparados con la otra. Se aplicaron test de correlación múltiples como describió Al-Sharour *et al.*, 2004. El análisis se llevó a cabo teniendo en cuenta todos los genes en el microarray *HumanHT-12 v4 (Illumina)* que se encontraron desregulados, considerados como aquellos con un *fold change* >1.4 ó <1.4 , con un valor $p < 0,05$.

5.4.2. Análisis computacional de regiones promotoras

Para identificar el posible enriquecimiento de sitios de unión de los factores de transcripción dentro de los promotores o Elementos Reguladores (RE) conservados de los genes desregulados utilizamos el servidor DiRE (<http://dire.dcode.org>) (Gotea *et al.*, 2008). La lista de genes desregulados contenía suficientes genes para poder evaluar con precisión el número de elementos reguladores presentes. Se utilizó como comparador de fondo la lista completa de genes humanos de microarrays. El término *Ocurrencia* indica la fracción de RE posibles que contienen un sitio de unión para un factor de transcripción particular; mientras que la *Importancia* se define como el producto de la ocurrencia y el peso asignado a cada factor de transcripción, lo que resulta en una medida de la asociación del factor de transcripción en relación al total de genes analizados.

Para la búsqueda y localización de motivos de unión de factores de transcripción, se utilizó la aplicación: *MotifLocator*, (<http://bioinformatics.intec.ugent.be/MotifSuite/motiflocator.php>) (Thijs *et al.*, 2002). Esta aplicación permite la búsqueda de motivos de unión de factores de transcripción, para ello se comparan las secuencias introducidas en el programa con PWMs (*position-weight matrices*) pertenecientes a la base de datos JASPAR. La comparación se basa en la similitud entre la secuencia y la matriz según lo establecido por el programa *MatInspector* (<http://www.genomatix.de/products/MatInspector/index.html>). El valor umbral mínimo se fijó en 0.85, que marca lo riguroso que es el análisis de similitud.

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa SPSS. A menos que se indique lo contrario, los datos se derivan de al menos tres repeticiones biológicas independientes en muestras triplicadas. Para determinar si las diferencias entre los grupos eran significativas, se aplicó el estadístico T-student para los datos con una distribución normal y el test de U de Mann-Whitney-Wilcoxon para los datos no paramétricos. Las diferencias se consideraron como

estadísticamente significativas cuando tenían al menos un valor $p < 0,05$. Los resultados cuantitativos se expresan como medias \pm las desviaciones estándar (SD). Las comparaciones entre las células tratadas y las células control así como la medición de la longitud de los telómeros, se realizaron con los test estadísticos T-Student y χ^2 . Se consideraron los valores $*p < 0,05$ como significativo; $**p < 0,01$ como muy significativo o $***p < 0,001$ como altamente significativo.

VI. RESULTADOS

6.1. OBJETIVO 1: EVALUACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE PRELAMIN A EN hMSC.

6.1.1. El tratamiento con TPV genera acumulación de prelamín A en hMSC.

Para inducir la acumulación de la proteína inmadura prelamín A y de esta manera generar nuestro modelo experimental se trataron las hMSC con el inhibidor de la proteasa del VIH, TPV a concentraciones farmacológicas de 30 μM . Después de 7 pases de tratamiento se determinó mediante inmunofluorescencia la expresión de la proteína inmadura prelamín A. En la figura 24 se observa la acumulación nuclear de prelamín A (Ukekawa *et al.*, 2007) en las células tratadas con TPV.

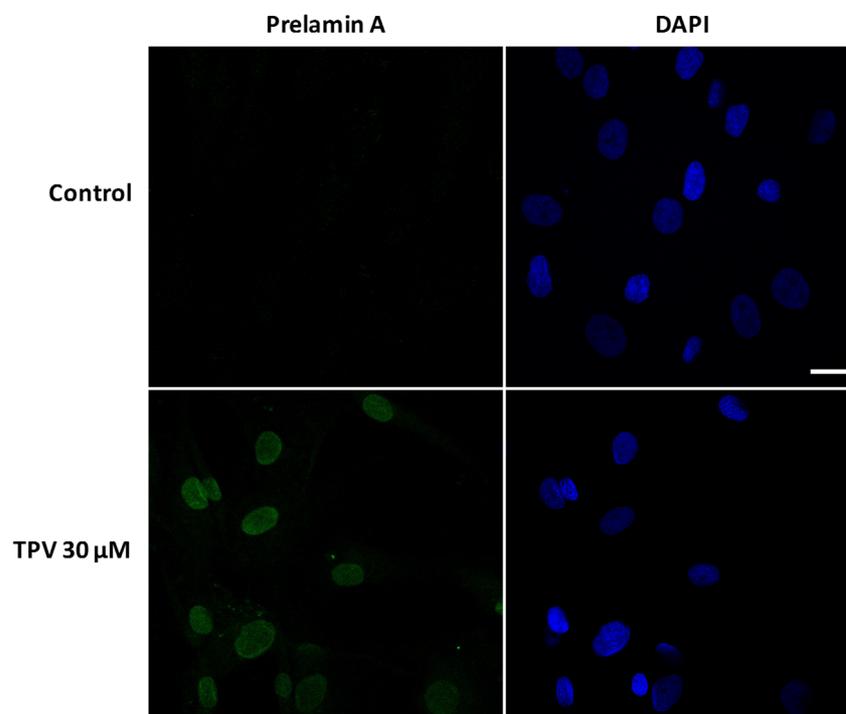


Figura 24. Detección de prelamín A mediante inmunofluorescencia. Se observa la acumulación de prelamín A en las hMSC tratadas con TPV a concentración farmacológica de 30 μM . En color verde se muestra la proteína prelamín A y en azul los núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala 10 μm .

Con el fin de facilitar la lectura de esta tesis, se denominarán como **Pre** a las hMSC tratadas con TPV que acumulan prelamín A, y como **Ctrl** a las hMSC control que han sido tratadas con el solvente (*DMSO*). Así mismo se designarán como **Condiciones Basales** al cultivo de las hMSC en medio completo (descrito en el apartado material y métodos, sección 1.1.2), y como **Privación de Suero** al cultivo de las hMSC en el medio de cultivo anteriormente descrito sin el componente de FBS (suero), el cual será utilizado en la amplia mayoría de los experimentos, (salvo cuando se especifique lo contrario) como **condición de estrés** celular.

6.2. OBJETIVO 2: VALIDACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE ENVEJECIMIENTO BASADO EN hMSC QUE ACUMULAN PRELAMIN A.

Para valorar si nuestro sistema experimental es un modelo fidedigno para estudiar el envejecimiento celular humano, evaluamos a continuación si las células que acumulan prelamina A son capaces de recapitular los fenotipos de envejecimiento propuestos por López-Otín *et al.* (2013), que hemos descrito previamente.

6.2.1. Acortamiento de los telómeros.

Inicialmente estudiamos si la acumulación de prelamina A era capaz de inducir el acortamiento de los telómeros, característico de las células envejecidas. Para ello se analizó la longitud de los telómeros tanto en las hMSC control (ctrl) como en las que acumulan prelamina A (pre) obtenidas a partir de cuatro donantes de médula ósea de diferentes edades, utilizando la técnica de fluorescencia cuantitativa por hibridación *in situ* (HT-QFISH) (Canela *et al.*, 2007). De acuerdo con estudios previos en los que la longitud media de los telómeros en hMSC adultas se estimó en 7,2 kb (Guillot *et al.*, 2007), se observó que las hMSC evaluadas en nuestro estudio presentaban una longitud media de telómeros de 5,11 a 11,17 kb (Figura 25 A). Como era previsible, se aprecia que el donante más joven (18 años de edad) presentó los telómeros más largos (11,17 kb) en las células control. Además, se observó que en cada donante había una disminución en la longitud media de telómeros de las hMSC que acumulan prelamina A en comparación con la longitud media de los telómeros de sus respectivos controles. La diferencia de la longitud telomérica fue estadísticamente significativa en tres muestras dando como resultado una pérdida de 640, 400 y 380 pb en los donantes de 18, 25 y 58 años de edad respectivamente. Debido a que el porcentaje de los telómeros críticamente cortos (definidos como el porcentaje de telómeros que presentan una longitud menor a 3 kb) aumenta significativamente con la edad en células humanas (Hemann *et al.*, 2001; Canela *et al.*, 2007), exploramos si la acumulación de prelamina A en las hMSC era capaz de afectar la longitud telomérica *in vitro*. Para ello, se analizó la longitud de los telómeros de cada uno de los donantes, así como el porcentaje de telómeros con una longitud crítica. A excepción de las hMSC derivadas del donante de 18 años de edad, el porcentaje de telómeros con una reducción inferior a 3 kb fue significativamente mayor en las hMSC que acumulan prelamina A (Figura 25 B).

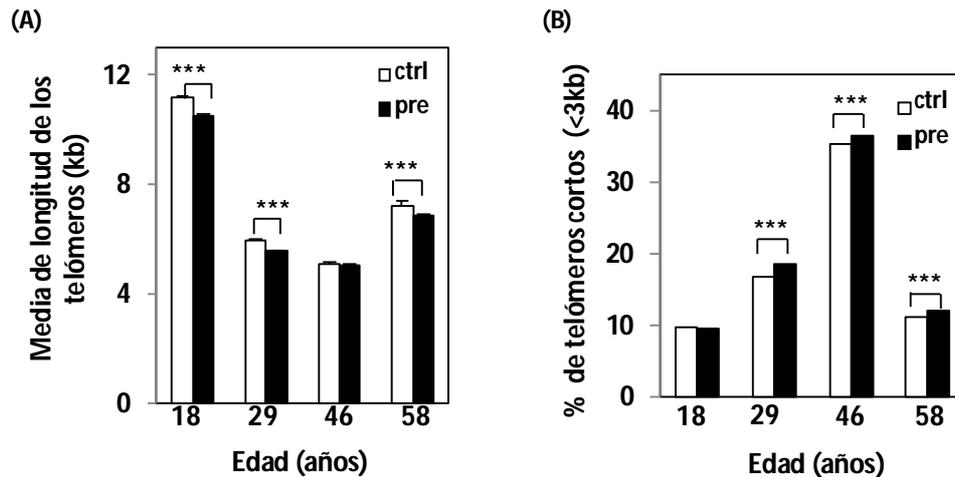


Figura 25. Efecto de la acumulación de prelamin A en el acortamiento de los telómeros. (A) La longitud de los telómeros, y (B) el porcentaje de telómeros cortos fueron analizados por HT-Q-FISH. Se analizaron un mínimo de 17.000 núcleos por muestra. Las barras muestran el promedio \pm SD de las hMSC derivadas de cuatro donantes de médula ósea. Para la significación estadística se realizó el test χ^2 . *** $p < 0.001$. Pre: hMSC que acumulan prelamin A. Ctrl: hMSC control.

6.2.2. Inestabilidad genómica

Debido al nexo establecido entre el acortamiento de los telómeros y el daño a nivel de DNA (López-Otín *et al.*, 2013), a continuación, nos propusimos estudiar si la acumulación de prelamin A en las hMSC podría inducir la activación de la respuesta de daño al DNA.

6.2.2.1. Inducción de la señalización de daño al DNA.

El estado de fosforilación de la histona H2AX (γ -H2AX) es un marcador clásico de respuesta de daño al DNA (Rogakou *et al.*, 1998). El marcaje y cuantificación celular de esta histona mediante microscopia de fluorescencia permite valorar el daño al DNA que presentan las células. Se cuantificaron los focos de γ -H2AX presentes en cada núcleo celular, considerando como daño severo aquellos casos donde se contaron más de 20 focos de γ -H2AX por núcleo. Se observó una mayor fosforilación de H2AX en las hMSC que acumulan prelamin A en comparación con las células control (Figura 26). Cabe destacar que no solo se produce un aumento de esta señalización en las células que acumulan prelamin A, sino que se incrementa el porcentaje de daño severo al DNA, como se observa en el gráfico de la figura 26. Estos resultados son consistentes con las alteraciones de la organización de la cromatina observadas previamente en las hMSC que acumulan prelamin A (Ruiz de Eguino *et al.*, 2012), lo que podría dar lugar a la exposición inadecuada de regiones del DNA más sensibles al daño o también a una exposición mayor de regiones susceptibles a dañarse.

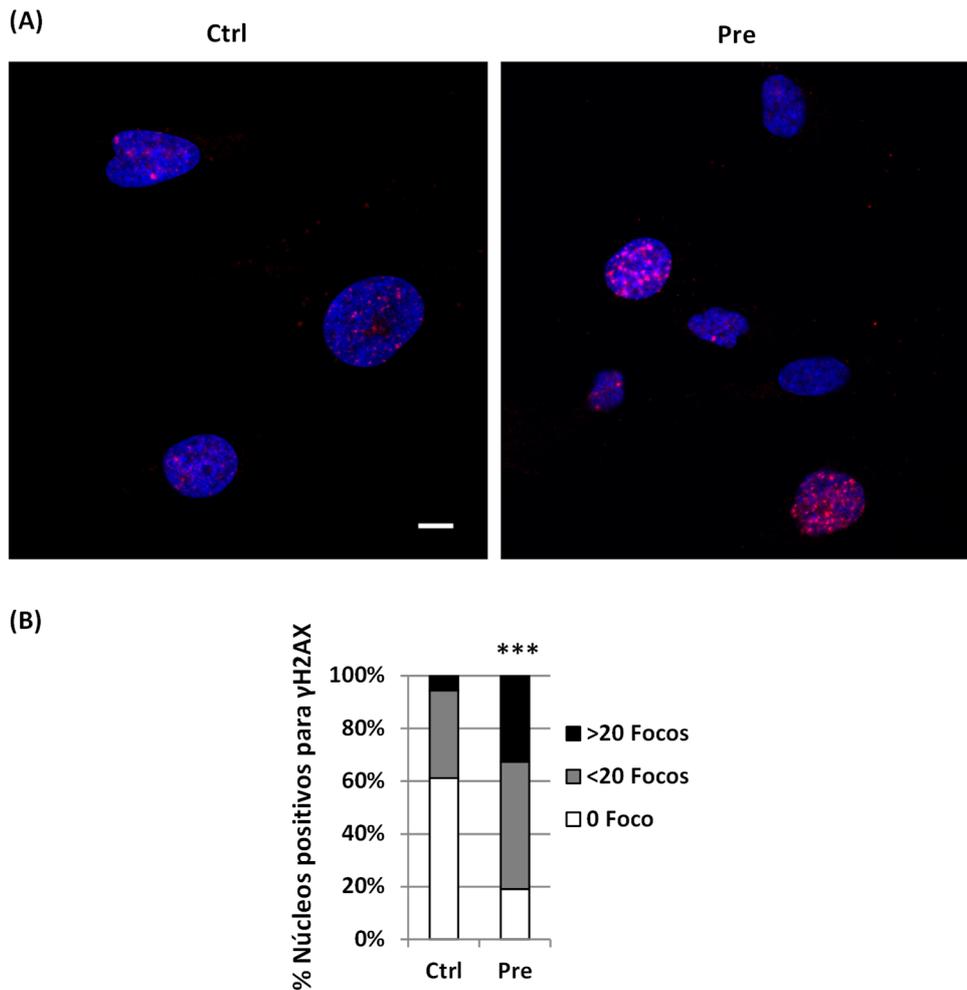


Figura 26. Las hMSC que acumulan prelamina A muestran una mayor respuesta al daño al DNA que las células control. A) Imagen representativa de Inmunofluorescencia. Azul: DAPI, Rojo: γ -H2AX. Barra de escala: 10 μ m. B). Cuantificación de los focos de γ -H2AX en al menos 100 núcleos por cada condición. El ensayo se realizó en hMSC derivadas de cuatro donantes de médula ósea independientes. Se utilizó el test χ^2 para obtener la significación estadística. * $p < 0.05$. Ctrl: hMSC control. Pre: hMSC que acumulan prelamina A.

Considerando que la inestabilidad genómica también puede ser causada por defectos en la lámina nuclear (Dechat *et al*, 2008; González-Suarez *et al*, 2009; Liu *et al*, 2005) y teniendo en cuenta los hallazgos previos, a continuación, evaluamos la arquitectura nuclear en nuestro modelo de hMSC que acumulan prelamina A.

6.2.2.2. Alteración de la arquitectura nuclear en las células que acumulan prelamina A.

Las hMSC que acumulan prelamina A muestran una tinción irregular del DNA nuclear con agregados, y interrupciones o burbujas que se invaginan al núcleo, perdiendo el patrón regular y redondeado que tienen los núcleos de las células control, como se observa en la figura 27. Así mismo, presentan un mayor número de cortes en la reconstrucción tridimensional de la imagen (Z), lo que indicaría un volumen mayor del núcleo.

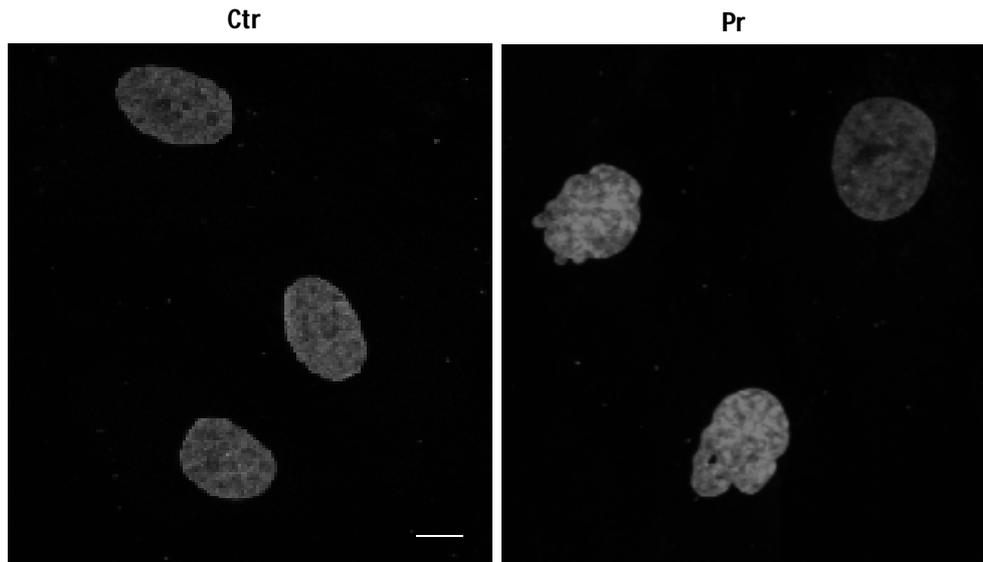


Figura 27. Efecto de la acumulación de prelamin A en la deformación de la arquitectura nuclear. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia donde se observan los núcleos celulares teñidos con DAPI en hMSC control y que acumulan prelamin A. hMSC derivadas de seis donantes diferentes de médula ósea. Barra de escala: 20 μ m

6.2.3. Senescencia celular

La senescencia celular es un estado de detención estable del ciclo celular y pérdida de la capacidad de replicación que resulta principalmente del daño al DNA, el estrés oxidativo y el acortamiento de los telómeros (van Deursen, 2014). A continuación, evaluaremos la proliferación celular.

6.2.3.1. Disminución de la proliferación celular

Examinamos la capacidad de proliferación de las hMSC que acumulan prelamin A estudiando su nivel de duplicación celular (PDL), que es la forma de evaluar con mayor precisión la supresión del crecimiento celular (Greenwood *et al*, 2004). El nivel de duplicación de las hMSC control se mantuvo estable hasta el pase 6, cuando comenzó a disminuir, aunque manteniendo cierto grado de proliferación (Figura 28). Por el contrario, la tasa de proliferación de las hMSC que acumulan prelamin A mostró una disminución significativa desde el inicio, alcanzando una división celular detenida (PDL menor a 1) en el pase 7.

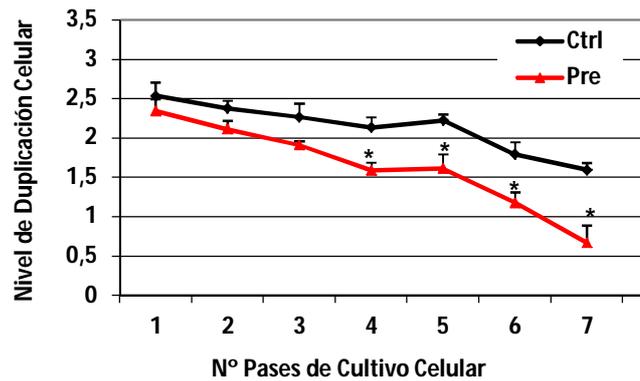


Figura 28. Niveles de duplicación de la población de las hMSC que acumulan prelamina A y sus respectivos controles. Las hMSC se cultivaron durante 7 pases. Los experimentos se realizaron por duplicado, a partir de hMSC derivadas de cuatro donantes diferentes de médula ósea. Se muestran los valores medios del nivel de duplicación celular \pm SEM en los pases indicados. * $p < 0.05$.

La disminución de la proliferación celular observada como consecuencia de la acumulación de prelamina A sugiere dos posibilidades, o bien que las células detengan su crecimiento porque entren en apoptosis y mueran, o bien porque las mismas se vuelvan senescentes. Para evaluar la primera posibilidad, realizamos una tinción tanto de las hMSC que acumulan prelamina A como de sus controles, con Anexina V-Ioduro de Propidio (PI). Mediante citometría de flujo se observó que menos del 9% de las células totales se encontraba en la fase temprana del proceso de apoptosis (siendo positivas para la tinción con Anexina V y negativas para el PI), sin observarse diferencias significativas entre las hMSC control y las que acumulan prelamina A (Figura 29).

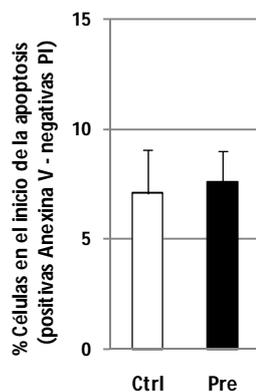


Figura 29. Las hMSC que acumulan prelamina A no muestran mayor apoptosis que las células control. La apoptosis se evaluó mediante tinción con Anexina V-PI. Los resultados muestran la media \pm SD. Los experimentos se realizaron por duplicado, a partir de hMSC derivadas de cuatro donantes diferentes de médula ósea.

Este experimento demuestra que la acumulación de prelamina A no induce apoptosis en las hMSC sugiriendo que la disminución de proliferación es debida a otro proceso biológico alternativo que puede estar asociado a la inestabilidad genómica que presentan estas células. Una posibilidad sería que las hMSC que acumulan prelamina A entraran en senescencia prematuramente a diferencia de las hMSC control. Posibilidad que analizaremos a continuación.

6.2.3.2. Aumento de senescencia en células que acumulan prelamin A

La senescencia celular se ha definido como la detención estable del ciclo celular asociado a cambios fenotípicos característicos (Hayflick y Moorhead, 1961; Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007; Collado *et al.*, 2007; Kuilman *et al.*, 2010). Durante la senescencia tienen lugar cambios morfológicos, como el incremento del tamaño celular y la adquisición de una conformación aplanada, asociados a cambios bioquímicos, como el aumento de la actividad peri nuclear de la enzima asociada a senescencia SA- β -galactosidasa (Dimri *et al.*, 1995; Narita *et al.*, 2003). Con objeto de estudiar este proceso se tiñeron las hMSC en el pase 7 de tratamiento con la solución SA- β -gal observándose una mayor proporción de células senescentes en las células que acumulan prelamin A (38.1 %), frente a las células control (16.6 %) (Figura 30).

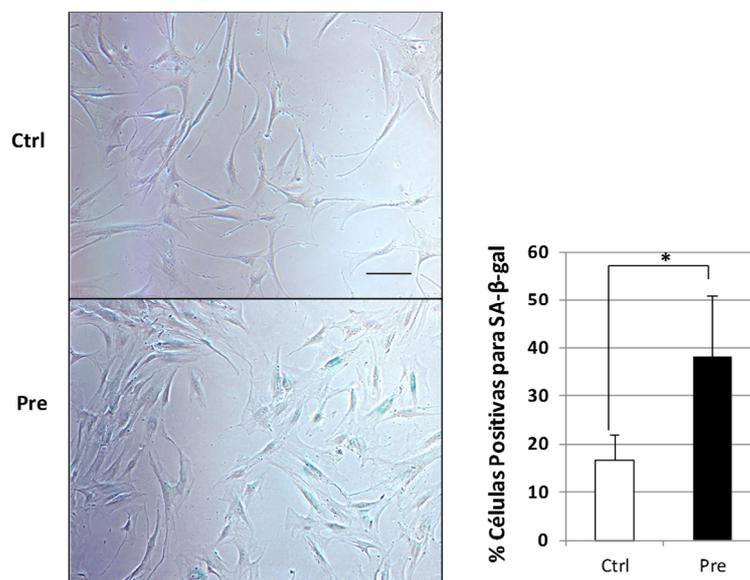


Figura 30. Incremento de la senescencia celular en hMSC que acumulan prelamin A. La actividad de la SA- β -galactosidasa se evaluó mediante tinción azul con la solución SA- β -gal. A) Imagen representativa. Las células teñidas con azul (células senescentes) se contaron en un mínimo de diez campos aleatorios (600 células totales) con un aumento de 20 x y se expresaron como porcentaje de células totales (B). Datos obtenidos del análisis por duplicado a partir de hMSC derivadas de cuatro donantes diferentes de médula ósea. Los resultados muestran la media \pm SD. Escala Barra: 500 μ m. * p <0,05.

En los experimentos realizados anteriormente, hemos observado que tras 7 pases de tratamiento se produce una disminución considerable en la proliferación celular asociada al aumento significativo en la senescencia celular, motivo por el cual se decidió caracterizar este modelo experimental en el pase 7 de cultivo.

Como hemos demostrado hasta aquí, la acumulación de prelamin A en las hMSC determina el acortamiento de la longitud de los telómeros, así como el incremento del porcentaje de telómeros críticamente cortos, que son esenciales para la supervivencia celular (Hemann *et al.*,

2001; Canela *et al.*, 2007). Hemos confirmado a su vez que la acumulación de prelamin A en las hMSC genera incremento del daño al DNA, alteraciones de la arquitectura nuclear, disminución de la proliferación celular e incremento en la senescencia. López-Otín *et al.* (2013) han propuesto que la senescencia celular actúa como una respuesta compensatoria al daño, que se convierte en deletérea y acelera el envejecimiento cuando los tejidos agotan su capacidad regenerativa. Por lo que a continuación evaluaremos la capacidad de respuesta de las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de estrés.

6.2.4. Susceptibilidad al estrés.

6.2.4.1. Incremento de la susceptibilidad al estrés en hMSC que acumulan prelamin A.

Para abordar si los fenotipos anteriormente explorados debidos a la acumulación de prelamin A en las hMSC podrían causar mayor susceptibilidad celular a condiciones de estrés, se analizó su supervivencia después de someter a las células a un ambiente en condiciones de hipoxia de forma súbita. Los ensayos de supervivencia celular en presencia de hipoxia durante 4 horas mostraron que aproximadamente el 50% de las células control sobrevivieron mientras que sólo el 20% de las hMSC que acumulan prelamin A lo hicieron (Figura 31), lo que confirma que estas últimas son menos resistentes a condiciones de estrés, probablemente por tener comprometidos sus mecanismos de respuesta y adaptación.

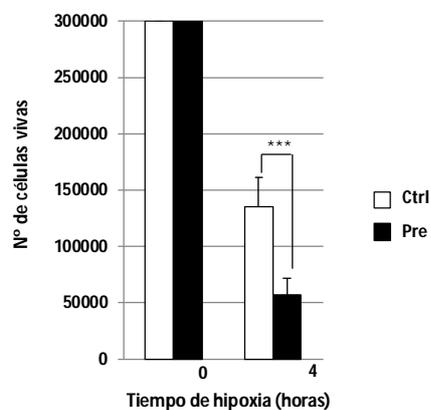


Figura 31. Ensayo de la supervivencia celular en condiciones de hipoxia. Datos procedentes del análisis por triplicado a partir de hMSC derivadas de tres donantes diferentes de médula ósea. Las barras muestran el promedio \pm SD. *** $p < 0,001$.

A tenor del resultado anterior planteamos reevaluar en nuestro modelo los marcadores de envejecimiento celular propuestos por López-Otín *et al.* (2013), en condiciones de estrés. Los diversos experimentos que expondremos a continuación implican una serie de dificultades técnicas (el gran número de células tratadas necesarias, la incompleta eliminación de trazas de aceite mineral que pueda interferir con los análisis subsecuentes) para realizar este ensayo de

inmersión del cultivo en aceite e inducir hipoxia. Por lo que el método para generar la condición de estrés celular que utilizaremos será la privación de suero, procedimiento ampliamente reconocido para este fin (Levin *et al.*, 2010). Para ello someteremos las hMSC que acumulan prelamin A y sus controles a un medio de cultivo con privación de suero durante las últimas 24 horas del experimento correspondiente, según el esquema de tratamiento que se muestra en la figura 32.

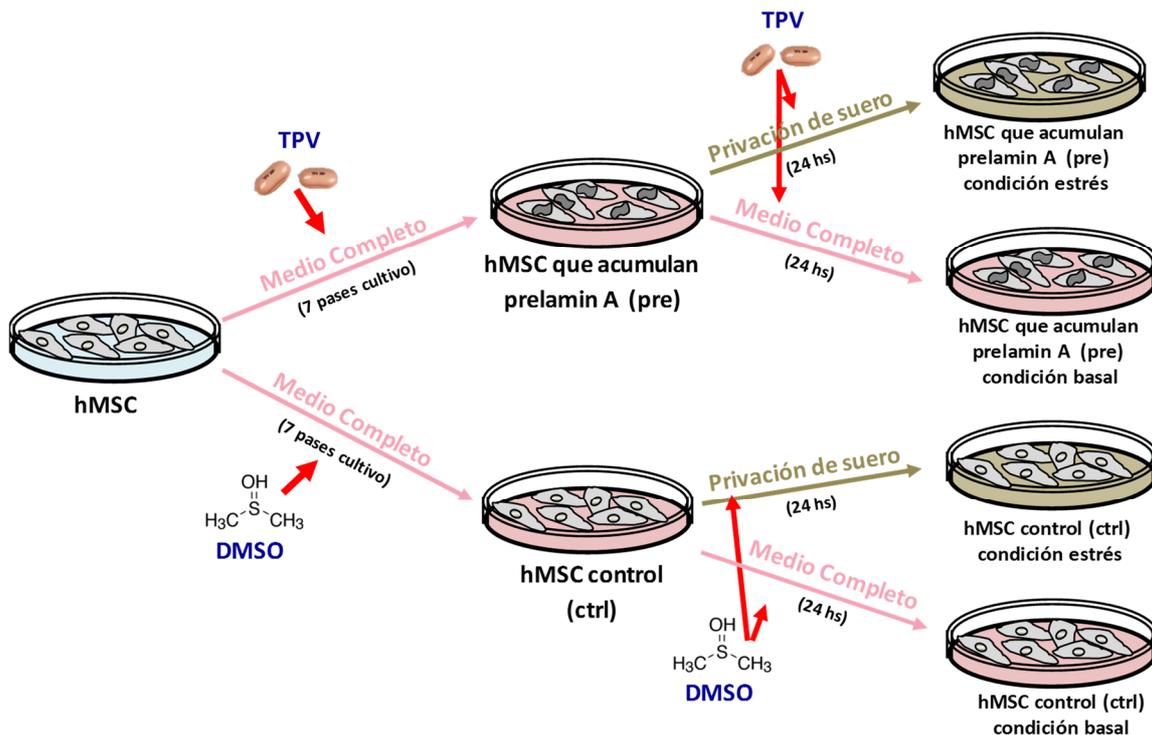


Figura 32. Esquema de las condiciones de tratamiento de las hMSC en el modelo experimental propuesto. Los pases de cultivo se realizan cada 5 días. El tratamiento se realiza con TPV a $30 \mu\text{M}$ y DMSO a la misma concentración en cada caso correspondiente.

El primer experimento que realizamos fue reevaluar la supervivencia de las hMSC que acumulan prelamin A estudiando su nivel de duplicación celular tanto en condiciones basales como en condiciones de privación de suero. Como se puede observar en la figura 33, la duplicación celular disminuye de forma significativa en condiciones de privación de suero tanto en los controles como en las hMSC que acumulan prelamin A. Destacamos, sin embargo, que la disminución de la proliferación es aún mayor en las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de privación de suero. Por lo que confirmamos que la privación de suero como método para inducir estrés celular afecta a las hMSC que acumulan prelamin A, y que estas son menos resistentes a las condiciones de estrés, tal como se planteo en el ensayo de supervivencia celular en condiciones de hipoxia.

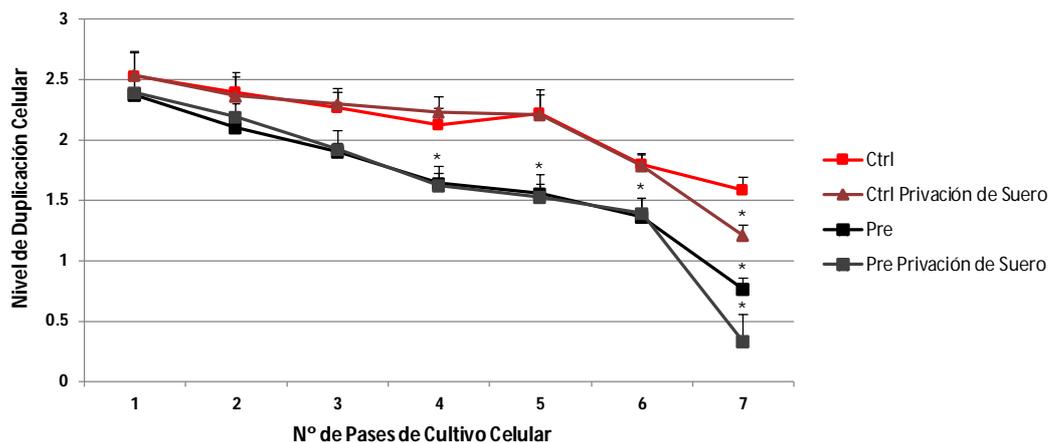


Figura 33. Niveles de duplicación de la población de las hMSC que acumulan prelamina A y sus respectivos controles en condiciones basales y en condiciones de estrés. Las hMSC se cultivaron durante 7 pases. La privación de suero se realizó durante las últimas 24 horas del cultivo en el pase 7. Los experimentos se realizaron por triplicado, a partir de hMSC derivadas de dos donantes diferentes de médula ósea. Se muestran los valores medios del nivel de duplicación celular \pm SEM en los pases indicados. * $p < 0.05$.

6.2.4.2. Inestabilidad genómica.

6.2.4.2.1. Aumento de la acumulación de prelamina A en condiciones de estrés.

A continuación, evaluamos si las condiciones de estrés afectaban la acumulación de prelamina A en las hMSC. Como observamos en la figura 34, cuando las hMSC se someten a condiciones de estrés la acumulación de prelamina A se incrementa de forma muy marcada.

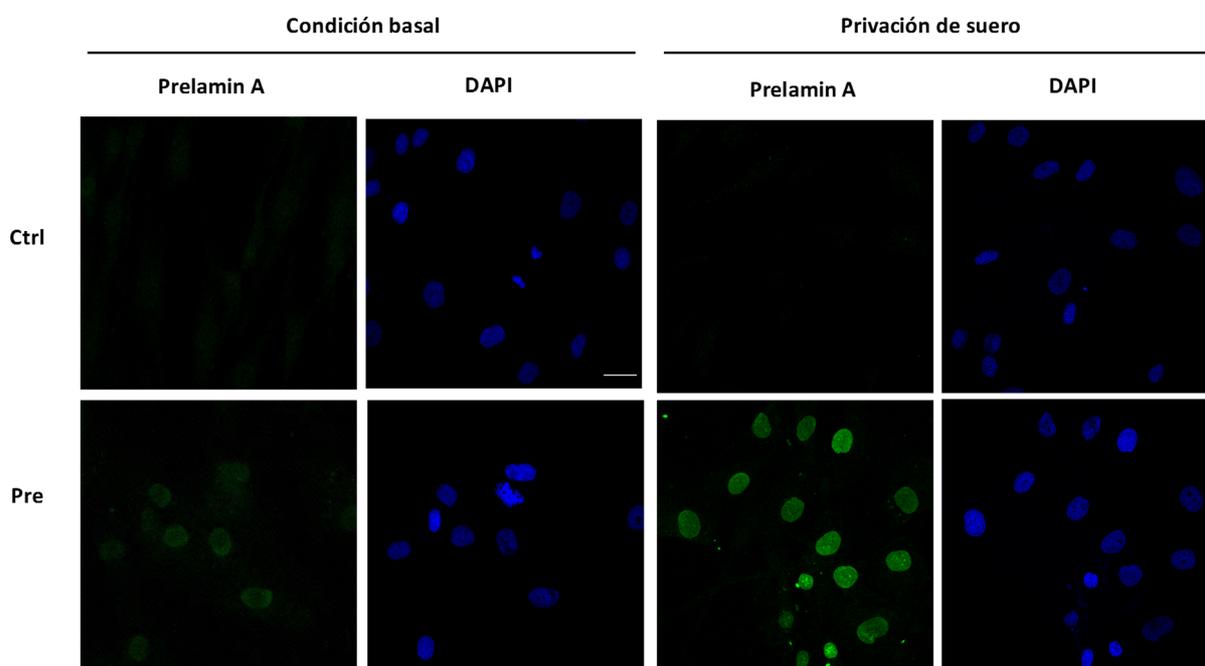


Figura 34. La privación de suero induce un incremento en la acumulación de prelamina A. Imagen representativa de tinción mediante inmunofluorescencia que muestra la expresión de prelamina A en hMSC en condiciones basales y en condiciones de estrés (privación de suero). Barra de escala: 50 μ m.

Cabe destacar que en la detección de prelamin A mediante tinción por inmunofluorescencia, pese a ser más sensible que la detección de esta proteína mediante *western blot* (Figura 35), es necesario utilizar los mismos parámetros de adquisición de imagen en todas las condiciones de tratamiento establecidas para poder compararlas. De este modo las imágenes se adquirieron con unos niveles intermedios de exposición para poder visualizar el aumento de la acumulación de prelamin A en condiciones de estrés y al mismo tiempo en condiciones basales sin obtener fluorescencias nulas o sobresaturadas.

En la figura 35 se observa el aumento de la acumulación de prelamin A en hMSC en condiciones de privación de suero mediante *western blot*, situación donde esta técnica es capaz de detectar la presencia de la proteína prelamin A.

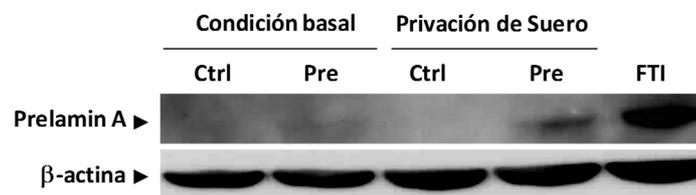


Figura 35. Western Blot que demuestra la acumulación de prelamin A en hMSC en condiciones de estrés. Imagen representativa de la detección de prelamin A en hMSC derivadas de dos donantes diferentes de médula ósea. FTI: Inhibidor de la Farnesil Transferasa (se utilizó como control positivo). La β -actina se utilizó como control de carga.

Por lo tanto, se confirma el incremento en la expresión de prelamin A en condiciones de estrés en las hMSC que previamente acumulaban prelamin A, tanto por *western blot* como por inmunofluorescencia. Debido a que la técnica de inmunofluorescencia presenta mayor sensibilidad, se utilizará en los ensayos posteriores para la evaluación de la expresión de la proteína prelamin A.

6.2.4.2.2. Aumento de la señalización del daño al DNA en las células que acumulan prelamin A en condiciones de estrés.

Las células envejecidas son hipersensibles a las condiciones de estrés debido a fallos en los mecanismos de respuesta a estrés (López-Otín *et al.*, 2013). Por lo tanto, nos preguntamos si las condiciones de estrés, como es la privación de suero en el medio de cultivo, podría alterar la respuesta de daño al DNA como consecuencia de la acumulación de prelamin A en las hMSC. Como se muestra en la figura 36, las hMSC que fueron sometidas a la privación de suero, mostraron un aumento significativo en el porcentaje de núcleos que presentaron focos de γ -H2AX en comparación con las mismas células en condiciones basales. Este porcentaje fue

significativamente mayor en las hMSC que acumulan prelamin A (>85%) en comparación con las células de control (40%) (Figura 36, inferior). Por otra parte, la combinación de la acumulación de prelamin A y las condiciones de estrés por la privación de suero en el medio de cultivo llevaron a un mayor aumento de la señalización γ -H2AX, en donde casi el 50% de las células mostraron más de 20 focos por núcleo.

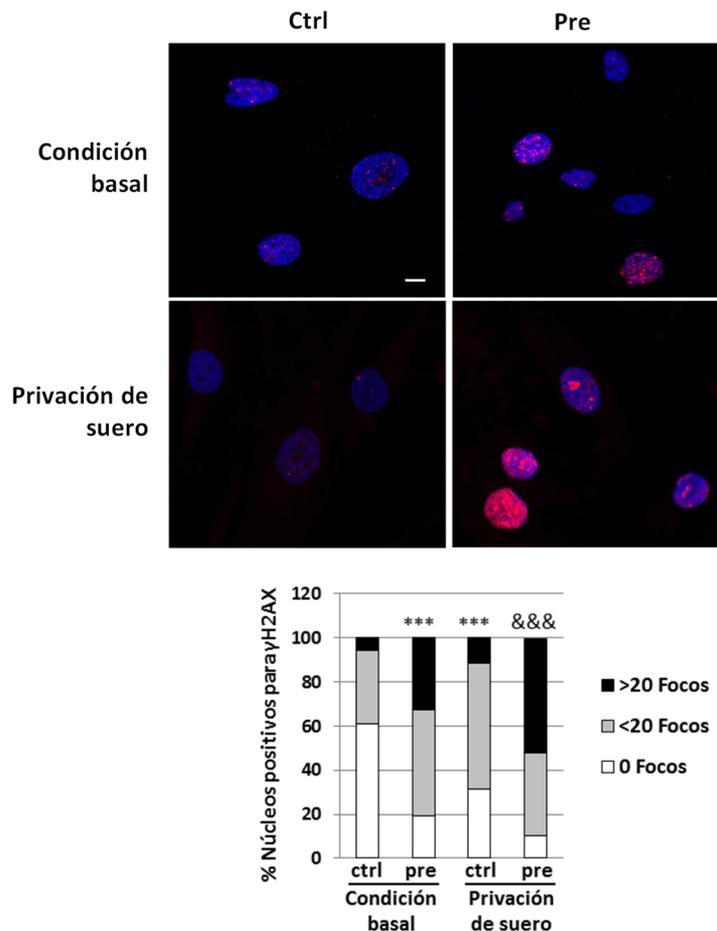


Figura 36. Las hMSC que acumulan prelamin A sometidas a estrés muestran la mayor respuesta al daño al DNA. Imagen representativa de Inmunofluorescencia (superior) y cuantificación de los focos de γ -H2AX (inferior). Azul: DAPI, Rojo: γ -H2AX. Barra escala: 10 μ m. Se analizaron al menos 100 núcleos por cada condición. Los datos se obtuvieron de hMSC derivadas de cuatro donantes diferentes de médula ósea. Se utilizó el test χ^2 para obtener la significación estadística. *** p <0,001 cuando se compararon con hMSC control. &&& p <0,001 cuando se compararon frente a hMSC control en condiciones de privación de suero.

6.2.4.3. Pérdida de la homeostasis proteica

La autofagia, proceso clave de la homeostasis celular, mediante el cual se degradan proteínas y orgánulos celulares dañados, se reduce o deteriora en las células envejecidas (Bergamini *et al.*, 2006; Cuervo *et al.*, 2008). Por ello, decidimos analizar el proceso de autofagia en las células que acumulan prelamin A en condiciones basales y de estrés. Para ello, en primer lugar, se evaluó la activación de mTORC1, uno de los principales reguladores negativos de la

autofagia (Noda *et al.*, 1998) a través del estado de fosforilación de uno de sus sustratos diana (Fingar *et al.*, 2002), la subunidad S6 de la proteína ribosómica (pS6). La privación de suero actúa como señal de estrés que activa el proceso de autofagia (Levine *et al.*, 2008) e inhibe a mTORC1 (Figura 37).

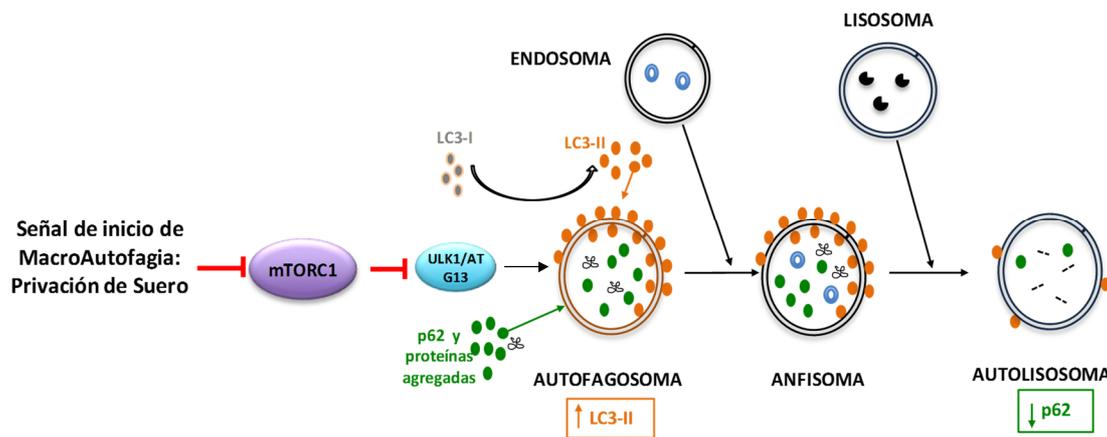


Figura 37. Esquema representativo del proceso de macro autofagia evaluado. Las distintas señales que activan la autofagia (proteínas mal plegadas, orgánulos celulares dañados, privación de suero, entre otros), estimulan la formación de autofagosomas. Para formar la doble membrana de estas vesículas se requiere la transformación de la proteína LC3-I a LC3-II, así como el reclutamiento de otras proteínas como p62. Por lo cual, el paso inicial de la macro autofagia involucra un aumento en los niveles de LC3-II. Posteriormente los autofagosomas se fusionan con los endosomas, formando el anfisoma, el cual a su vez deberá fusionarse con el lisosoma para formar la vesícula de degradación final de este proceso que es el auto lisosoma, donde los "desechos celulares" serán eliminados. Llegados a este paso final la cantidad de la proteína p62 debería disminuir puesto que sería degradada en una autofagia eficaz con un flujo normal del proceso.

En condiciones de privación de suero la proteína fosfo-S6 (pS6) mostró una menor expresión en las hMSC control en comparación con las células que se habían cultivado en condiciones basales como se observa en la figura 38. Cabe destacar que en condiciones de privación de suero y acumulación de prelamin A, la vía de mTORC1 se encontró aún más reprimida que en las células control sometidas a privación de suero (Figura 38), lo que sugeriría que la autofagia podría estar acrecentada en las hMSC que acumulan prelamin A en dichas condiciones de estrés. Para comprobar esta posibilidad se analizó el estado de prenilación de la proteína LC3. Durante el proceso normal de autofagia, la extensión C-terminal de la proteína citosólica LC3 se escinde para formar LC3-I, que finalmente se modifica en la forma conjugada con fosfatidiletanolamina, conocida como LC3-II, la cual finalmente es reclutada para formar las membranas de los autofagosomas (Kabeya *et al.*, 2000) (como podemos observar en el esquema de la Figura 37).

En las hMSC que acumulan prelamin A cultivadas en condiciones de privación de suero (Figura 38), se induce una transformación considerable de LC3-I a LC3-II. El incremento de la proteína en la forma de LC3-II podría deberse tanto a un incremento del flujo de la autofagia

como a un bloqueo en la maduración del autofagosoma. Con el fin de determinar cual es el mecanismo determinante en este caso, cuantificamos la proteína p62 que se utiliza como marcador del flujo de autofagia, puesto que se une a las proteínas poli-ubiquitinizadas y que se degrada durante el proceso de autofagia. Como era de esperar, la expresión de la proteína p62 disminuyó en las hMSC control en condiciones de privación de suero. Sin embargo, en las hMSC que acumulan prelamina A en condiciones de privación de suero, se detectó un aumento en los niveles de p62, lo que indica que el flujo de la autofagia se encuentra inhibido o retardado en estas células.

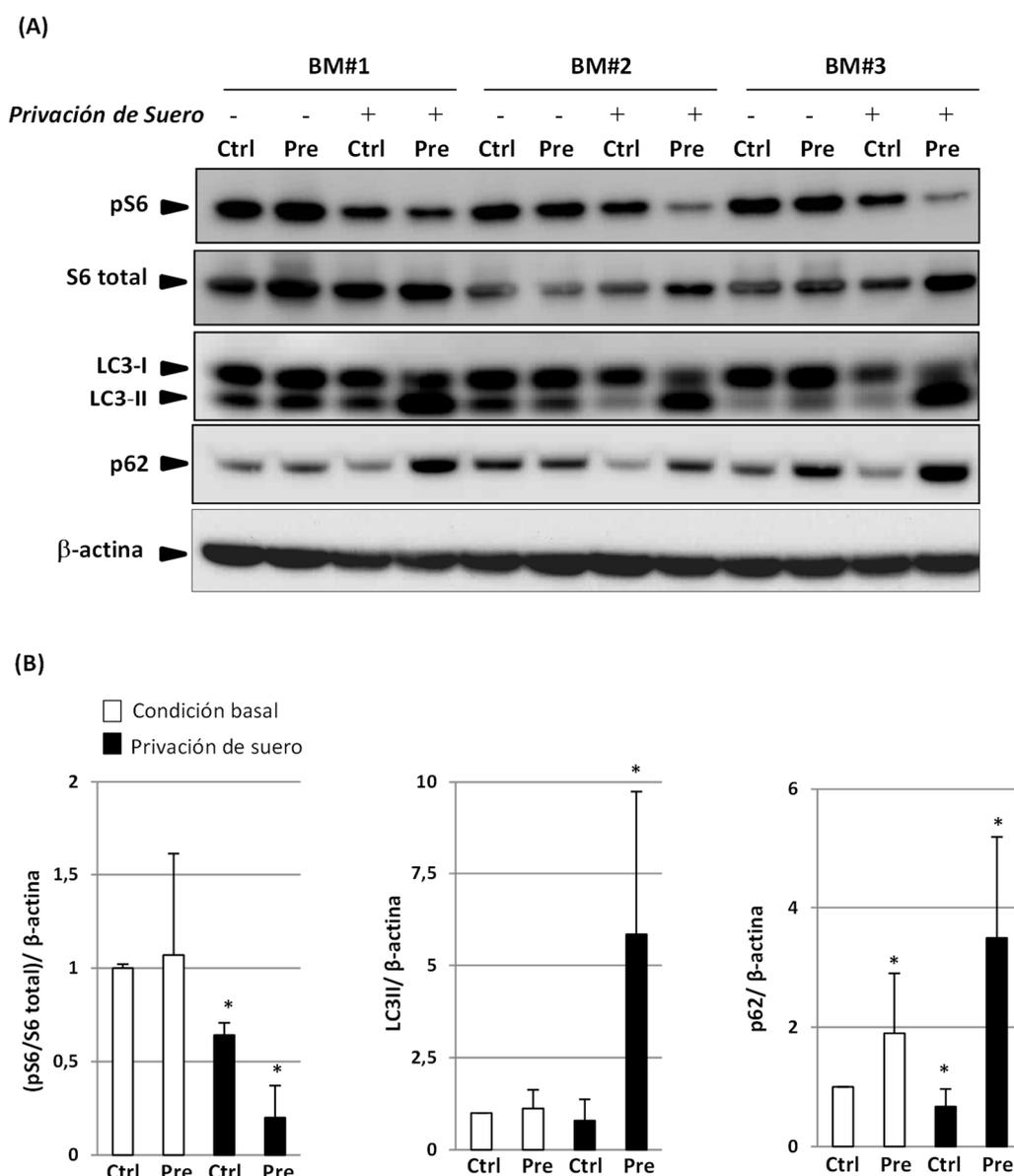


Figura 38. Alteración de la Autofagia en hMSC que acumulan prelamina A en condiciones de estrés. A) *Western blot* de las proteínas indicadas en hMSC control y que acumulan prelamina A cultivadas en condiciones basales (medio completo) o estrés (de privación de suero). La β-actina se utilizó como control de carga. B) Análisis por densitometría de cada proteína. Datos procedentes del análisis por triplicados a partir de hMSC derivadas de tres donantes diferentes de médula ósea (BM). Las barras representan el promedio de cada proteína analizada ± SD. * p < 0,01.

Para confirmar esta observación se trataron las hMSC con Bafilomicina A1 (Baf-A1), un inhibidor de la bomba de protones de los lisosomas que causa acumulación de autofagosomas, lo que induce un aumento en los niveles de LC3-II cuando se compara con células no tratadas. Como se esperaba, no se detectó ninguna diferencia entre las hMSC control y las que acumulan prelamina A después del tratamiento con Baf-A1 en condiciones basales. Sin embargo, en condiciones de privación de suero las hMSC que acumulan prelamina A tratadas con Baf-A1 no pudieron acumular LC3-II contrariamente a lo que ocurrió en las células control (Figura 39), lo que confirma que el flujo de la autofagia se encontraba inhibido o retardado en estas células. De hecho, se produjo un aumento ligero pero significativo en la expresión de p62 en las hMSC que acumulan prelamina A cultivadas en medio completo (Figura 38), lo que sugiere que prelamina A podría inducir la expresión de esta proteína por si misma.

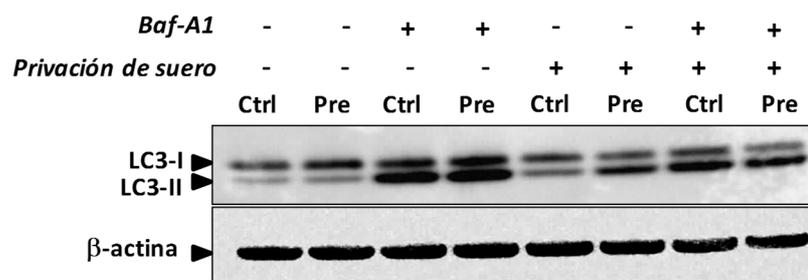


Figura 39. Determinación del flujo del proceso de autofagia en las hMSC tratadas con Bafilomicina (Baf-A1). *Western blot* del tratamiento con Baf-A1 0,1 μ M durante 9 horas. Se muestran los niveles de expresión de las proteínas LC3-I y LC3-II. La β -actina se utilizó como control de carga. Se realizó el ensayo en hMSC derivadas de dos donantes diferentes de médula ósea.

Por último, se confirmó la reducción de la autofagia desde una perspectiva general de envejecimiento en hMSC en senescencia replicativa. Para ello, hemos comparado hMSC cultivadas en un número de pases menor a 5 (pases bajos) con hMSC cultivadas en un número de pases mayor a 15 (pases altos) que se consideraron como células envejecidas, tanto en condiciones de privación de suero como de cultivo en condiciones basales. Se detectó una disminución en los niveles de LC3-II en las células con pases altos cultivadas en condiciones de privación de suero (Figura 40). Estos resultados confirman que la autofagia se encuentra alterada en hMSC senescentes.

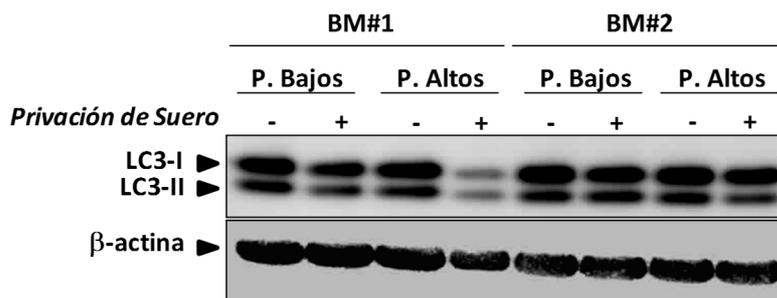


Figura 40. Determinación de la expresión de las proteínas LC3-I y LC3-II en las hMSC en senescencia replicativa, cultivadas en condiciones de medio completo o de privación de suero. P. Bajos: hMSC pase <5; P. Altos: hMSC pase >15. Se muestran los niveles de expresión obtenidos de hMSC derivadas de dos donantes diferentes de médula ósea (BM). La β-actina se utilizó como control de carga.

6.2.4.4. Disfunción mitocondrial

El estrés oxidativo mediado por la producción sostenida de moléculas oxidantes se asocia con el envejecimiento y enfermedades relacionadas (Hekimi *et al.*, 2011), por lo que nos preguntamos si la acumulación de prelamin A podría aumentar los niveles de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en hMSC. Como se observa en la figura 41, pese a que no hubo diferencias en los niveles de ROS entre las hMSC control y las que acumulan prelamin A en condiciones basales, si se detectó un aumento significativo de ROS en las hMSC que acumulan prelamin A cultivadas en condiciones de estrés.

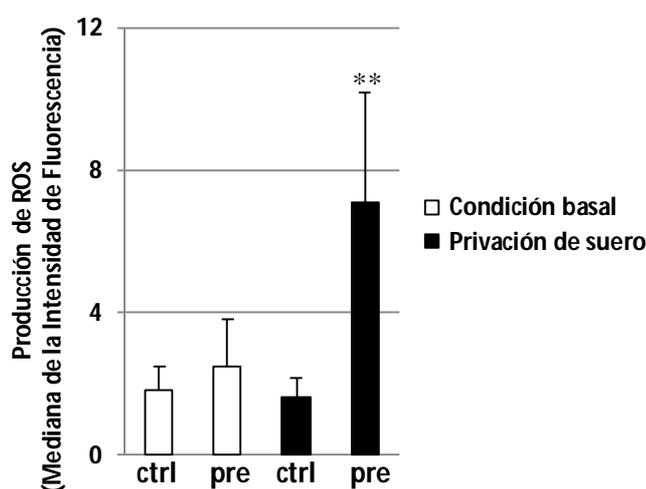


Figura 41. Aumento de la producción de ROS en hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de estrés. La producción de ROS se analizó mediante citometría de flujo midiendo el estado de oxidación de la molécula derivada permeante, mediana de la intensidad de fluorescencia de la oxidación molecular de CM-H₂DCFDA. Datos procedentes del análisis por triplicado a partir de hMSC derivadas de tres donantes diferentes de médula ósea. Las barras muestran el promedio ± SD. ** p <0,01.

6.2.4.5 Aumento de senescencia celular en condiciones de estrés

A raíz de los resultados anteriormente mostrados y debidos a que las hMSC que acumulan prelamin A sometidas a condiciones de estrés (como la privación de suero en este caso), muestran un agravamiento de su fenotipo, revaloramos la senescencia en estas condiciones.

6.2.4.5.1. Cambios morfológicos asociados a senescencia

Como se ha introducido anteriormente la senescencia conlleva cambios en la morfología celular, determinando alteraciones en su tamaño y forma. Mediante microscopía y tinción de inmunofluorescencia se estudió la distribución de la proteína β -tubulina en el citoesqueleto. En las hMSC que acumulan prelamin A como se muestra en la figura 42, los cambios morfológicos asociados con senescencia, como son el incremento de tamaño celular, con una forma irregular y plana, así como la aparición de fibras de estrés, se vieron agravados en condiciones de privación de suero.

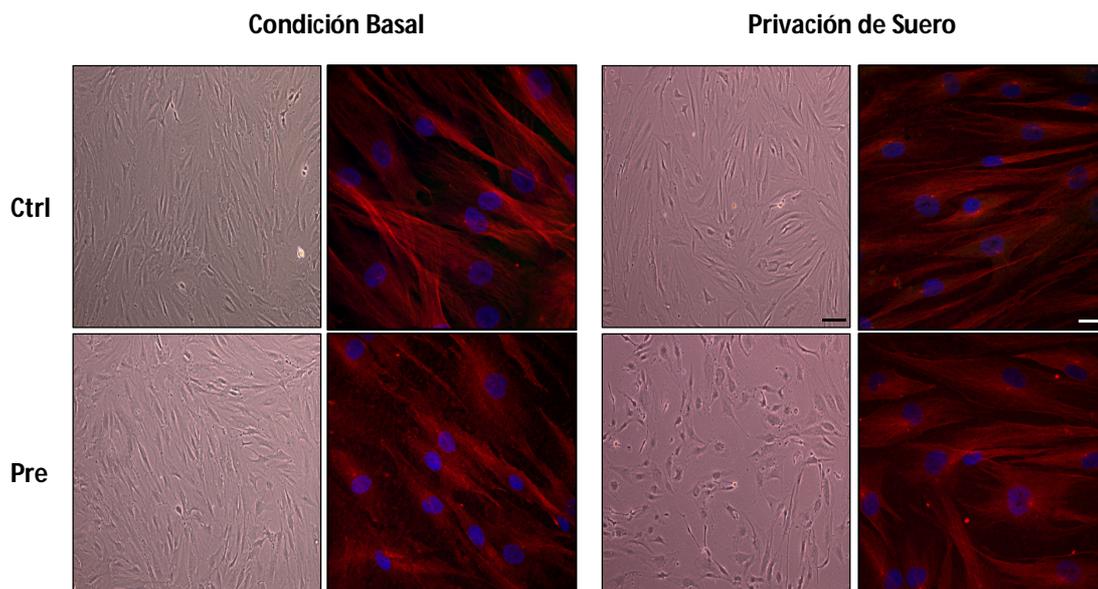


Figura 42. Alteraciones morfológicas asociadas a senescencia en hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de estrés. Se muestran imágenes representativas de campo luminoso (barra de escala: 100 μ m) e imágenes de inmunofluorescencia confocal (barra de escala: 20 μ m). Rojo: β -tubulina, azul: DAPI. Ctrl: control hMSC, Pre: hMSC que acumulan prelamin A.

6.2.4.5.2. Incremento de la senescencia en hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de estrés.

Para evaluar que repercusión desencadena el estrés celular en el proceso de senescencia en nuestro modelo, se tiñeron con solución SA- β -gal las hMSC control y las que acumulan prelamin A, tanto en condiciones basales como en condiciones de privación de suero. Como se

observa en el gráfico de la figura 43, en condiciones de privación de suero hubo un aumento significativo de la actividad peri-nuclear de la enzima SA- β -galactosidasa (Dimri *et al.*, 1995; Narita *et al.*, 2003), con una mayor proporción de células senescentes en las hMSC que acumulan prelamina A (52.91 %) frente a las células control (28.54 %).

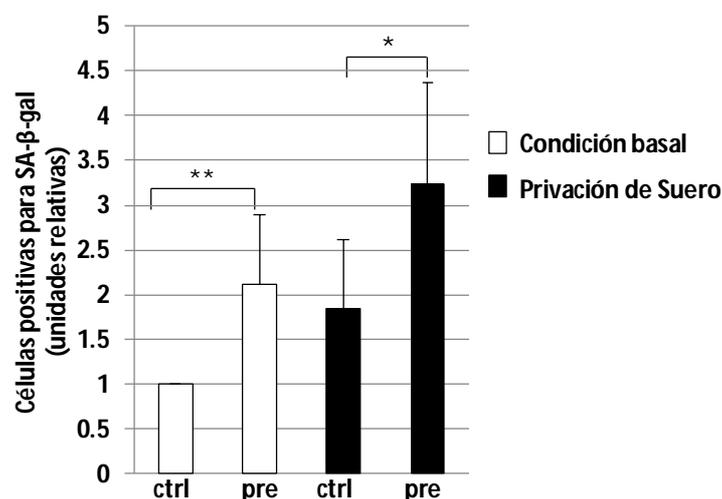


Figura 43. Incremento de la Senescencia en hMSC que acumulan prelamina A en condiciones de estrés. Análisis de la actividad de la enzima SA- β -galactosidasa en hMSC que acumulan prelamina A en condiciones basales y de estrés. Las células senescentes (positivas para SA- β -galactosidasa) se han contado de forma aleatoria, en al menos 600 núcleos en cada muestra. Los ensayos se han realizado por triplicado en hMSC derivadas de cuatro donantes diferentes de medula ósea. Ctrl: control hMSC. Pre: hMSC que acumulan prelamina A. Las barras muestran el promedio \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Como hemos observado hasta el momento en las hMSC que acumulan prelamina A se producen alteraciones en los marcadores primarios del envejecimiento propuestos por López-Otín *et al.*, (2013), recapitulando la inestabilidad genómica, el acortamiento de los telómeros, las alteraciones epigenéticas (Ruiz de Eguino *et al.*, 2012) y la pérdida de la homeostasis proteica. Estos serían los responsables directos del daño celular que ocurre durante el proceso de envejecimiento y nos indican un compromiso en la capacidad de respuesta de la célula. Al someter a condiciones de estrés las hMSC que acumulan prelamina A para evaluar si esta respuesta se encuentra comprometida, observamos no solo la exacerbación de los fenotipos de los marcadores primarios, sino que se produce una mayor senescencia y un incremento en la producción de ROS, ambos marcadores antagónicos del envejecimiento (López-Otín *et al.*, 2013), los cuales se encargan de responder al daño que ha sufrido la célula. Todo esto nos sugiere que los marcadores de integración, que son la comunicación intercelular y el agotamiento de las reservas de células madre, responsables finales del fenotipo de envejecimiento celular (López-Otín *et al.*, 2013), probablemente se encuentren afectados.

6.2.5 Estudio de la funcionalidad *in vivo*

6.2.5.1. Las hMSC que acumulan prelamina A muestran una actividad funcional disminuida *in vivo*

En virtud de que las hMSC que acumulan prelamina A recapitulan los fenotipos de envejecimiento, se estudió la relevancia de estos cambios examinando su competencia funcional *in vivo*. Con éste propósito utilizamos un modelo establecido (Kinnaird *et al.*, 2004) basado en la capacidad de las hMSC para mejorar significativamente la circulación vascular después de su trasplante en las extremidades posteriores isquémicas de ratones inmunocomprometidos. El uso de ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) permite evitar la respuesta inmunitaria frente a las células humanas (o provenientes de otras especies) trasplantadas. Para ello, se indujo una isquemia ligando la arteria femoral y sus ramas colaterales en el miembro posterior izquierdo de los ratones. Inmediatamente después de la ligadura se trasplantaron las hMSC control (Ctrl) o las hMSC que acumulan prelamina A (Pre) mediante inyecciones intramusculares en el miembro posterior izquierdo. Como control de la técnica, se inyectó un subgrupo de ratones con medio de cultivo sin células (vehículo).

A los 14 días del trasplante, se evaluó la tasa de perfusión (funcionalidad tisular) de las extremidades posteriores isquémicas y sus controles contralaterales, mediante Tomografía de Emisión de Positrones (PET). La tomografía por emisión de positrones es una técnica de imagen funcional, que proporciona información sobre el funcionamiento y metabolismo celular, complementaria a las técnicas morfológicas como la Tomografía Computada. En nuestro caso utilizamos como trazador la molécula de amonio marcado con nitrógeno-13 (NH₄[¹³N]), que nos permitió cuantificar el flujo sanguíneo de los miembros posteriores en los ratones y el consumo de los trazadores en los volúmenes de interés (VOI) delimitados previamente (ver sección 3 de Material y Métodos). Se genera así una medida precisa de la perfusión tisular y, por lo tanto, de la viabilidad tisular de las regiones estudiadas, las cuales se expresaron como razón de velocidad de perfusión media. La mayor velocidad de perfusión nos indica un menor compromiso de la zona afectada.

El grupo de ratones inyectados con el vehículo (n = 5) presentó una razón de velocidad de perfusión media de 0,5566, valores similares a los presentados por el conjunto de ratones (n = 7) a los que se inyectaron las hMSC que acumulan prelamina A con una razón de velocidad media de perfusión de 0,5534 (Figura 44). Sin embargo, los animales tratados con las hMSC control (n = 7) tuvieron una tasa media de perfusión significativamente mayor (0.8580) en comparación tanto con el grupo vehículo como con el grupo hMSC que acumulan prelamina A.

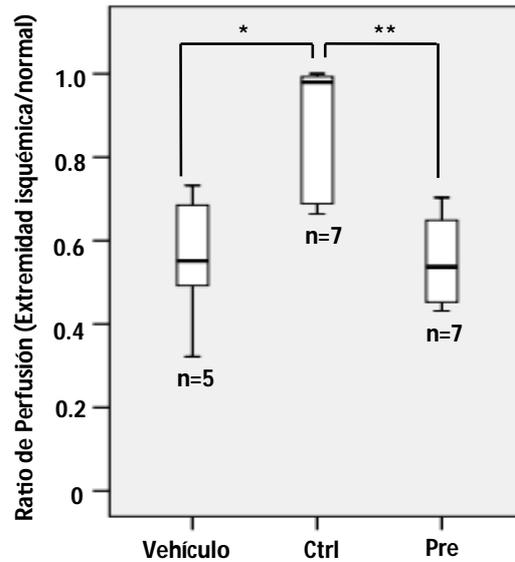


Figura 44. Alteración de la funcionalidad de las hMSC que acumulan prelamin A *in vivo*. Tasa de perfusión en ratones a los 14 días del trasplante de hMSC, evaluada mediante PET. Las cajas y barras muestran el promedio \pm SD de la tasa de perfusión. Pre: hMSC que acumulan prelamin A. Ctrl: hMSC control. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Se monitorizó además de forma evolutiva el flujo sanguíneo de las extremidades posteriores con un sistema láser doppler en las siguientes situaciones: inmediatamente posterior a la isquemia, y en los días 7, 14 y 21 posteriores al trasplante. En todos los casos se comparó el flujo sanguíneo en la extremidad posterior isquémica frente al flujo sanguíneo en la contralateral sana. El doppler láser reveló una restauración del flujo sanguíneo significativa a los 14 días posteriores a la isquemia en las extremidades inyectadas con hMSC control y un aumento aún mayor a los 21 días (Figura 45), lo que nos muestra claramente el potencial regenerativo que tienen las hMSC control. Sin embargo, la acumulación de prelamin A interfiere con la capacidad homeostática de las hMSC *in vivo*, por su incapacidad de restaurar el flujo sanguíneo de la extremidad posterior isquémica.

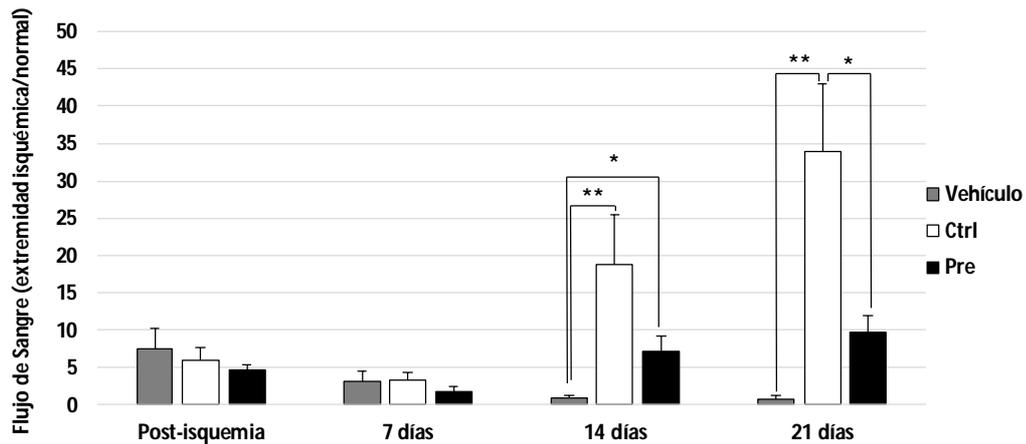


Figura 45. La acumulación de prelamin A interfiere con la funcionalidad de las hMSC *in vivo*. Cuantificación con láser doppler del flujo sanguíneo de la extremidad posterior después del trasplante de las hMSC (Post-isquemia = flujo sanguíneo medido inmediatamente después de realización de la isquemia). ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Las barras corresponden al promedio \pm SEM. Pre: hMSC que acumulan prelamin A. Ctrl: hMSC control.

Consistentemente con estos resultados, el 100% de los ratones inyectados con el vehículo (medio de cultivo sin células) y el 60% de los animales trasplantados con las hMSC que acumulan prelamin A perdieron su miembro posterior izquierdo (isquémico). Sin embargo, únicamente el 28% de los ratones inyectados con las hMSC control sufrieron la amputación de la extremidad posterior como consecuencia de la isquemia inducida (Figura 46).

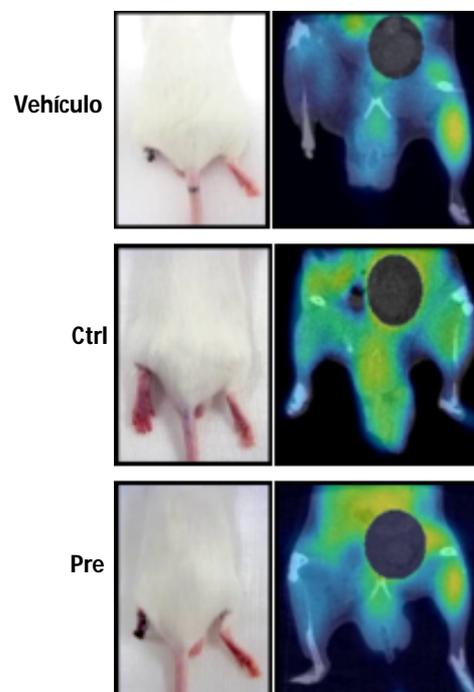


Figura 46. Actividad disfuncional de las hMSC que acumulan prelamin A *in vivo*. Se muestran imágenes representativas de fotografías (izquierda) y de tomografías por emisión de positrones (derecha), de las extremidades posteriores de los animales en cada condición, 14 días después de la inducción de la isquemia y el trasplante de hMSC. El círculo oscuro corresponde a la vejiga de los ratones que se quita de la imagen para no interferir en el análisis de la señal del PET. Pre: hMSC que acumulan prelamin A. Ctrl: hMSC control.

6.2.6. Análisis del perfil génico.

El hecho de que en condiciones de estrés se acumule mayor cantidad de prelamin A, así como la observación de los fenotipos que se exacerban o agravan en estas mismas condiciones, sugirieron que pudiera existir una alteración en el perfil de expresión génica de las hMSC sometida a estrés. Para evaluar este supuesto, se realizó un análisis de expresión génica de todo el genoma basado en *microarrays* de las hMSC que acumulan prelamin A comparándolos con el de sus controles, cultivadas en condiciones de privación de suero.

6.2.6.1. Alteración del perfil de transcripción génico.

Se encontraron cambios significativos, que definimos como aquellos que tenían un $fold \pm 1,4$ ($p < 0,05$), en 1.284 transcritos en las hMSC que acumulan prelamin A frente a los controles en condiciones de estrés (Figura 47), siendo aproximadamente el 50% de los cambios de regulación positiva y el otro 50% de regulación negativa. En un estudio previo llevado a cabo en nuestro laboratorio donde se analizó el perfil de expresión génica de las hMSC no sometidas a estrés, el número de transcritos con regulación alterada como consecuencia de la acumulación de prelamin A en hMSC frente a las células control fue de 111 (Ruiz de Eguino *et al.*, 2012). Lo que demuestra que la privación de suero altera significativamente el perfil de expresión génica en las hMSC que acumulan prelamin A, como se observa esquemáticamente en el gráfico de la figura 47, hecho que está en concordancia con la mayor severidad de los fenotipos observada en condiciones de estrés.

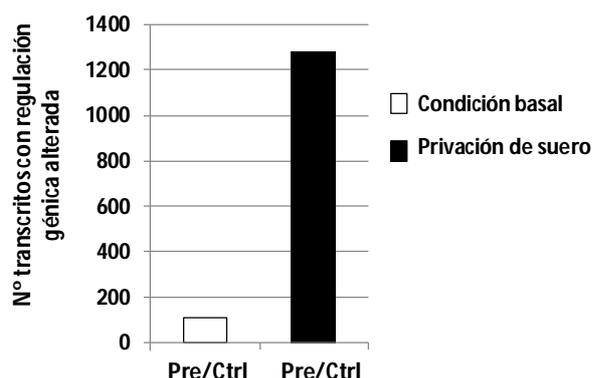


Figura 47. Las condiciones de privación de suero inducen cambios profundos en el perfil de transcripción génica de las hMSC que acumulan prelamin A. Análisis de la expresión génica basado en *microarrays*. Tanto en las condiciones basales como de privación de suero se caracterizaron dos muestras biológicas y una replica técnica por condición, por lo que se realizaron finalmente tres hibridaciones independientes por condición de tratamiento. Pre: hMSC que acumulan prelamin A. Ctrl: hMSC control.

6.2.6.2. Clasificación funcional de los genes desregulados en hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de estrés.

Para abordar la relevancia funcional de estos genes expresados diferencialmente, se procedió a asignarles una categoría ontológica utilizando para ello la herramienta bioinformática de anotación ontológica *Gene Ontology* (GO) dentro de la aplicación DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) (Huang *et al.*, 2009). Entre las categorías más sobrerrepresentadas en la lista de transcritos regulados positivamente se encontraron los genes relacionados con la proliferación celular, los lisosomas, el envejecimiento, la respuesta al estrés oxidativo y las mitocondrias. Mientras que entre los transcritos regulados negativamente las categorías enriquecidas más significativas se relacionaron con el citoesqueleto, la adhesión celular y los procesos de oxidación-reducción (Tabla 6). Estos resultados mostraron que las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de privación de suero exhiben una expresión génica característica de hMSC senescentes, ya que presentan cambios en el citoesqueleto, la adhesión celular y el estrés oxidativo (Kasper *et al.*, 2009). Más aún, y consolidando este análisis se observaron cambios en la expresión de los genes relacionados con las categorías de envejecimiento y lisosomas. Estos datos son consecuentes con los resultados obtenidos *in vitro*, donde comprobamos que las células que acumulan prelamin A en condiciones de estrés presentan fenotipos específicos del envejecimiento, incluida la alteración del proceso de autofagia.

Tabla 6. Categorías de Procesos Biológicos enriquecidos significativamente como consecuencia de la acumulación de prelamin A en condiciones de estrés.

	ACCESO GO	TÉRMINO GO	Puntuación EASE	Valor p
Transcriptos Regulados Positivamente	GO: 0042127	Regulación de la Proliferación Celular	2.99E-11	0.0004
	GO: 0005764	Lisosoma	0.013	0.013
	GO: 0007568	Envejecimiento	0.03	0.03
	GO: 0005739	Mitocondrias	0.034	0.034
	GO: 0006979	Respuesta al Estrés oxidativo	0.035	0.035
	GO: 0016209	Actividad Antioxidante	0.036	0.036
Transcriptos Regulados Negativamente	GO: 0005856	Citoesqueleto	9.03E-08	0.000004
	GO: 0007155	Adhesión Celular	1.29E-12	0.0001
	GO: 0030198	Organización Matriz Extracelular	0.001	0.001
	GO: 0055114	Oxidación-Reducción	0.01	0.01

En la tabla se muestran las categorías significativamente enriquecidas según una puntuación EASE < 0,05. Entre los genes desregulados en las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de privación de suero. Se utilizó la herramienta de análisis bioinformática DAVID. GO: ontología génica, EASE: (*Expression Analysis Systematic Explorer*) explorador sistemático de análisis de expresiones.

6.2.6.3. Validación de los genes desregulados en las hMSC que acumulan prelamina A en condiciones de estrés.

A continuación, se validaron mediante la técnica de RT-qPCR la desregulación de un subgrupo de genes involucrados en los procesos de oxidación-reducción (SEPX1, DHRS9, RDH5 y PIG3) y en la respuesta al estrés oxidativo (HIF1A, SCARA3, DHCR24, DDIT3, BCL2 y GPX3) (Figura 48). De igual modo se validó la expresión de algunos de los genes conocidos por estar regulados positivamente en las hMSC senescentes (Wagner et al., 2008): CTSK, GPNMB y Ly96 (Figura 49).

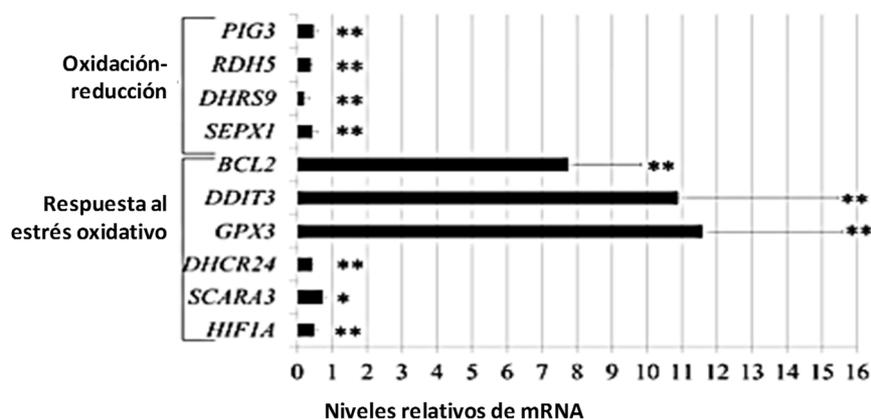


Figura 48. Validación mediante RT-qPCR de un subconjunto de genes agrupados en las categorías de oxidación-reducción y en respuesta al estrés oxidativo. Se muestra la razón de expresión génica entre las hMSC que acumulan prelamina A frente a sus controles, en condiciones de privación de suero. Para la normalización de la expresión génica se utilizó GAPDH. Los datos representan la media de los triplicados de tres ensayos en hMSC derivadas de tres donantes diferentes de medula ósea. Las barras representan el promedio \pm SD. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

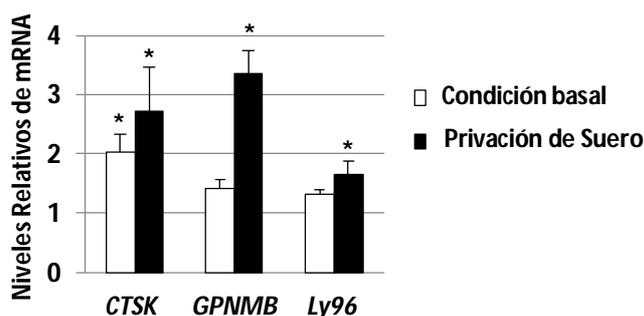


Figura 49. Validación por RT-qPCR de genes asociados a senescencia que están regulados positivamente en hMSC senescentes. Se muestra la razón de expresión génica entre las hMSC que acumulan prelamina A frente a sus controles, en condiciones basales y de privación de suero. Para la normalización de la expresión génica se utilizó GAPDH. Los datos representan la media de los triplicados de tres ensayos en hMSC derivadas de tres donantes diferentes de medula ósea. Las barras muestran el promedio \pm SD. * $P < 0,05$.

En la tabla 7 se muestran las categorías identificadas por el análisis mediante DAVID en las que se sitúan estos genes.

Tabla 7. Nombre, rol funcional, regulación y descripción de los genes validados por análisis de RT-qPCR.

Nombre	Ontología Génica	Regulación génica	Descripción del gen
<i>SEPX1</i>	Oxidación-Reducción	Negativa	<i>Metionine-R-sulfoxide reductase B1</i>
<i>DHRS9</i>		Negativa	<i>Dehydrogenase/Reductase 9</i>
<i>RDH5</i>		Negativa	<i>Retinol dehydrogenase 5 (11-cis/9-cis)</i>
<i>PIG3</i>		Negativa	<i>p53-inducible gene 3 quinone oxidoreductase</i>
<i>HIF1A</i>	Respuesta al estrés oxidativo	Negativa	<i>Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit</i>
<i>SCARA3</i>		Negativa	<i>Scavenger receptor class A, member 3 /Cell Stress Resp 1</i>
<i>DHCR24</i>		Negativa	<i>24-dehydrocholesterol reductase</i>
<i>DDIT3</i>		Positiva	<i>DNA damage inducible transcript 3</i>
<i>BCL2</i>		Positiva	<i>B Cell CLL/lymphoma 2</i>
<i>GPX3</i>		Positiva	<i>Glutathiones peroxidase 3</i>
<i>CTSK</i>	Envejecimiento	Positiva	<i>Cathepsin K</i>
<i>GPNMB</i>		Positiva	<i>Glycoprotein transmembrane nmb</i>
<i>LY96</i>		Positiva	<i>Lymphocyte antigen 96</i>

6.3. OBJETIVO 3: IDENTIFICACIÓN DE MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN EL ENVEJECIMIENTO HUMANO EN MSC.

6.3. Búsqueda de factores de transcripción potencialmente alterados

Se ha descrito previamente que las alteraciones de la lámina nuclear, específicamente por acumulación de prelamin A, obstaculizan el funcionamiento normal de la célula, provocando entre otras modificaciones la retención de factores de transcripción a nivel de su entramado de filamentos. De entre ellos cabe destacar el factor de transcripción SREBP1 en fibroblastos de pacientes con laminopatías y en pre-adipocitos murinos (Capanni *et al.*, 2005), y Sp1 en adipocitos derivados de hMSC (Ruiz de Eguino *et al.*, 2012). El hecho de que los factores de transcripción queden retenidos en la envoltura nuclear impide a los mismos desempeñar su función normal.

Con objeto de identificar potenciales factores de transcripción cuya función pueda estar comprometida por la acumulación del precursor prelamin A y, a su vez, involucrados en los fenotipos de envejecimiento se utilizó el programa bioinformático *Distant Regulatory Elements, DiRE* (Gotea *et al.*, 2008). Esta herramienta bioinformática analiza los promotores de los genes desregulados entre los genes desregulados en las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones

de estrés, e identifica un posible enriquecimiento de secuencias diana para un factor de transcripción. Comparando los genes alterados que mostraban un *fold* de 1.4 frente a un conjunto aleatorio de 5.000 genes el programa *DiRE* señaló a Oct-1 como el factor de transcripción más sobrerrepresentado, el cual podría estar participando en la alteración de la regulación génica observada en nuestros resultados. Como observamos en el gráfico de la figura 50, Oct-1 destaca con aproximadamente un 18% de **Ocurrencia** (parámetro que indica la fracción de elementos reguladores posibles que contiene un sitio de unión para un factor de transcripción en particular) y con una **Importancia** (que es el producto de la ocurrencia y el peso asignado a cada factor de transcripción lo que resulta en una medida de la asociación del factor de transcripción en relación al total de genes analizados) superior a 0,1.

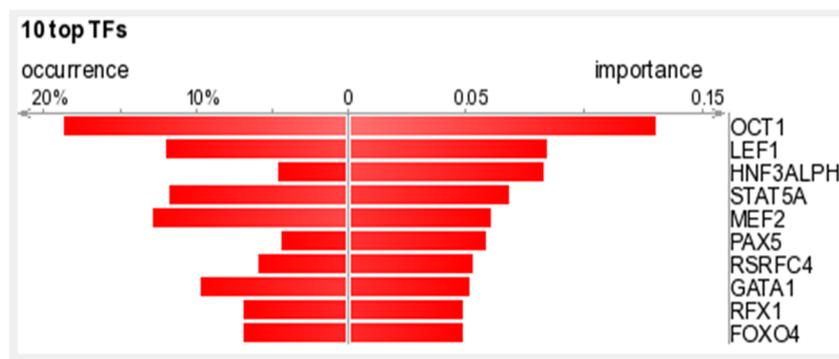


Figura 50. Análisis *in silico* mediante DiRE de posibles factores de transcripción involucrados en la alteración de la regulación génica de las hMSC que acumulan prelamina A en condiciones de estrés. El análisis de los genes que se encuentran desregulados en las hMSC que acumulan prelamina A señala a Oct-1 como factor de transcripción con mayor probabilidad de estar relacionado a estos cambios. La gráfica muestra los 10 factores de transcripción candidatos clasificados por importancia.

6.3.1. Análisis de Oct-1 como posible factor de transcripción involucrado en el envejecimiento de hMSC.

6.3.1.1. Aumento de la expresión de Oct-1 en hMSC que acumulan prelamina A sometidas a condiciones de estrés.

Debido a los hallazgos previos y al hecho de que Oct-1 es un conocido sensor de estrés celular (Tantin *et al.*, 2005) evaluamos la expresión y distribución sub-celular de Oct-1 en las hMSC control y en las que acumulan prelamina A tanto en condiciones basales como de privación de suero. Como era de esperar, la expresión de Oct-1 fue inducida, presentando una localización nuclear en las hMSC control después de someterlas a condiciones de estrés (privación de suero) (Figura 51). Pese a que la acumulación de prelamina A no indujo ninguna alteración en la expresión de Oct-1, sí se detectó sobre-expresión de Oct-1 cuando las hMSC que acumulan

prelamin A se sometieron a privación de suero. Destacamos a su vez, el hecho observado previamente donde la combinación de la acumulación de prelamin A en las hMSC y la privación de suero, promueve a su vez una mayor acumulación de prelamin A por un mecanismo desconocido (Figura 34).

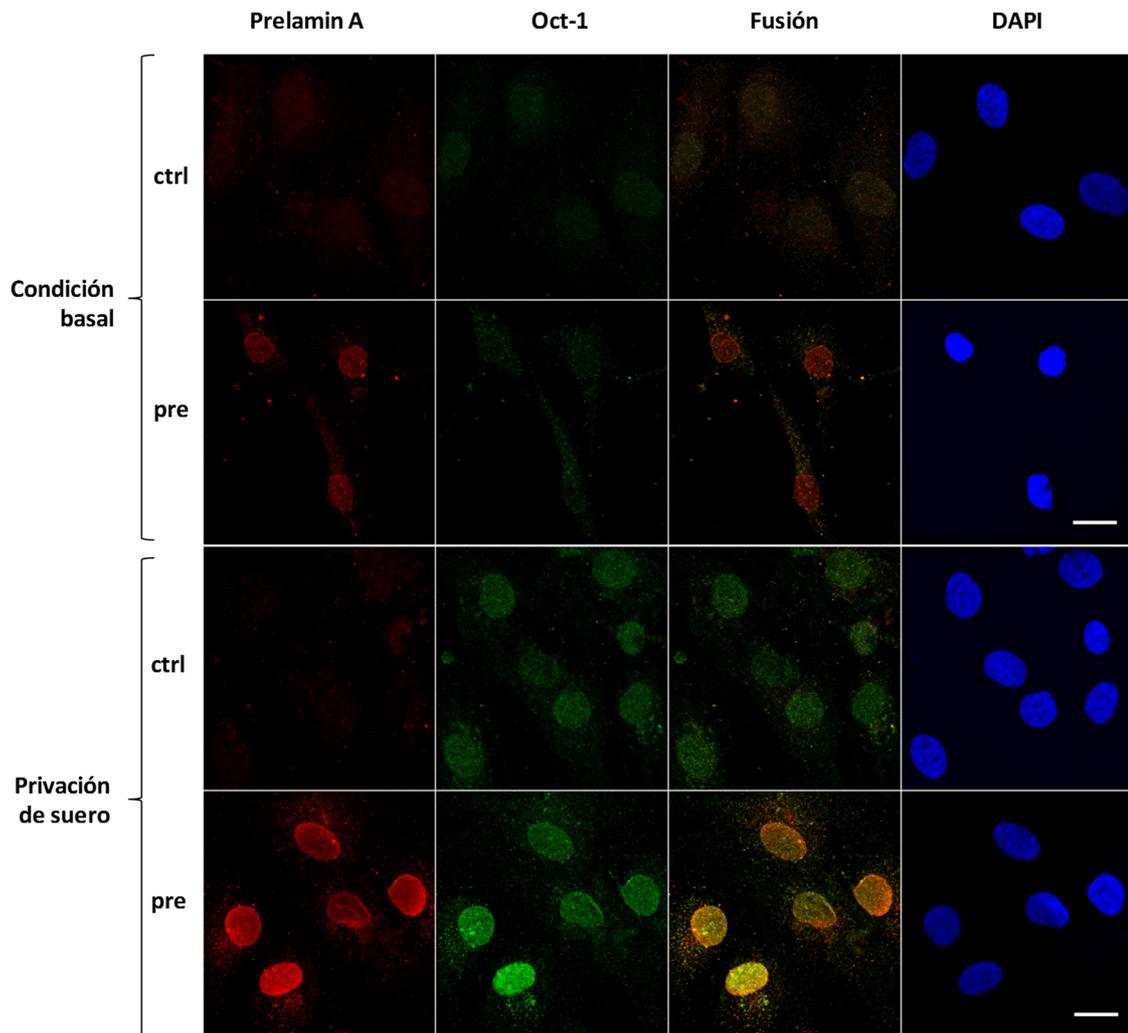


Figura 51. La acumulación de prelamin A en hMSC en condiciones de privación de suero induce sobre-expresión de Oct-1. Imágenes representativas de microscopía confocal de la tinción por inmunofluorescencia que muestra la expresión de Oct-1 (verde) y prelamin A (rojo) en las hMSC en condiciones basales (con medio completo) o de privación de suero (estrés). Barra de escala: 20 μ m. Pre: hMSC que acumulan prelamin A, ctrl: hMSC control.

6.3.1.2 Análisis funcional de la actividad de Oct-1

Posteriormente examinamos si esta sobre-expresión de Oct-1 observada en condiciones de acumulación de prelamin A y privación de suero, ocasionaba alguna repercusión en su actividad transcripcional. Como se advierte en la figura 52 la actividad del gen reportero de Oct-1 aumentó considerablemente en las hMSC control sometidas a privación de suero, en concordancia con su función como sensor de estrés y con su expresión aumentada en dichas condiciones (Figura 51).

Sin embargo, aunque la acumulación de prelamin A por si sola no alteró la actividad transcripcional de Oct-1 (Figura 52), esta actividad disminuyó significativamente en las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de privación de suero.

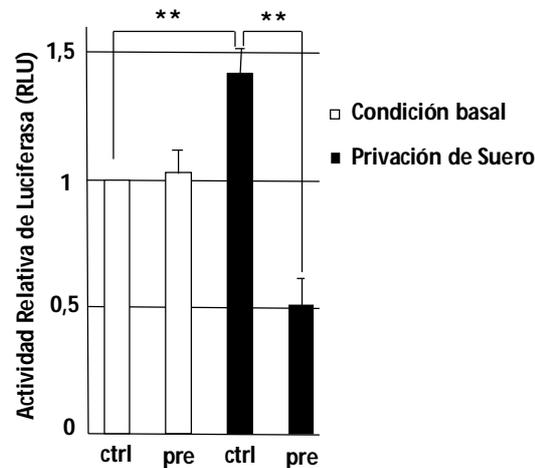


Figura 52. Las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de privación de suero muestran una alteración en la actividad de Oct-1. Ensayos del reportero de luciferasa de la actividad del factor de transcripción Oct-1 en hMSC cultivadas en condiciones basales (medio completo) o de estrés (privación de suero). RLU: Unidades (del inglés: *raw light units*). Las barras representan el promedio \pm SD de hMSC derivadas de 3 donantes distintos de médula ósea. Pre: hMSC que acumulan prelamin A, ctrl: hMSC control. ** $p < 0,01$.

6.3.1.3. Análisis de la interacción Oct-1 con prelamin A

Como describimos anteriormente al inicio de este apartado, estudios llevados a cabo por otros autores (Capanni *et al.*, 2005) así como por nuestro grupo de investigación (Ruiz de Eguino *et al.*, 2012) han demostrado interacciones entre el precursor prelamin A acumulado y otros factores de transcripción. Con objeto de determinar si la reducción de la actividad de Oct-1 se debe a una interacción directa entre prelamin A y Oct-1 se realizó un ensayo *in situ* de *Proximity Ligation Assay* (PLA). Se trata de un método altamente específico que permite evaluar la interacción física de complejos proteína-proteína (Coste *et al.*, 2010; Chamcheu *et al.*, 2011; Söderberg *et al.*, 2006). De manera que únicamente las proteínas que interactúan entre sí, emiten una señal que es registrada mediante microscopía de fluorescencia. Como se muestra en la figura 53, se detectan interacciones entre Oct-1 y prelamin A en las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de estrés, sin poder detectar interacciones entre estas dos proteínas en las células de control.

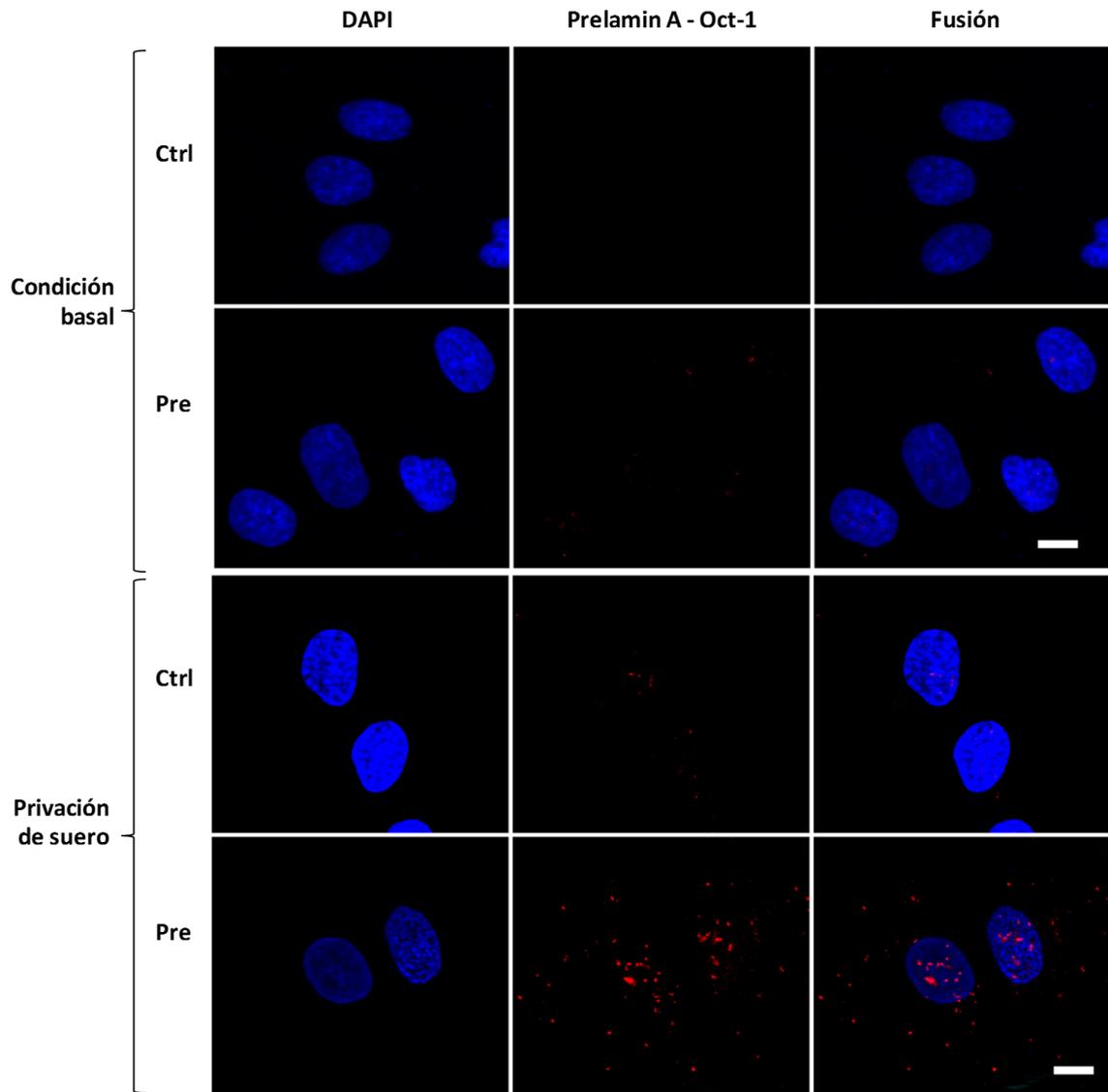


Figura 53. Interacción entre prelamin A y Oct-1 en hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de estrés. PLA para prelamin A y Oct-1. Cada punto rojo corresponde a la interacción física proteína-proteína cuando estas se encuentran a menos de 40 nm de distancia física. Se muestra una imagen representativa del ensayo realizado en hMSC derivadas de dos donantes diferentes de medula ósea. Barra de escala 20 μm . Pre: hMSC que acumulan prelamin A. Ctrl: hMSC control.

6.3.1.4. Silenciamiento de Oct-1

Los hallazgos anteriores sugieren que la desregulación de la actividad transcripcional de Oct-1 podría contribuir al menos en parte a la alteración del perfil de transcripción génica que exhiben las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de privación de suero. Con el fin de dilucidar el rol funcional que podría desempeñar Oct-1 en la homeostasis de las hMSC, decidimos silenciar su expresión en estas células transfectando un vector viral que expresa un RNA de interferencia específico para Oct-1 (shRNA-Oct-1). El silenciamiento de Oct-1 se confirmó tanto a

nivel de proteína como génico, utilizando las técnicas de *western blot* (Figura 54) y RT-qPCR (Figura 55), respectivamente.

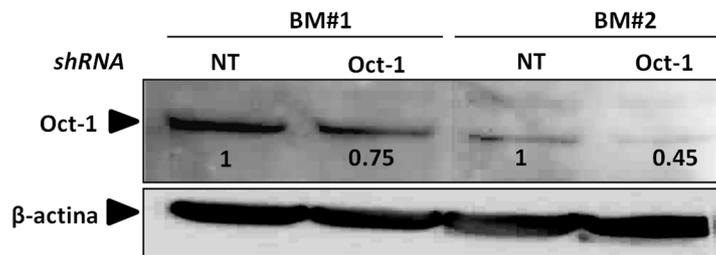


Figura 54. Western blot que comprueba el silenciamiento de Oct-1. Se observa la disminución en la expresión de Oct-1 posteriormente a su silenciamiento con los vectores lentivirales shRNA-Oct-1 y ShRNA-NT (NT: no dirigidos, control) en hMSC derivadas de dos donantes diferentes de medula ósea (BM). Los números corresponden a la cuantificación de la densitometría de las bandas para la expresión de Oct-1, relativizadas con su respectivo control de carga, para lo cual usamos la β-actina.

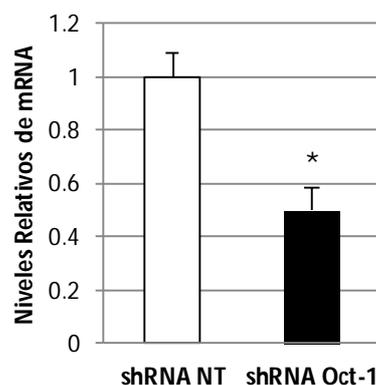


Figura 55. Validación por RT-qPCR del silenciamiento de Oct-1 en hMSC. Se muestra la disminución de los niveles relativos de RNA de Oct-1. Para la normalización de la expresión génica se utilizó *GAPDH*. Los datos representan la media de los triplicados de tres ensayos en hMSC derivadas de tres donantes diferentes de medula ósea. Las barras muestran el promedio ± SD. *P<0,05.

Los cultivos de las hMSC silenciadas para Oct-1 presentaron una disminución en la proliferación, con una marcada reducción del número de células (50% de supervivencia) así como cambios en su morfología. Estas células adquieren una forma irregular y plana característica de células senescentes, lo que subraya el papel fundamental que desempeña este factor de transcripción en la supervivencia celular. En la figura 56 se muestra una imagen representativa del cultivo celular en las hMSC a las 72 horas y a los 7 días posteriores al silenciamiento de Oct-1.

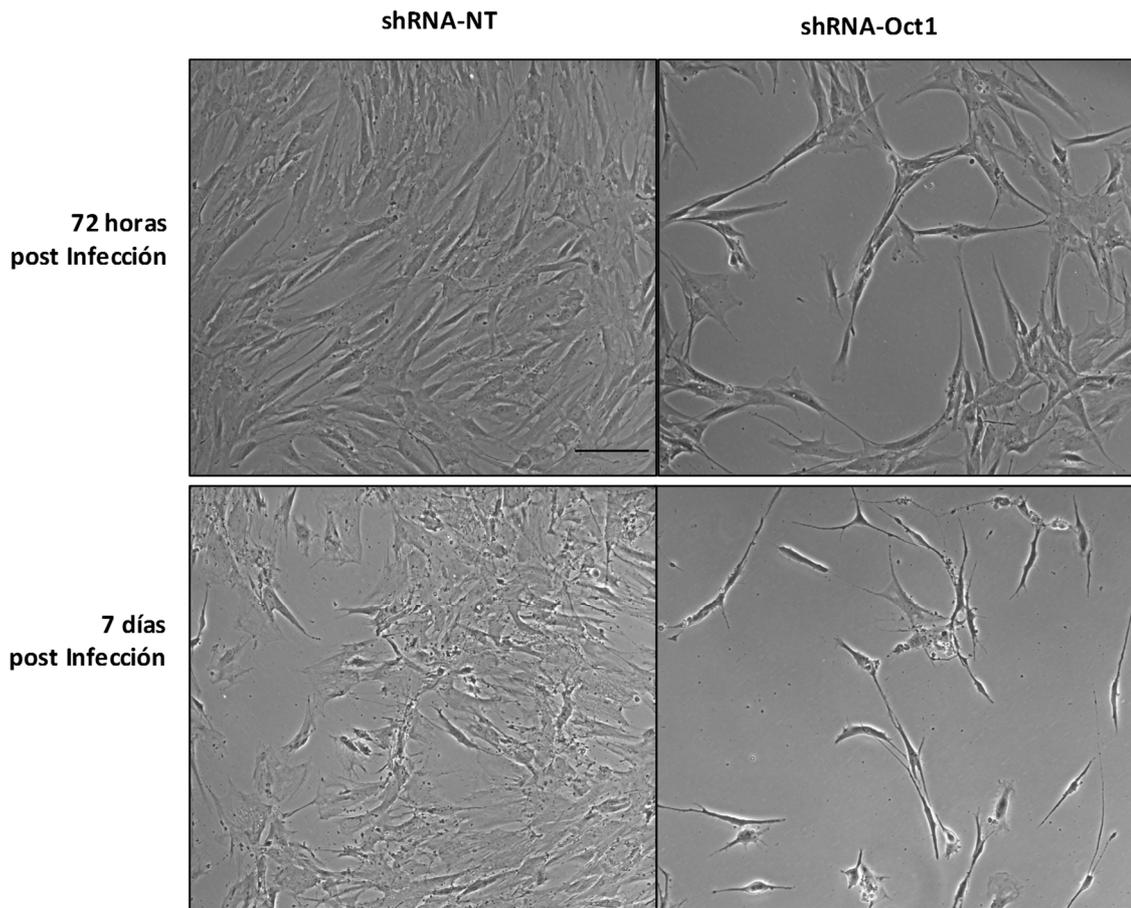


Figura 56. Alteraciones morfológicas y proliferativas asociadas al silenciamiento de Oct-1 en las hMSC. Se muestran imágenes representativas de campo luminoso (barra de escala: 100 μm).

A continuación, analizamos la susceptibilidad de las hMSC silenciadas para Oct-1 sometidas a condiciones de estrés, como la privación de suero. Como puede apreciarse en la figura 57 hubo una disminución considerable de la supervivencia celular tras el silenciamiento de Oct-1 en las hMSC en condiciones de cultivo basales, demostrando que la función de Oct-1 en las hMSC es esencial para promover la supervivencia celular. En condiciones de privación de suero, las hMSC control (infectadas con vectores no dirigidos: NT) exhibieron una reducción en su número de células, probablemente debido al hecho de que el propio proceso de infección promueve que estos cultivos primarios de hMSC sean más susceptibles a condiciones de estrés. Por el contrario, las hMSC silenciadas para Oct-1 en condiciones de estrés mostraron una leve disminución, similar a la supervivencia celular observada en condiciones basales, demostrando que a pesar de que la actividad de Oct-1 es fundamental para la supervivencia de las hMSC, el silenciamiento de Oct-1 no hace que las células sean más susceptibles a la condición de privación de suero como inductor de estrés en este caso.

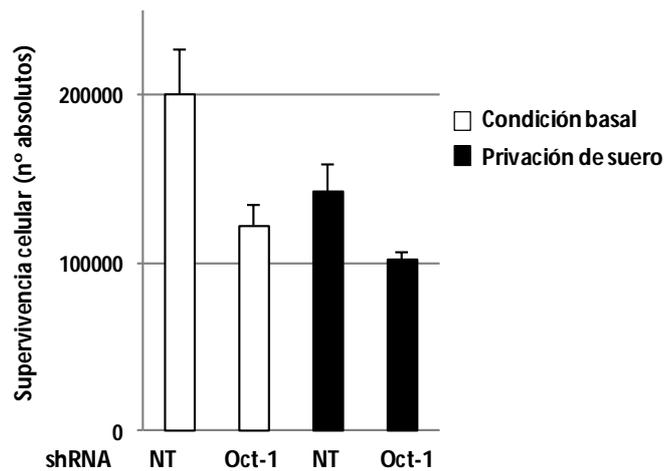


Figura 57. Supervivencia celular en hMSC silenciadas para Oct-1. Los datos representan la media de los triplicados de hMSC derivadas de dos donantes diferentes de medula ósea. Como NT (no dirigidos) se muestran los controles y como Oct-1 las hMSC transducidas con shRNA-Oct-1. Las barras muestran el promedio \pm SD.

6.3.1.5. El silenciamiento de Oct-1 induce senescencia

A su vez, nos preguntamos si Oct-1 podría explicar otras características del envejecimiento. Nos centramos en dos fenotipos que también se encontraron alterados en nuestro modelo experimental humano como consecuencia de la acumulación de prelamin A, como son la senescencia celular y la autofagia.

Las células senescentes se analizaron mediante la tinción de β -galactosidasa (Figura 58), que mostró un aumento significativo en la senescencia en las hMSC silenciadas para Oct-1 (73 %), en comparación con las hMSC control (23%). Este aumento en la senescencia de las hMSC silenciadas para Oct-1 concuerda con las alteraciones morfológicas observadas anteriormente en estas células en condiciones basales (Figura 56).

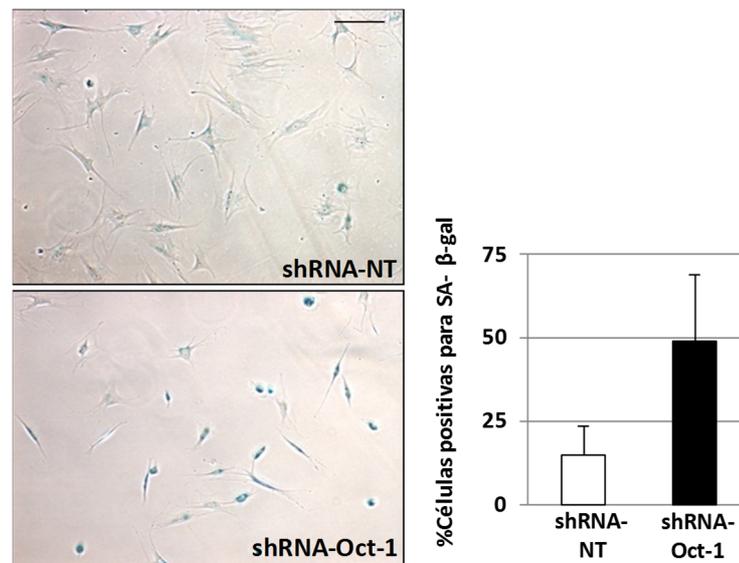


Figura 58. Inducción de senescencia en las hMSC silenciadas para Oct-1. En la parte superior de la figura se muestra una imagen representativa de la tinción con SA β -gal y en la parte inferior se indica la cuantificación. Como NT (no dirigidos) se muestran los controles y como Oct-1 las hMSC transducidas con shRNA-Oct-1. Barra de escala: 100 μ m. Se usaron hMSC derivadas de dos donantes diferentes de médula ósea. Las barras corresponden a la media \pm SD.

6.3.1.6. El silenciamiento de Oct-1 activa la autofagia en hMSC.

A continuación, evaluamos la vía de la macroautofagia en las hMSC en las que se había silenciado la expresión de Oct-1. Observamos una disminución en la expresión de la forma fosforilada de la proteína S6 (pS6) en las células con Oct-1 silenciado, especialmente en condiciones de privación de suero (Figura 59). A su vez, se produce un aumento en la formación de los autofagosomas, determinado por el incremento en la expresión de LC3-II (como muestra el esquema de la Figura 37), de forma similar a lo que sucede en las hMSC que acumulan prelamina A en condiciones de privación de suero (Figura 38). Estos resultados mostraron que Oct-1 actúa como un factor de transcripción esencial para la activación de la vía mTORC1 y la inhibición de la autofagia en condiciones de estrés. Sin embargo, y contrariamente a nuestras observaciones anteriores en las hMSC que acumulan prelamina A que presentan una autofagia disfuncional, el proceso de autofagia en hMSC con Oct-1 silenciado parece ser eficiente, como indica la disminución de la expresión de la proteína p62. Es importante destacar que este resultado se observó independientemente de las condiciones de privación de suero (Figura 59), lo cual señala a Oct-1 como un factor crítico en la regulación de la expresión de p62 en las hMSC.

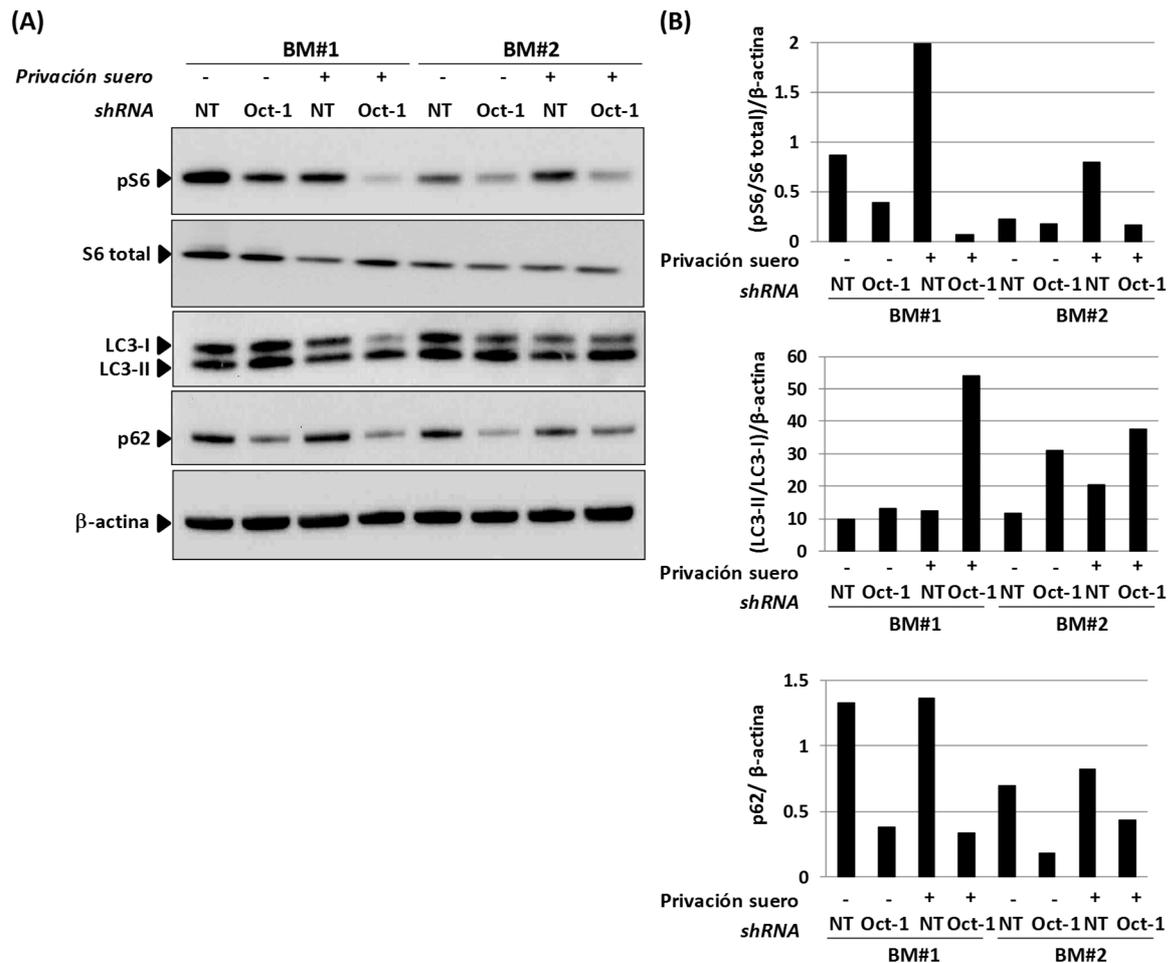


Figura 59. El silenciamiento de Oct-1 induce la autofagia en hMSC. A) *Western blot* de las proteínas indicadas en hMSC silenciadas para Oct-1 y sus controles (NT). Se utilizó β-actina como control de carga. B) Gráficos de la densitometría para cada proteína analizada. Para estos experimentos se usaron hMSC derivadas de dos donantes diferentes de médula ósea (BM#1 y BM#2).

6.3.2. Análisis del Rol de Oct-1 en la regulación del procesamiento de la proteína prelamina A.

Previamente observamos que la acumulación de prelamina A es mayor en condiciones de estrés, como la privación de suero (Figuras 34 y 35), revelando que la combinación de ambos, actúa de manera sinérgica por un mecanismo hasta ahora desconocido. Advertimos además, que la acumulación de Oct-1 se acrecentó notablemente en condiciones de estrés y acumulación de prelamina A, por lo que nos preguntamos si este factor de transcripción que es un sensor de estrés podría participar en la regulación de prelamina A. Por otra parte, Ragnauth *et al.* (2010) observaron en células musculares lisas vasculares que tanto el estrés oxidativo (inducido con peróxido de hidrógeno) como la privación de suero, producen una disminución en los niveles del mRNA de la enzima esencial en el procesamiento de la proteína lamin A, denominada ZMPSTE24. Por lo cual decidimos valorar los niveles de expresión de ZMPSTE24 en las hMSC que acumulan

prelamin A en condiciones basales y en condiciones de privación de suero. Como observamos en la figura 60, las hMSC que acumulan prelamin A presentan una disminución significativa de los niveles de *ZMPSTE24*. Se observa además, un ligero pero significativo aumento de los niveles de mRNA de *ZMPSTE24* en las hMSC control en condiciones de estrés.

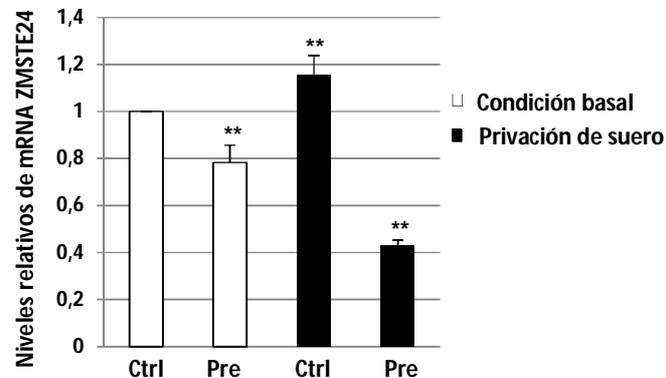


Figura 60. Disminución de la expresión de *ZMPSTE24* en hMSC que acumulan prelamin A. Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión del gen *ZMPSTE24* en las hMSC que acumulan prelamin A y sus controles, tanto en condiciones basales como de estrés. Se muestra la razón de expresión génica frente al control en condiciones basales. Para la normalización de la expresión génica se utilizó GAPDH. Los datos representan la media de los triplicados de tres ensayos en hMSC derivadas de diferentes donantes de médula ósea. Las barras muestran el promedio \pm SD. ** $P < 0,01$.

A continuación, estudiamos si estos cambios observados a nivel de la transcripción génica se corresponden con los niveles de expresión de la proteína *ZMPSTE24* en nuestro modelo celular. Como se observa en la figura 61, las hMSC que acumulan prelamin A presentan una expresión disminuida de la proteína *ZMPSTE24* en condiciones basales. En cambio, en condiciones de privación de suero se evidencia un aumento de la expresión de la misma, lo cual no se corresponde con la disminución de la expresión del mRNA de *ZMPSTE24* observado previamente.

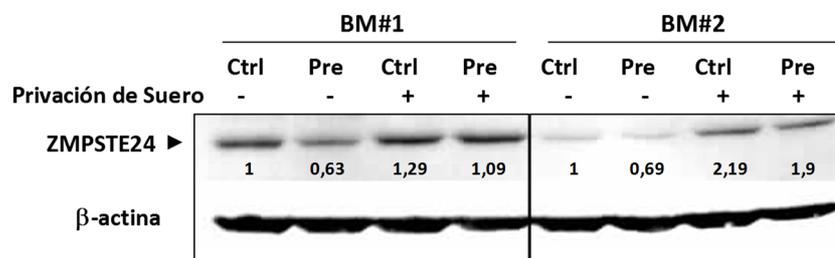


Figura 61. Las hMSC que acumulan prelamin A muestran una alteración de la expresión de la proteína *ZMPSTE24*. NT: (*shRNA* no dirigido) son los controles. Se muestran los resultados de dos de los tres ensayos realizados en hMSC derivadas de tres donantes diferentes de médula ósea (BM). Los números corresponden a la cuantificación de la densitometría de las bandas para la expresión de *ZMPSTE24*, relativizadas con su respectivo control de carga (β -actina).

6.3.2.1. Análisis *in silico* del promotor del gen *ZMPSTE24*

Posteriormente, nos preguntamos si es posible que este gen que participa en la modificación post-traducciona de la proteína prelamin A, podría estar regulado al menos en parte por el factor de transcripción Oct-1, para lo cual realizamos un análisis computacional (mediante la aplicación MotifLocator) del promotor del gen de *ZMPSTE24*, donde encontramos cinco sitios putativos de unión para Oct-1 (Figura 62).

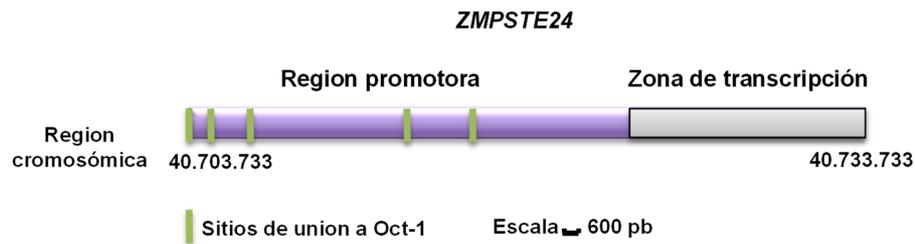


Figura 62. Esquema representativo. Se muestra la localización de los posibles sitios de unión para el factor de transcripción Oct-1 en el promotor del gen de *ZMPSTE24*.

6.3.2.2. Oct-1 regula la expresión génica de *ZMPSTE24* en hMSC

Con objeto de determinar si Oct-1 podría estar regulando a *ZMPSTE24* estudiamos los niveles de expresión de este gen en las hMSC silenciadas para el factor de transcripción Oct-1, tanto en condiciones basales como en condiciones de estrés. Como se observa en la figura 63, los niveles de *ZMPSTE24* se encontraron disminuidos en las hMSC silenciadas para Oct-1, siendo mayor la reducción de su nivel de expresión en las hMSC silenciadas para Oct-1 en condiciones de estrés. En cambio, en las hMSC control en condiciones de estrés se observa un leve aumento de los niveles de *ZMPSTE24*, al igual que sucedía en la hMSC control en las mismas condiciones en nuestro modelo experimental (Figura 61).

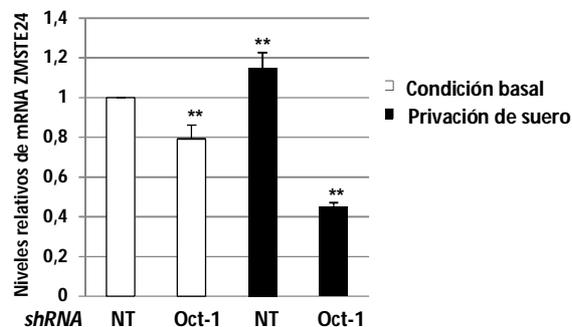


Figura 63. Disminución de los niveles de expresión del gen *ZMPSTE24* en hMSC silenciadas para Oct-1. Mediante el análisis por RT-qPCR se muestra la razón de expresión génica entre las hMSC que acumulan prelamin A frente a sus respectivos controles, en condiciones basales y de privación de suero. Para la normalización de la expresión génica se utilizó GAPDH. Los datos representan la media de los triplicados en hMSC derivadas de tres donantes diferentes de médula ósea. Las barras muestran el promedio \pm SD. **P<0,01.

6.3.2.3. Oct-1 regula la expresión de la proteína ZMPSTE24 en hMSC

Seguidamente comprobamos los niveles de expresión de la proteína ZMPSTE24 en las hMSC silenciadas para el factor de transcripción Oct-1, tanto en condiciones basales como en condiciones de estrés. En la figura 64 observamos disminución de los niveles de expresión de ZMPSTE24 en las hMSC silenciadas para Oct-1, siendo esta disminución mayor en condiciones de estrés, lo que se corresponde con la disminución de los niveles de expresión a nivel de su RNA mensajero. Estos resultados en conjunto sugieren que el factor de transcripción Oct-1 actúa como un regulador positivo de ZMPSTE24.

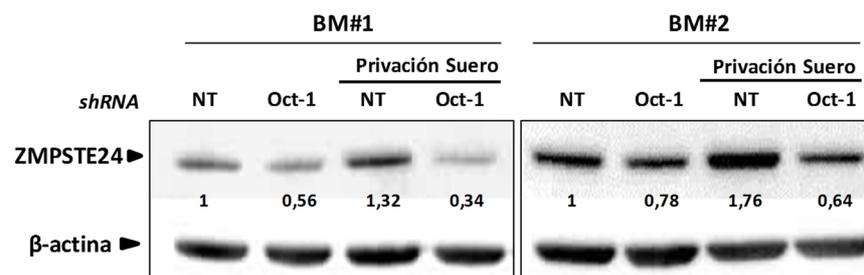


Figura 64. Las hMSC silenciadas para Oct-1 muestran una expresión disminuida de la proteína ZMPSTE24. NT: (*shRNA* no dirigido) son los controles. Se muestran los resultados de dos de los tres ensayos realizados en hMSC derivadas de tres donantes diferentes de médula ósea (BM). Los números corresponden a la cuantificación de la densitometría de las bandas para la expresión de ZMPSTE24, relativizadas con su respectivo control de carga (β -actina).

Cabe destacar, además, que se observa el aumento de los niveles de expresión de ZMPSTE24 en las hMSC control (NT) en condiciones de privación de suero, al igual que sucede a nivel de su mRNA.

6.3.2.4. Oct-1 regula la expresión de prelamin A en hMSC

Debido a que Oct-1 altera la expresión de ZMPSTE24 y esta a su vez tiene una función esencial en el procesamiento de prelamin A, esperamos que las hMSC con una menor actividad de Oct-1 modifiquen la acumulación de prelamin A, corroborando de esta manera la función reguladora positiva de Oct-1 sobre la proteasa ZMPSTE24. Para confirmar esta hipótesis evaluamos los niveles de expresión del sustrato diana de ZMPSTE24 que es la proteína prelamin A en las células silenciadas para Oct-1. Como muestra la figura 65 se observó la acumulación de prelamin A en las hMSC silenciadas para Oct-1, con un incremento en sus niveles de expresión en las células silenciadas para Oct-1 sometidas a condiciones de estrés. Esta observación se correlaciona con la disminución de los niveles de ZMPSTE24 en estas condiciones que indicamos anteriormente, por lo que estos resultados avalan la función reguladora de Oct-1 en el

procesamiento de prelamin A y por tanto su participación activa en el proceso de envejecimiento.

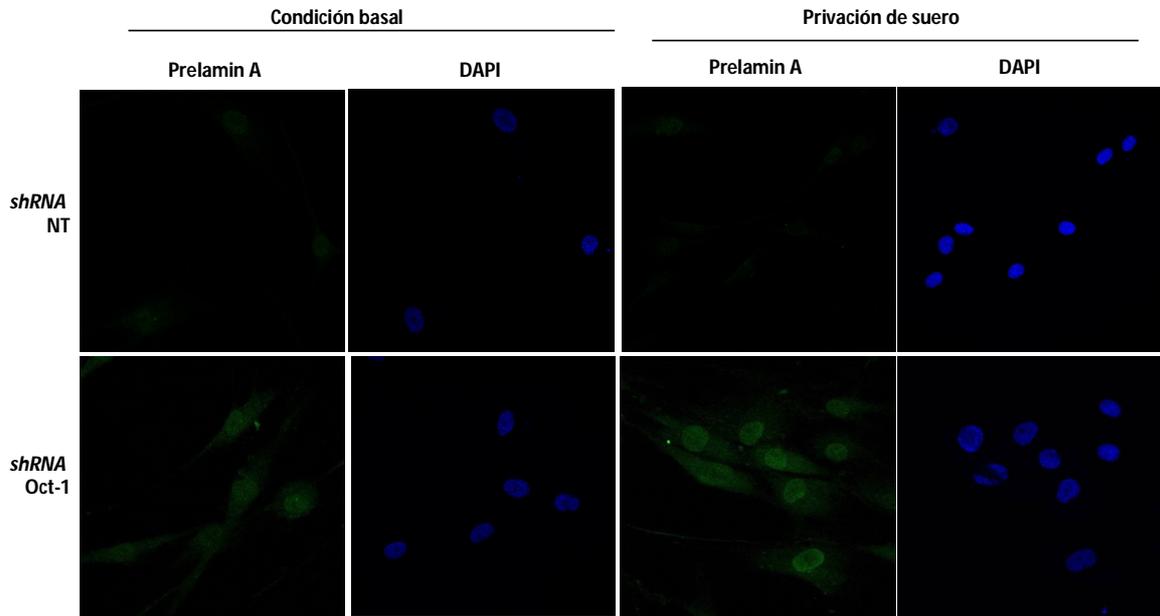


Figura 65. Acumulación de prelamin A en las células silenciadas de Oct-1 en condiciones de estrés. Detección de prelamin A (verde) mediante Inmunofluorescencia. Resultado en hMSC derivadas de un único donante de médula ósea. Barra de escala: 20 μ m.

VII. DISCUSIÓN

El creciente envejecimiento de la población constituye un hecho innegable en la sociedad occidental, el cual es debido en gran parte a la mayor esperanza de vida que acontece en los países desarrollados. El envejecimiento fisiológico no determina por sí mismo ninguna enfermedad, sin embargo, conlleva a la claudicación funcional de los sistemas de mantenimiento de la homeostasis celular, constituyendo así un terreno fértil para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas o cáncer. Por ello existe una necesidad real de comprender los mecanismos moleculares subyacentes a este proceso inevitable. El objetivo final de investigar los mecanismos involucrados en el envejecimiento es no solo aumentar la expectativa de vida, sino principalmente lograr diferir el mayor tiempo posible la aparición de enfermedades asociadas al envejecimiento, con el fin de aumentar la duración del período de vida libre de enfermedad. El envejecimiento ha sido estudiado extensamente en múltiples organismos como nematodos y ratones, brindándonos información muy valiosa (Lin *et al.*, 1997; Pendás *et al.*, 2002; Varela *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2005; Mariño *et al.*, 2008; Scaffidi y Misteli, 2008; Espada *et al.*, 2008; Kenyon *et al.*, 2010; Carrero *et al.*, 2016). Sin embargo, debido a las innegables diferencias que hay entre especies y a la complejidad del organismo humano, ninguno de los estudios en animales recapitula con precisión el proceso de envejecimiento en los seres humanos (Partridge *et al.*, 2007). A raíz de lo cual, en los últimos años se han propuesto modelos experimentales (*in vitro*) humanos donde poder estudiar el envejecimiento celular y superar estos inconvenientes, como es el caso de los síndromes de envejecimiento prematuro asociados al gen *LMNA* (Zhang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Nissan *et al.*, 2011). El uso de estos modelos para estudiar el proceso fisiológico de envejecimiento humano se basa en el hecho de que se ha detectado la acumulación de progerina en las hMSC de individuos ancianos (Scaffidi y Misteli, 2006) y en fibroblastos normales sometidos a un alto número de pases de cultivo (denominado senescencia replicativa) (Cao *et al.*, 2011). Así como también la presencia de prelamin A en células del músculo liso vascular envejecidas (Ragnauth *et al.*, 2010) y de fibroblastos de individuos centenario (Lattanzi *et al.*, 2014), aunque con niveles muy bajos de expresión con respecto a los síndromes progeroides.

Se ha descrito previamente en la literatura que la acumulación de prelamin A inducida por algunos inhibidores de la proteasa del VIH lleva a un fenotipo de senescencia prematura en varios tipos celulares, incluyendo fibroblastos (Caron *et al.*, 2007), células endoteliales o células mononucleares de sangre periférica (Lefèvre *et al.*, 2010). Nuestro grupo de investigación proporcionó evidencia previamente de que la acumulación de prelamin A inducida por un inhibidor de la proteasa del VIH (TPV), provoca una reducción de la proliferación de hMSC en cultivo como consecuencia de una senescencia prematura (Ruiz de Eguino *et al.*, 2012). Esta observación ha sido confirmada posteriormente por Hernández-Vallejo *et al.* (2013) en el mismo tipo celular, pero utilizando un tratamiento antirretroviral con inhibidores de proteasa del VIH distintos a TPV para generar la acumulación de prelamin A.

7.1. RECAPITULACIÓN DE LOS FENOTIPOS DE ENVEJECIMIENTO EN LAS HMSC QUE ACUMULAN PRELAMIN A.

En el presente trabajo exploramos el fenotipo senescente de las hMSC que acumulan el precursor de Lamin A previamente observado por nuestro grupo, y lo proponemos como un modelo experimental de envejecimiento humano basado en la inducción de la acumulación de prelamin A en hMSC. El fenotipo de envejecimiento en nuestro modelo es menos severo (similar al que se observa en la lipodistrofia ligada a *LMNA*) que los fenotipos mostrados en modelos experimentales de progeria humana, o en pacientes ancianos con patologías asociadas al envejecimiento. Hemos confirmado que las hMSC que acumulan prelamin A presentan algunas características de las células envejecidas fisiológicamente, como son el acortamiento de los telómeros, la inducción del daño al DNA y el fenotipo senescente (disminución de la proliferación celular, mayor porcentaje de células senescentes, cambios morfológicos celulares).

Concretamente, demostramos por primera vez que la acumulación de prelamin A en hMSC provoca una disminución de la longitud de los telómeros por un mecanismo aún desconocido. Dicho acortamiento telomérico se asocia conjuntamente al aumento en el porcentaje de telómeros cortos. El porcentaje de telómeros críticamente cortos es determinante de la disfunción telomérica e influye fundamentalmente en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica y la viabilidad celular (Hemann *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2005; Canela *et al.*, 2007; Martínez y Blasco, 2010). Esta disminución parece depender de la longitud inicial de los telómeros, ya que los individuos con telómeros más largos (en nuestro caso, las hMSC derivadas del donante de médula ósea de 18 años de edad) a pesar de mostrar un mayor acortamiento de los telómeros en comparación con los individuos de mayor edad, no mostraron diferencias en el porcentaje de telómeros más cortos. De acuerdo con esta observación, las hMSC derivadas de los donantes de medula ósea de más de 18 años de edad, mostraron no sólo los telómeros más cortos de forma global, sino que también tuvieron el mayor incremento en el porcentaje de telómeros críticamente cortos (<3 kb) en condiciones de acumulación de prelamin A, lo cual como se ha mencionado anteriormente es una característica de las células envejecidas. Estos resultados resaltan los efectos que la acumulación de prelamin A ejerce sobre la longitud de los telómeros, y más específicamente sobre el acortamiento de los telómeros cuando éstos alcanzan un umbral mínimo de longitud en las hMSC. Cabe aclarar que, aunque la relación entre la acumulación de prelamin A y los telómeros no ha sido estudiada en profundidad en modelos humanos, existe controversia en los estudios realizados con el fin de determinar si progerina era capaz de inducir el acortamiento de los telómeros (Cao *et al.*, 2011). Esta discrepancia de resultados entre los distintos grupos investigadores probablemente se debe al hecho de que se han utilizado diferentes métodos y/o tecnologías para evaluar la longitud de los telómeros, o también podría deberse a que los niveles de acumulación de la proteína inmadura no sea el mismo en todos los casos y por tanto los efectos obtenidos sean diferentes. Sin embargo, los

resultados recientes obtenidos utilizando el método extremadamente sensible y preciso de HT-Q-FISH, demuestran que la acumulación de progerina induce el acortamiento de los telómeros, así como un incremento en el porcentaje de telómeros cortos (Miller *et al.*, 2013), de forma similar a lo que sucede en nuestro modelo con la acumulación de prelamin A en las hMSC utilizando la misma tecnología.

Podemos atribuir como principales causas de la inestabilidad genómica que presentan las hMSC que acumulan prelamin A, a las alteraciones observadas a nivel de los telómeros, así como a los cambios en la morfología nuclear y al aumento en la sensibilidad en el daño al DNA en nuestro modelo, sumadas a la desorganización de la cromatina y la pérdida de focos de HP1 γ observados previamente por Ruiz de Eguino *et al.*, (2012) en el mismo modelo. Todos estos cambios generan una alteración del perfil de transcripción génica, que observamos fundamentalmente en categorías relacionadas con el estrés oxidativo y los procesos de oxidación reducción, así como con genes que se han relacionado directamente con el envejecimiento (Wang *et al.*, 2009). El estado oxidativo de las MSC interfiere con su equilibrio fisiológico y afecta su potencial de diferenciación (Bertolo *et al.*, 2017), de hecho, el estrés oxidativo ha demostrado ser un factor determinante en el envejecimiento de los tejidos (López-Otín *et al.*, 2013). Estudios recientes en muestras de pacientes han demostrado que los cambios en el perfil de transcripción génica en las células no solo dependen de la edad sino del tipo celular estudiado, sobre todo en genes relacionados con el ciclo celular, manteniendo las células madre derivadas de tejido adiposo un perfil de transcripción más estable que los fibroblastos durante el envejecimiento (Shan *et al.*, 2017). Ello implica que los mecanismos de regulación probablemente sean diferentes si comparamos las MSC con células diferenciadas de distintos tejidos. Esta misma observación la podemos realizar con respecto a la senescencia celular, dado que hay células como los miocitos, células de músculo esquelético o de riñón que no presentan un aumento en el porcentaje de senescencia en sus células con el envejecimiento fisiológico (Wang *et al.*, 2009). Y no sólo existe diferencia entre los distintos tipos celulares, sino que un mismo mecanismo es capaz de proteger al organismo ante determinados estímulos o dañarlo frente a otros. En el caso de la senescencia, ésta puede proteger al organismo del desarrollo tumoral, pero pasado cierto umbral de daño promoverá envejecimiento (López-Otín *et al.*, 2013). Estas observaciones cobran especial relevancia ante la premisa de que no todas las células responderán de la misma forma ante los mismos estímulos nocivos, lo cual es fundamental en el caso de las MSC, que son las encargadas de mantener la renovación celular de los diversos tejidos del organismo a los que dan origen. López-Otín *et al.*, (2013) plantean que el agotamiento de la reserva de células madre como marcador de integración, es el responsable directo final de los fenotipos observados durante el envejecimiento.

Debido a que nuestro modelo se basa en la acumulación de una forma inmadura de la proteína Lamin A y a que la pérdida de la eficiencia en la autofagia es inherente a los organismos envejecidos, planteamos la hipótesis de que la acumulación de prelamin A en las hMSC podría

obstaculizar este proceso necesario para el mantenimiento de la homeostasis celular. El incremento de la formación de autofagosomas observado sugiere un aumento de la autofagia en las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de privación de suero, como condición de estrés celular (Levin *et al.*, 2010). Sin embargo, teniendo en cuenta todos los fenotipos mostrados en el modelo experimental probablemente esta autofagia no sea eficaz, contribuyendo así al fenotipo de envejecimiento prematuro contemplado en las hMSC. Apuntalando este supuesto, la alteración en la autofagia que observamos en nuestro modelo es similar a la obtenida en algunos modelos murinos relacionados con *LMNA*: como los ratones con inactivación o delección (*knockout*) para el gen *LMNA* (que muestran cardiomiopatía dilatada y distrofia muscular) (Ramos *et al.*, 2012), y ratones deficientes para el gen *Zmpste24* (que presentan un fenotipo extremo de envejecimiento prematuro) (Mariño *et al.*, 2008). Ambos modelos murinos comparten con nuestro modelo experimental humano un aumento en los niveles de la proteína LC3-II, lo que sugiere que la formación de autofagosomas está aumentada, sin embargo, existen diferencias significativas en cuanto a la activación de la vía de mTOR y a p62. Hacemos referencia en el caso del modelo *Zmpste24*^{-/-} al hecho de que se ha demostrado un incremento del flujo de autofagia, siendo esta funcional (Mariño *et al.*, 2008), y en el caso del modelo de *Lmna*^{-/-} a que la vía de mTORC1 se encuentra regulada positivamente (Ramos *et al.*, 2012). En cambio, en nuestro modelo, en las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de estrés encontramos inicialmente una inhibición de la vía de mTOR que evaluamos a través de la disminución de su sustrato diana pS6, lo que implicaría una activación de la autofagia. Esto no se corresponde con el aumento de p62 observado en las hMSC en las mismas condiciones, en donde para que la autofagia fuera un mecanismo eficaz para la degradación proteica, el aumento de LC3-II observado debería acompañarse de la disminución de p62, por lo cual concluimos que aunque la autofagia parece estar aumentada en su estadio inicial, el flujo normal de este mecanismo se encuentra alterado. Estos resultados indican claramente que las alteraciones en la homeostasis de la proteína Lamin A, como las observadas en las laminopatías progeroides, inducen la alteración del proceso de autofagia, aunque las razones de las diferencias entre los fenotipos murinos relacionados con *LMNA* entre sí y con el modelo experimental humano de hMSC que acumulan prelamin A son desconocidas. Estas discrepancias podrían deberse a los distintos roles que desempeña la proteína Lamin A en las diferentes especies (destacando así la necesidad de contar con modelos experimentales humanos para el estudio de enfermedades humanas), así como entre diferentes tipos de células (miocardiocitos, células de músculo esquelético y hepatocitos en el caso de ratones *knockout*; y hMSC en el nuestro), incluso en los niveles de acumulación de prelamin A. En cuanto a nuestro modelo, la vía mTOR se inactiva en condiciones de acumulación de prelamin A y privación de suero. Con este resultado, se esperaría una inducción del proceso de autofagia en estas células, de manera similar a lo que ocurre cuando las células se tratan con rapamicina (un inhibidor de la vía de mTOR). De hecho, se ha descrito el vínculo entre la inhibición de la vía de mTOR por la rapamicina, la inducción de la autofagia y la

reversión del fenotipo envejecido en las células de HGPS (Cao *et al.*, 2011), así como en células de personas mayores sanas (Blagosklonny *et al.*, 2011). La reversión del fenotipo envejecido se ha atribuido a la reducción en los niveles de progerina en fibroblastos de pacientes con HGPS (Cao *et al.*, 2011; Cenni *et al.*, 2011) y prelamin A farnesilada en fibroblastos de pacientes centenarios (Lattanzi *et al.*, 2014) inducida por la rapamicina. Sin embargo, el proceso de autofagia en las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de privación de suero se ve afectado a pesar de la inhibición de la vía mTOR. Es necesaria la realización de más estudios con rapamicina y/u otras moléculas que interfieran con la vía mTOR para dilucidar estos resultados.

Además de la alteración en la autofagia, otros fenotipos, en cambio, fueron potenciados (por ejemplo la fosforilación de H2AX) o desvelados (como el aumento de los niveles de ROS, las alteraciones de la autofagia, los cambios en el perfil de expresión génica, el aumento de la expresión de Oct-1 y su represión funcional) en las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de estrés. Estos hechos implican que tanto la acumulación de prelamin A como la privación de suero actúan sinérgicamente para activar o reprimir distintas vías de señalización. Destacamos aquí el hecho de que prelamin A aumenta su expresión en condiciones de privación de suero en hMSC que previamente acumulaban prelamin A, aunque el mecanismo molecular que gobierna este efecto es desconocido. Sugerimos que este aumento de la acumulación de prelamin A podría ser el desencadenante de los fenotipos que observamos en condiciones de estrés. Por lo tanto, los niveles de acumulación de prelamin A estarían directamente relacionados con la gravedad de los fenotipos de envejecimiento prematuro que exhiben las células, tal como plantearon Miller *et al.*, (2013) mayores niveles de acumulación de progerina determinan un fenotipo más severo que se corresponde con enfermedades de inicio en fases tardías del envejecimiento. A su vez, McKenna *et al.*, han llevado a cabo un trabajo que apoya esta hipótesis, demostrando que la severidad de la dermatopatía restrictiva neonatal letal, en la que hay acumulación de prelamin A, se debe a la mayor expresión de prelamin A en comparación con los niveles de acumulación de progerina en los pacientes con HGPS (McKenna *et al.*, 2014). Dichos niveles de acumulación de prelamin A son muy superiores a los observados en nuestro modelo experimental de envejecimiento humano.

La relevancia de los fenotipos de envejecimiento exhibidos por las hMSC como consecuencia de la acumulación de prelamin A se demuestra en la marcada reducción de su funcionalidad *in vivo*. Después de trasplantar las células a los miembros isquémicos de los ratones, las hMSC que acumulan prelamin A no fueron capaces de ejercer un efecto beneficioso sobre los tejidos circundantes que les permitiera mantener dicho miembro, de forma similar a lo que ocurre con las hMSC derivadas de las iPSC de progeria (Zhang *et al.*, 2011). Esto podría deberse a que las hMSC que acumulan prelamin A podrían morir antes de tener la posibilidad de realizar cualquier acción o simplemente al hecho de que su homeostasis se encuentre tan comprometida que quede alguna manera las torne inertes. Estos resultados enfatizan claramente el efecto tóxico que produce la acumulación de prelamin A en la funcionalidad de las hMSC *in vivo*.

La disminución del potencial regenerativo de los tejidos mesenquimales es una característica del envejecimiento. Los resultados expuestos en esta tesis apoyan la hipótesis de la alteración de la homeostasis de las hMSC de individuos que sufren enfermedades de envejecimiento prematuro. Si bien es importante enfatizar que en contraste con lo que se observa en los síndromes progeroides, los tejidos afectados en los trastornos asociados al envejecimiento no son únicamente de origen mesenquimal, sino que también se originan en otros tejidos como el neuroectodermo (en el caso de enfermedades neurodegenerativas), existe una gran concordancia entre los tejidos mesenquimales afectados en trastornos asociados al envejecimiento fisiológico y los afectados en el envejecimiento prematuro en laminopatías (como consecuencia de la acumulación anómala de progerina o de prelamin A). De hecho, alteraciones como la lipoatrofia, la osteopenia, la cardiomiopatía y la aterosclerosis se detectan frecuentemente en personas de edad avanzada, así como en pacientes con síndromes de envejecimiento prematuro asociados con el gen *LMNA*, como la progeria o lipodistrofia ligada a *LMNA* (Pekovic *et al.*, 2008). Teniendo esto en consideración, proponemos que la acumulación de prelamin A en las hMSC contribuye al agotamiento de los depósitos o nichos de células madre, que es de hecho uno de los marcadores de integración del envejecimiento propuesto por López-Otín *et al.* (2013) y una de las causas subyacentes al proceso de envejecimiento. Debemos señalar aquí, que no hemos detectado la expresión de progerina en las hMSC que acumulan prelamin A ni en condiciones basales ni de privación de suero (datos no mostrados), lo que excluiría la posibilidad de que el fenotipo de envejecimiento prematuro observado en nuestro modelo sea debido a la acumulación de progerina.

7.2. ESTUDIO DE MECANISMOS MOLECULARES: IDENTIFICACIÓN DE OCT-1 COMO FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN QUE INTERVIENE EN LA REGULACIÓN DEL ENVEJECIMIENTO HUMANO EN LAS MSC.

El modelo experimental humano de envejecimiento generado nos ha permitido identificar el papel fundamental de Oct-1 en la homeostasis de las hMSC, desconocida hasta el momento. Oct-1 es un factor de transcripción octamérico que pertenece a la familia de dominios bien conservados POU (Ryan *et al.*, 1997; Herr *et al.*, 1998), denominado también POU2F1, se expresa ubicuamente (Sturm *et al.*, 1998) y posee funciones de regulación tanto positiva como de represión en distintas rutas metabólicas. Está implicado en diversos procesos biológicos tales como la regulación de la expresión de genes de mantenimiento (Sive *et al.*, 1986), la respuesta inmunitaria (Matthias *et al.*, 1998) y el desarrollo embrionario donde el ratón con un alelo deficitario para Oct-1 muere en a mitad de la gestación (Wang *et al.*, 2004) y la delección de la línea germinal Oct-1 tiene como resultado una letalidad embrionaria temprana debido a defectos en linajes extra-embriónicos, en particular las células madre de trofoblasto (Sebastiano *et al.*,

2010). Además, Maddox *et al.* (2012) establecieron que Oct-1 regula cuatro dianas asociadas con el fenotipo de células madre cancerígenas (entre ellas los niveles de CD22/CD44, la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) y la frecuencia de la iniciación de tumores en diversos tipos celulares humanos y murinos), sugiriendo que Oct-1 regula la función de proliferación de las células madre cancerígenas. Dalvai *et al.*, (2010) observaron en MEF que el inhibidor del ciclo celular p27kip-1 está directamente regulado por Oct-1, el cual parece desempeñar una función crítica en la detención del ciclo celular por intermedio de la regulación positiva de p27.

Oct-1 es considerado un sensor de estrés celular, Tantin *et al.* (2005) han propuesto que Oct-1 regula genes esenciales en la respuesta celular al estrés, ya que los fibroblastos de ratón deficientes en Oct-1 son más susceptibles al estrés oxidativo. Asimismo, se ha descrito la asociación de Oct-1 con la lámina nuclear a través de una interacción con Lamin B1, que regula la expresión de genes asociados con el envejecimiento y el estrés oxidativo en fibroblastos humanos y de ratón (Imai *et al.*, 1997; Malhas *et al.*, 2009). Sin embargo, se desconoce la función que desarrolla Oct-1 en las células madre mesenquimales adultas.

En nuestro caso el modelo experimental de envejecimiento humano nos ha permitido profundizar en los mecanismos involucrados en el envejecimiento de las hMSC y nos ha conducido a la identificación de la reducción de la actividad transcripcional de Oct-1 en el proceso de envejecimiento asociado a la acumulación de prelamin A en las hMSC. Más aún, los ensayos de silenciamiento confirmaron la participación de Oct-1 en la regulación del mecanismo molecular subyacente al fenotipo de envejecimiento prematuro de las hMSC, como la desregulación del proceso de autofagia en condiciones de privación de suero. A pesar de que las hMSC silenciadas para Oct-1 mostraron un incremento en la autofagia, este fenotipo no fue idéntico al observado previamente en las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de privación de suero. Este hecho podría atribuirse a múltiples factores, entre ellos: a los diferentes niveles de represión de Oct-1 en estos dos casos, o con mayor probabilidad a que la acumulación de prelamin A en hMSC en condiciones de estrés altere otros factores de transcripción y/o vías de señalización que se podrían encontrar intactas en las hMSC silenciadas para Oct-1. Por ejemplo, Lattanzi *et al.* (2007) señalan que prelamin A desempeña un rol fundamental en la dinámica de la cromatina, a través de su capacidad para unirse a HP1 γ , LAP2 α y BAF en fibroblastos humanos, participando de esta manera en la regulación de la transcripción génica a través de las alteraciones estructurales de la cromatina. Alteraciones estructurales de la cromatina que habíamos observado previamente en nuestro laboratorio en las hMSC como consecuencia de la acumulación de prelamin A (mediante microscopía electrónica), asociadas a la pérdida de focos de HP1 γ , indicando des-compactación de regiones de la cromatina en dichas células (Ruiz de Eguino *et al.*, 2012). Capanni *et al.* (2005), Heessen *et al.* (2007) y Camozzi *et al.* (2014) destacan el concepto de la lámina nuclear como una puerta que puede ser abierta para permitir la entrada al núcleo celular de los factores de transcripción o bien constituir un lugar de anclaje para estos reguladores transcripcionales.

A pesar de observar una disminución en la actividad transcripcional de Oct-1 en nuestro modelo, cabe destacar que las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de privación de suero mostraron una expresión aumentada de Oct-1 con distribución predominantemente nuclear, coincidiendo con el aumento de los niveles de acumulación de prelamin A. Previamente a nuestros resultados, Columbaro *et al.* (2013) demostraron una relación entre el reclutamiento anómalo de Oct-1 desde el citosol a la periferia nuclear, simultáneamente a la acumulación de Lamin B1 en la lámina nuclear en el tejido muscular esquelético y en fibroblastos de pacientes con adrenoleucodistrofia autosómica dominante de inicio tardío en el adulto (ADLD1), destacando que la alteración de la traslocación de Oct-1 al núcleo celular puede tener efectos pleiotrópicos, con diverso significado patológico dependiendo de cada tejido. Posteriormente, confirmando nuestros resultados, Cenni *et al.* (2014) demuestran que el reclutamiento de Oct-1 en la envoltura nuclear de fibroblastos de paciente con Displasia Mandibulo Acral (MADA) o dermatopatía restrictiva (RD) no está asociado a la acumulación de lamin B1, sino que es prelamin A quien está secuestrando a Oct-1 en estas enfermedades asociadas a LMNA. Aunque en lo concerniente a prelamin A la mayoría de los mecanismos propuestos para explicar su rol funcional recaen directamente en sus efectos sobre la alteración de la cromatina (Maraldi *et al.*, 2007), en nuestro modelo experimental hemos observado una interacción directa entre la acumulación de prelamin A y Oct-1 en condiciones de estrés en el ensayo de PLA, lo que nos lleva a pensar en un mecanismo directo por el cual la acumulación de prelamin A retendría a Oct-1 en la lámina nuclear impidiéndole ejercer su función en la regulación de la transcripción génica. Hipótesis que se ve reforzada por observaciones previas del secuestro del factor de transcripción Sp1 (con la consiguiente alteración de su capacidad transcripcional) en adipocitos derivados de hMSC que acumulan prelamin A (Ruiz de Eguino *et al.*, 2012), así como por el reciente estudio de Kubben *et al.*, (2016) donde demuestran que la acumulación de progerina altera la actividad transcripcional NRF2, secuestrándolo a nivel nuclear y generando como consecuencia aumento del estrés oxidativo crónico, capaz de recapitular los fenotipos relacionados al envejecimiento que se observa en los pacientes con progeria.

El estrés tanto oxidativo como el inducido por la privación de suero producen una disminución en los niveles de *ZMPSTE24* en las células musculares lisas vasculares (Ragnauth *et al.*, 2010), y en células renales de ratón (Imai *et al.*, 2015), por lo que la disminución de los niveles de *ZMPSTE24* se plantea como una característica de las células envejecidas (Ukekawa *et al.*, 2007). Lattanzi *et al.* (2014) demuestran la acumulación de prelamin A debida a una disminución en los niveles de expresión de *ZMPSTE24* en fibroblastos de pacientes centenarios (considerados como tal aquellos que tienen de 95 a 105 años de edad). Afonso *et al.*, (2016) plantean que la acumulación persistente de prelamin A se asocia con una regulación negativa y por tanto disminución de los niveles de *ZMPSTE24* en fibroblastos de pacientes con mutaciones de LMNA, así como en células mononucleares de pacientes con VIH en tratamiento crónico con IP y en VSMC. Coincidiendo con estos estudios, en nuestro modelo las hMSC que acumulan prelamin A

presentan una disminución de los niveles de mRNA de *ZMPSTE24* cuando se someten a condiciones de privación de suero, lo cual podría justificar por sí mismo el incremento en la acumulación de prelamin A observado en dicha condición. Sin embargo, al examinar los niveles de expresión de la proteína *ZMPSTE24* en las hMSC en condiciones de estrés observamos que no disminuye, como esperaríamos de acuerdo con el aumento en la acumulación de su sustrato enzimático, la proteína prelamin A en estas condiciones. Ninguno de los autores citados anteriormente (Ukekawa *et al.*, 2007; Ragnauth *et al.*, 2010; Lattanzi *et al.*, 2014; Imai *et al.*, 2015 y Afonso *et al.*, 2016) evalúan los niveles de expresión de la proteína *ZMPSTE24* en condiciones de privación de suero como condición de estrés celular, así como tampoco han utilizado el mismo tipo celular (hMSC) que en nuestro modelo, por lo que no podemos comparar estos resultados. El único trabajo que muestra la disminución de la expresión de la proteína *ZMPSTE24* utiliza como condición de estrés el tratamiento de las VSMC con peróxido de hidrógeno (Ragnauth *et al.*, 2010). De acuerdo con Dalvai *et al.*, (2010) el factor de transcripción Oct-1, que interviene en la regulación de *ZMPSTE24* según proponemos en nuestro modelo, no responde de la misma forma ante los distintos estímulos de estrés (observando por ejemplo que los MEF deficientes en Oct-1 son resistentes y proliferan más en condiciones de privación de glucosa, mientras que son sensibles a las condiciones de estrés con peróxido de hidrógeno), por lo que la privación de suero podría estar generando una respuesta diferente de Oct-1 a la que podría tener cuando se utiliza peróxido de hidrogeno (Ragnauth *et al.*, 2010). Aun así, es un resultado intrigante al que podemos atribuir al menos dos hipótesis, por un lado, que la acumulación de prelamin A que se observa en estas condiciones esté alterando los mecanismos de degradación de *ZMPSTE24*, debido a que como demostramos previamente la autofagia que presentan las células en estas condiciones no funciona de forma eficiente. Otra posibilidad que explique la discordancia observada entre los niveles de RNA y proteína, sería que el aumento de los niveles de proteína *ZMPSTE24* que se observa en las hMSC en condiciones de estrés pueda deberse a alteraciones en la regulación post-traducciona l de la misma. Como ejemplo de regulación post-traducciona l, Yu *et al.*, (2013) han demostrado que existe un mecanismo mediado por el miRNA de la familia 141, miR-141-3p, el cual tiene una expresión aumentada durante la senescencia celular como consecuencia de cambios epigenéticos y que es capaz de disminuir los niveles de expresión de *ZMPSTE24*, uniéndose directamente a los extremos 3'UTR de los transcritos de *ZMPSTE24*, determinando un aumento de los niveles de prelamin A en las hMSC senescentes. Independientemente de estas posibilidades, el aumento de los niveles de proteína *ZMPSTE24* en las hMSC que acumulan prelamin A en condiciones de estrés, presentaría una disminución de su actividad enzimática, como sugiere el aumento de prelamin A. De hecho, Lattanzi *et al.* (2014), aun observando una disminución en los niveles de *ZMPSTE24* a nivel del RNA y aumento de prelamin A (no analizaron los niveles de la proteína *ZMPSTE24*), en fibroblastos de individuos centenarios, plantea que este aumento de prelamin A pueda deberse al menos en parte a una disminución de la actividad enzimática de *ZMPSTE24*. Ninguna de estas posibilidades es

mutuamente excluyente, dada la relevancia que tiene *ZMPSTE24* en el proceso de envejecimiento es probable que la regulación de su proteína se produzca a varios niveles, siendo el resultado de múltiples factores.

Por otra parte, dado que Oct-1 es un sensor de estrés celular (Tantin *et al.*, 2005) y que *ZMPSTE24* está regulado por el estrés oxidativo (Ragnauth *et al.*, 2010; Imai *et al.*, 2015), nos planteamos si Oct-1 podría participar activamente en el procesamiento de prelamin A en hMSC en condiciones de estrés, mediante la regulación de la expresión de *ZMPSTE24*. Efectivamente las hMSC silenciadas para Oct-1 en condiciones de estrés, mostraron una disminución en los niveles de expresión de *ZMPSTE24*, tanto a nivel de RNA como de proteína, lo que sugiere que Oct-1 podría estar regulando al menos en parte a *ZMPSTE24*, bien sea de manera directa (hipótesis apoyada mediante la realización de un análisis *in silico* que nos ha permitido identificar en el promotor del gen *ZMPSTE24* potenciales sitios de unión para Oct-1), o bien de forma indirecta y por tanto incrementar los niveles de prelamin A. De hecho, observamos un aumento en la acumulación de prelamin A en las hMSC silenciadas para Oct-1 sometidas a condiciones de estrés, lo cual es concordante con la observación de la disminución de los niveles de expresión de *ZMPSTE24* en estas condiciones. Todo ello señala un papel regulador de Oct-1 en el procesamiento de prelamin A y ratifica el rol fundamental de este factor de transcripción en el proceso de envejecimiento humano.

7.3. CONSIDERACIONES FINALES

En el presente trabajo hemos demostrado que la acumulación de prelamin A en hMSC induce un fenotipo de envejecimiento prematuro que en última instancia, resulta en una clara disminución de su capacidad funcional *in vivo*. En este modelo experimental humano de envejecimiento el fenotipo envejecido se exagera notablemente cuando la acumulación de prelamin A se combina con una condición de estrés, como se ha observado en el aumento del daño al DNA, la alteración de la autofagia, los cambios significativos en el perfil de expresión génica y actividad alterada del factor de transcripción Oct-1. Estos resultados no son idénticos a los observados en los modelos basados en la expresión de progerina en los que la mera presencia de progerina en los niveles encontrados en pacientes es suficiente para proporcionar los fenotipos severos observados en ausencia de condiciones de estrés. Estos hechos son consistentes con la diferente severidad de los fenotipos observados en las lipodistrofias ligadas a *LMNA* (con fenotipos de envejecimiento más leves similares al envejecimiento fisiológico) y en pacientes con progeria (con fenotipo de envejecimiento prematuro severo), lo que refuerza el valor de nuestro modelo para el estudio del envejecimiento que consideramos similar al fisiológico. Creemos que es importante que se generen modelos experimentales humanos específicos para los diversos grados de envejecimiento, de forma que se pueda obtener una caracterización lo más completa posible del proceso de envejecimiento humano.

Finalmente, el potencial de este modelo experimental humano ha sido demostrado mediante la identificación del papel crucial del factor de transcripción Oct-1 en el envejecimiento de las hMSC, una función desconocida hasta el momento. A continuación, mostramos un esquema que resumiría el modelo de acción propuesto (Figura 66).

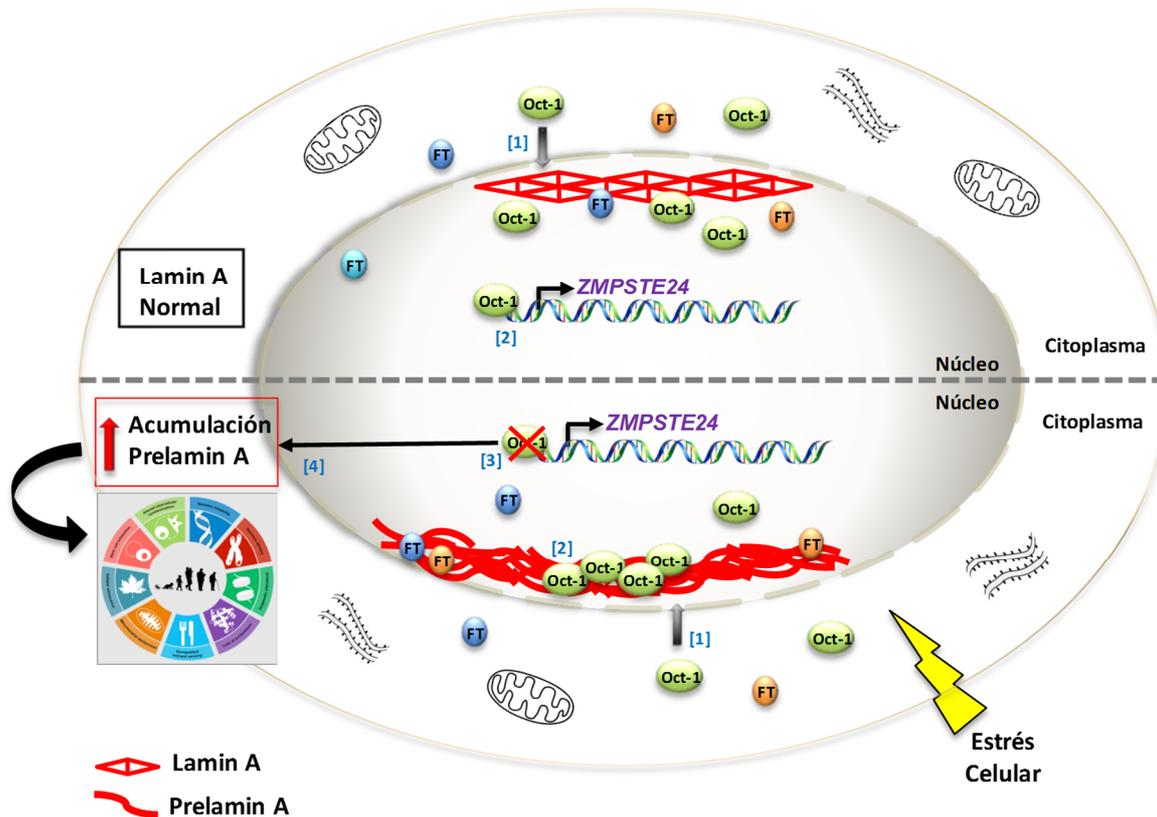


Figura 66. Mecanismo molecular propuesto en el modelo experimental de envejecimiento humano basado en hMSC que acumulan prelamin A. En hMSC en **condiciones basales** (mitad superior de la Figura). [1] la conformación normal de la lámina nuclear permite el paso de moléculas y factores de transcripción (FT) a través de su organizada red de filamentos; [2] esto posibilita que los factores de transcripción interactúen normalmente con sus moléculas diana y activen o repriman la transcripción génica. En hMSC que acumulan prelamin A en **condiciones de estrés** (mitad inferior de la Figura). [1] La conformación anormal de la lámina nuclear debida a la acumulación de prelamin A, genera un entramado que atrapa entre otros, al factor de transcripción Oct-1. [2] La acumulación de prelamin A genera el secuestro de las moléculas de Oct-1 (y otros FT) que quedan retenidas en la lámina nuclear, impidiéndoles realizar su función; [3] Oct-1 no es capaz de activar la transcripción génica de *ZMPSTE24* por lo que disminuye su expresión, además de alterar la expresión de otros genes implicados en el proceso de envejecimiento. [4] como consecuencia, se altera el procesamiento de la proteína lamin A, aumentando su forma inmadura prelamin A, lo que determina la generación de los fenotipos de envejecimiento que observamos en nuestro modelo (representados en este modelo mediante el esquema de la rueda de marcadores de envejecimiento perteneciente al artículo de López-Otín *et al.*, 2013).

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes conclusiones:

1. Las hMSC que acumulan prelamin A recapitulan fenotipos esenciales del envejecimiento humano constituyendo un modelo *in vitro* fidedigno para el estudio de este proceso. En concreto, la acumulación de prelamin A promueve el acortamiento de los telómeros además de un incremento de la inestabilidad genómica y de la senescencia en células madre mesenquimales humanas.
2. Las condiciones de estrés inducen una mayor acumulación del precursor prelamin A en las hMSC y un aumento en la severidad de los fenotipos de envejecimiento. Dicho fenotipo exacerbado se caracteriza por una menor supervivencia y un incremento de la inestabilidad genómica, de los niveles de producción de ROS y de la senescencia, además de la alteración del proceso de autofagia y del perfil de transcripción génica.
3. La acumulación de prelamin A reduce drásticamente el potencial funcional de las hMSC *in vivo*.
4. En condiciones de estrés el precursor acumulado, prelamin A, interacciona con el factor de transcripción Oct-1 alterando su actividad transcripcional en hMSC.
5. Oct-1 tiene una función relevante en el envejecimiento humano en MSC, regulando la senescencia celular y la autofagia.
6. En hMSC el factor de transcripción Oct-1 regula la expresión de la proteína *ZMPSTE24*, esencial en el procesamiento de la prelamin A.
7. Finalmente podemos concluir que como consecuencia de la acumulación de prelamin A en hMSC se genera un ciclo de retroalimentación positiva que involucra tres participantes fundamentales. La acumulación de prelamin A determina un secuestro de Oct-1 a nivel de la lámina nuclear que impide el normal desarrollo de sus funciones y disminuye la expresión de *ZMPSTE24*, lo que induce a su vez un mayor incremento en la acumulación de prelamin A.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, Athineos D, Kang T-W, Lasitschka F, Andrulis M, Pascual G, Morris KJ, Khan S, Jin H, Dharmalingam G, Snijders AP, Carroll T, Capper D, Pritchard C, Inman GJ, Longerich T, Sansom OJ, Benitah SA, Zender L, Gil J. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol.* 2013; 15:978-990.
- Afonso P, Auclair M, Boccarda F, Vantyghem MC, Katlama C, Capeau J, Vigouroux C, Caron-Debarle M. LMNA mutations resulting in lipodystrophy and HIV protease inhibitors trigger vascular smooth muscle cell senescence and calcification: Role of ZMPSTE24 downregulation. *Atherosclerosis.* 2016; 245:200-11.
- Agarwal AK, Fryns JP, Auchus RJ, Garg A. Zinc metalloproteinase, ZMPSTE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Hum Mol Genet.* 2003; 12(16):1995-2001.
- Ahmad Z, Zackai E, Medne L, Garg A. Early Onset Mandibuloacral Dysplasia due to Compound Heterozygous Mutations in ZMPSTE24. *American journal of medical genetics Part A.* 2010; 152A(11):2703-2710.
- Al-Shahrour F, Díaz-Uriarte R, Dopazo J. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics.* 2004; 20(4):578-80.
- Albi U, Cohn J, Buhle L, Gerace L. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate type filaments. *Nature.* 1986; 323:560-564.
- Andres V & Gonzalez JM. Role of A-type lamins in signaling, transcription and chromatin organization. *J Cell Biol.* 2009; 187:945-57.
- Beck LA, Hosick TJ, Sinensky M. Isoprenylation is required for the processing of the lamin A precursor. *J Cell Biol.* 1990; 110:1489-99.
- Behrens A, van Deursen JM, Rudolph KL, Schumacher B. Impact of genomic damage and ageing on stem cell function. *Nat. Cell Biol.* 2014; 16:201-207.
- Benavides F & Guénet JL. Murine Models for human diseases. *Medicina.* 2001; 61(2):215-31.
- Bergamini E. Autophagy: a cell repair mechanism that retards ageing and age-associated diseases and can be intensified pharmacologically. *Mol Aspects Med.* 2006; 27:403-410.
- Bergo MO, Gavino B, Ross J, Schmidt WK, Hong C, Kendall LV, Mohr A, Meta M, Genant H, Jiang Y, Wisner ER, Van Bruggen N, Carano RAD, Michaelis S, Griffey SM, Young SG. Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(20):13049-54.
- Bertolo A, Capossela S, Fränkl G, Baur M, Pötzel T, Stoyanov J. Oxidative status predicts quality in human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy.* 2017; 8:1-13.
- Biamonti G, Giacca M, Perini G, Contreas G, Zentilin L, Weighardt F, Guerra M, Della Valle G, Saccone S, Riva S. The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol Cell Biol.* 1992; 12(8):3499-506.
- Bidault G, Vatier C, Capeau J, Vigouroux C, Béréziat V. LMNA-linked lipodystrophies: from altered fat distribution to cellular alterations. *Biochem Soc Trans.* 2011; 39(6):1752-7.
- Blagosklonny MV. Progeria, rapamycin and normal aging: recent breakthrough. *Ageing (Albany NY).* 2011; 3:685-691.
- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, De Pinho RA, Greider CW. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell.* 1997; 91:25-34.
- Boonekamp JJ, Simons MJ, Hemerik L, Verhulst S. Telomere length behaves as biomarker of somatic redundancy rather than biological age. *Ageing Cell.* 2013; 12:330-332.
- Broers JL, Ramaekers FC, Bonne G, Yaou RB, Hutchison CJ. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev.* 2006; 86(3):967-1008.
- Burke B & Stewart CL. The nuclear lamins: flexibility in function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013; 14:13-24.
- Burtner CR & Kennedy BK. Progeria syndromes and ageing: what is the connection? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11: 567-78.
- Camozzi D, Capanni C, Cenni V, Mattioli E, Columbaro M, Squarzone S, Lattanzi G. Diverse lamin-dependent mechanisms interact to control chromatin dynamics. Focus on laminopathies. *Nucleus.* 2014; 5:427-440.

- Campisi J & d'Adda di Fagnana F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8:729–740.
- Canela A, Vera E, Klatt P, Blasco MA. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:5300-5305.
- Cao H & Hegele RA. LMNA is mutated in Hutchinson-Gilford progeria (MIM 176670) but not in Wiedemann-Rautenstrauch progeroid syndrome (MIM 264090). *J. Hum. Genet.* 2003; 48:271-274.
- Cao K, Blair CD, Faddah DA, Kieckhaefer JE, Olive M, Erdos MR, Nabel EG, Collins FS. Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. *J Clin Invest.* 2011; 121:2833-2844.
- Cao K, Capell BC, Erdos MR, Djabali K, Collins FS. A lamin A protein isoform overexpressed in Hutchinson-Gilford progeria syndrome interferes with mitosis in progeria and normal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(12):4949-54.
- Cao K, Graziotto JJ, Blair CD, Mazzulli JR, Erdos MR, Krainc D, Collins FS. Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells. *Sci Transl Med.* 2011; 3:89ra58.
- Capanni C, Cenni V, Mattioli E, Sabatelli P, Ognibene A, Columbaro M, Parnaik VK, Wehnert M, Maraldi NM, Squarzoni S, Lattanzi G. Failure of lamin A/C to functionally assemble in R482L mutated familial partial lipodystrophy fibroblasts: Altered intermolecular interaction with emerin and implications for gene transcription. *Exp Cell Res.* 2003; 291:122–134.
- Capanni C, Mattioli E, Columbaro M, Lucarelli E, Parnaik VK, Novelli G, Wehnert M, Cenni V, Maraldi NM, Squarzoni S, Lattanzi G. Altered prelamin A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy. *Hum Mol Genet.* 2005; 14:1489-1502.
- Capanni C, Squarzoni S, Cenni V, D'Apice MR, Gambineri A, Novelli G, Wehnert M, Pascuali R, Maraldi NM, Lattanzi G. Familial partial lipodystrophy, mandibuloacral dysplasia and restrictive dermopathy feature barrier-to-autointegration factor (BAF) nuclear redistribution. *Cell Cycle.* 2012; 11(19):3568-77.
- Capeau J, Magré J, Caron-Debarle M, Lagathu C, Antoine B, Béréziat V, Lascols O, Bastard JP, Vigouroux C. Human lipodystrophies: genetic and acquired diseases of adipose tissue. *Endocr Dev.* 2010; 19:1-20.
- Capell BC & Collins FS. Human laminopathies: Nuclei gone genetically awry. *Nat Rev Genet.* 2006; 7:940-952.
- Capell BC, Olive M, Erdos MR, Cao K, Faddah DA, Tavarez UL, Conneely KN, Qu X, San H, Ganesh SK, Chen X, Avallone H, Kolodgie FD, Virmani R, Nabel EG, Collins FS. A farnesyltransferase inhibitor prevents both the onset and late progression of cardiovascular disease in a progeria mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:15902–15907.
- Caron M, Auclair M, Donadille B, Béréziat V, Guerci B, Laville M, Narbonne H, Bodemer C, Lascols O, Capeau J, Vigouroux C. Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death Differ.* 2007; 14:1759-1767.
- Caron M, Auclair M, Sterlingot H, Kornprobst M, Capeau J. Some HIV protease inhibitors alter lamin A/C maturation and stability, SREBP-1 nuclear localization and adipocyte differentiation. *AIDS.* 2003; 17:2437-44.
- Caron-Debarle M, Lagathu C, Boccara F, Vigouroux C, Capeau J. HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging. *Trends Mol Med.* 2010; 16(5):218-29.
- Carrero D, Soria-Valles C, López-Otín C. Hallmarks of progeroid syndromes: lessons from mice and reprogrammed cells. *Dis Model Mech.* 2016; 9(7):719-35.
- Cenni V, Capanni C, Columbaro M, Ortolani M, D'Apice MR, Novelli G, Fini M, Marmiroli S, Scarano E, Maraldi NM, Squarzoni S, Prencipe S, Lattanzi G. Autophagic degradation of farnesylated prelamin A as a therapeutic approach to lamin- linked progeria. *Eur J Histochem.* 2011; 55:e36.
- Cenni V, Capanni C, Mattioli E, Columbaro M, Wehnert M, Ortolani M, Fini M, Novelli G, Bertacchini J, Maraldi NM, Marmiroli S, D'Apice MR, Prencipe S, Squarzoni, Lattanzi G.

- Rapamycin treatment of Mandibuloacral Dysplasia cells rescues localization of chromatin-associated proteins and cell cycle dynamics. *Aging (Albany NY)*. 2014; 6(9):755-769.
- Chamcheu JC, Pihl-Lundin I, Mouyobo CE, Gester T, Virtanen M, Moustakas A, Navsaria H, Vahlquist A, Törmä H. Immortalized keratinocytes derived from patients with epidermolytic ichthyosis reproduce the disease phenotype: A useful in vitro model for testing new treatments. *Br J Dermatol*. 2011; 164:263–272.
- Chandra T, Ewels PA, Schoenfelder S, Furlan-Magaril M, Wingett SW, Kirschner K, Thuret JY, Andrews S, Fraser P, Reik W. Global reorganization of the nuclear landscape in senescent cells. *Cell Rep*. 2015; 10, 471-483.
- Chen D, Misra A, Garg A. Clinical review 153: Lipodystrophy in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87(11):4845-56.
- Clarke S. Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu. Rev. Biochem*. 1992; 61:355-386.
- Coffinier C, Hudon SE, Farber EA, Chang SY, Hrycyna CA, Young SG, Fong LG. HIV protease inhibitors block the zinc metalloproteinase ZMPSTE24 and lead to an accumulation of prelamin A in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(33):13432-7.
- Coffinier C, Jung HJ, Li Z, Nobumori C, Yun UJ, Farber EA, Davies BS, Weinstein MM, Yang SH, Lammerding J, Farahani JN, Bentolila LA, Fong LG, Young SG. Direct synthesis of lamin A, bypassing prelamin A processing, causes misshapen nuclei in fibroblasts but no detectable pathology in mice. *J Biol Chem*. 2010; 285(27):20818-26.
- Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*. 2007; 130:223-233.
- Columbaro M, Capanni C, Mattioli E, Novelli G, Parnaik VK, Squarzoni S, Maraldi NM, Lattanzi G. Rescue of heterochromatin organization in Hutchinson-Gilford progeria by drug treatment. *Cell Mol Life Sci*. 2005; 62:2669-2678.
- Columbaro M, Mattioli E, Maraldi NM, Ortolani M, Gasparini L, D'Apice MR, Postorivo D, Nardone AM, Avnet S, Cortelli P, Liguori R, Lattanzi G. Oct-1 recruitment to the nuclear envelope in adult-onset autosomal dominant leukodystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1832:411-420.
- Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*. 2005; 433:760-764.
- Constantinescu D, Gray HL, Sammak PJ, Schatten GP, Csoka AB. Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells*. 2006; 24(1):177-85.
- Corrigan DP, Kuszczak D, Rusinol AE, Thewke DP, Hrycyna CA, Michaelis S, Sinensky MS. Prelamin A endoproteolytic processing in vitro by recombinant *Zmpste24*. *Biochem J*. 2005; 387:129-138.
- Coste I, Le Corf K, Kfoury A, Hmitou I, Druillennec S, Hainaut P, Eychene A, Lebecque S, Renno T. Dual function of MyD88 in RAS signaling and inflammation, leading to mouse and human cell transformation. *J Clin Invest*. 2010; 120:3663-3667.
- Cowdry EV. Problems of ageing: biological and medical aspects, 2nd ed, *Williams & Wilkins, Baltimore*. 1942.
- Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Drogen W, French M, Terman A. Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy*. 2005; 1:131-140.
- Cuervo AM. Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends Genet*. 2008; 24:604-612.
- Dai Q, Choy E, Chiu V, Romano J, Slivka SR, Steitz SA, Michaelis S, Philips MR. Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1998; 273(24):15030-4.
- Dalvai M, Schubart K, Besson A, Matthias P. Oct1 is required for mTOR-induced G1 cell cycle arrest via the control of p27Kip1 expression. *Cell Cycle*. 2010; 9(19):3933-3944.
- Davies BS, Barnes RH 2nd, Tu Y, Ren S, Andres DA, Spielmann HP, Lammerding J, Wang Y, Young SG, Fong LG. An accumulation of non-farnesylated prelamin A causes cardiomyopathy but not progeria. *Hum Mol Genet*. 2010; 19(13):2682-94.

- De la Rosa J, Freije JM, Cabanillas R, Osorio FG, Fraga MF, Fernández-García MS, Rad R, Fanjul V, Ugalde AP, Liang Q, Prosser HM, Bradley A, Cardíñanos J, López-Otín C. Prelamin A causes progeria through cell-extrinsic mechanisms and prevents cancer invasion. *Nat. Commun.* 2013; 4:2268.
- De Magalhães JP, Curado J, Church GM. Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics.* 2009; 25:875–881.
- De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M, Lévy N. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science.* 2003; 300:2055.
- Dechat T, Adam SA, Taimen P, Shimi T, Goldman RD. Nuclear Lamins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(11):a000547.
- Dechat T, Pfliegerhaer K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L, Goldman RD. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev.* 2008; 22(7):832-53.
- Dechat T, Shimi T, Adam SA, Rusinol AE, Andres DA, Spielmann HP, Sinensky MS, Goldman RD. Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(12):4955-4960.
- Delbarre E, Tramier M, Coppey-Moisán M, Gaillard C, Courvalin JC, Buendía B. The truncated prelamin A in Hutchinson-Gilford progeria syndrome alters segregation of A-type and B-type lamin homopolymers. *Hum Mol Genet.* 2006; 15(7):1113-22.
- Dennis G J, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 2003; 4(5):P3.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92:9363-9367.
- Du P, Kibbe WA, Lin SM. Lumi: A pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinformatics.* 2008; 24:1547-1548.
- Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, Dutra A, Pak E, Durkin S, Csoka AB, Boehnke M, Glover TW, Collins FS. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature.* 2003; 423(6937):293-8.
- Espada J, Varela I, Flores I, Ugalde AP, Cadiñanos J, Pendás AM, Stewart CL, Tryggvason K, Blasco MA, Freije JM, López-Otín C. Nuclear envelope defects cause stem cell dysfunction in premature-aging mice. *J Cell Biol.* 2008; 181(1):27-35.
- Filesi I, Gullotta F, Lattanzi G, D'Apice MR, Capanni C, Nardone AM, Columbaro M, Scarano G, Mattioli E, Sabatelli P, Maraldi NM, Biocca S, Novelli G. Alterations of nuclear envelope and chromatin organization in mandibuloacral dysplasia, a rare form of laminopathy. *Physiol Genomics.* 2005; 23(2):150-8.
- Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev.* 2002; 16:1472-1487.
- Flexner C. HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med.* 1998; 338:1281-1292.
- Flores I, Cayuela ML, Blasco MA. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science.* 2005; e309:1253-1256.
- Fong LG, Frost D, Meta M, Qiao X, Yang SH, Coffinier C, Young SG. A protein farnesyltransferase inhibitor ameliorates disease in a mouse model of progeria. *Science.* 2006; 311(5767):1621-3.
- Fong LG, Ng JK, Meta M, Coté N, Yang SH, Stewart CL, Sullivan T, Burghardt A, Majumdar S, Reue K, Bergo MO, Youn SG. Heterozygosity for Lmna deficiency eliminates the progeria-like phenotypes in Zmpste24-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(52):18111-6.
- Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy lifespan from yeast to humans. *Science.* 2010; 328:321-326.
- Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J, Olsson C, Pietras K, Gústafsdóttir SM, Ostman A, Landegren U. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat Biotechnol.* 2002; 20:473-77.

- Freije JM, Blay P, Pendas AM, Cadinanos J, Crespo P, Lopez-Otin C. Identification and chromosomal location of two human genes encoding enzymes potentially involved in proteolytic maturation of farnesylated proteins. *Genomics*. 1999; 58: 270-280.
- Fumagalli M, Rossiello F, Clerici M, Barozzi S, Cittaro D, Kaplunov JM, Bucci G, Dobrev M, Matti V, Beausejour CM, Herbig U, Longhese MP, d'Adda di Fagagna F. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat. Cell Biol.* 2012; 14:355-365.
- Garg A. Acquired and Inherited Lipodystrophies. *N Engl J Med.* 2004; 350:1220-34.
- Garg A. Clinical review: Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(11):3313-25.
- Garg A, Subramanyam L, Agarwal AK, Simha V, Levine B, D'Apice MR, Novelli G, Crow Y. Atypical Progeroid Syndrome due to Heterozygous Missense LMNA Mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(12):4971-83.
- Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, Gruenbaum Y, Khuon S, Mendez M, varga R, Collins FS. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(24):8963-8.
- González JM, Navarro-Puche A, Casar B, Crespo P, Andrés V. Fast regulation of AP-1 activity through interaction of lamin A/C, ERK1/2, and c-Fos at the nuclear envelope. *J Cell Biol.* 2008; 183(4):653-66.
- Gonzalez-Suarez I, Redwood AB, Perkins SM, Vermolen B, Lichtensztejn D, Grotzky DA, Morgado-Palacin L, Gapud EJ, Sleckman BP, Sullivan T, Sage J, Stewart CL, Mai S, Gonzalo S. Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway. *The EMBO journal.* 2009; 28(16):2414-2427.
- Gordon LB, Brown WT, Collins FS. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, *et al.*, eds. *GeneReviews*[®] [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2003; 1993-2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1121>
- Gordon LB, Kleinman ME, Massaro J, D'Agostino RB Sr, Shappell H, Gerhard-Herman M, Smoot LB, Gordon CM, Cleveland RH, Nazarian A, Snyder BD, Ullrich NJ, Silvera VM, Liang MG, Quinn N, Miller DT, Huh SY, Downton AA, Littlefield K, Greer MM, Kieran MW. Clinical Trial of the Protein Farnesylation Inhibitors Lonafarnib, Pravastatin, and Zoledronic Acid in Children With Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Circulation.* 2016; 134:114-125.
- Gordon LB, Kleinman ME, Miller DT, Neuberger DS, Giobbie-Hurder A, Gerhard-Herman M, Smoot LB, Gordon CM, Cleveland R, Snyder BD, Flogor B, Bishop WR, Statkevich P, Regen A, Sonis A, Riley S, Ploski C, Correia A, Quinn N, Ullrich NJ, Nazarian A, Liang MG, Huh SY, Schwartzman A, Kieran MW. Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(41):16666-71.
- Gordon LB, Massaro J, D'Agostino RB Sr, Campbell SE, Brazier J, Brown T, Kleinman ME, Kieran MW and the Progeria Clinical Trials Collaborative. Impact of Farnesylation Inhibitors on Survival in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Circulation.* 2014; 130:27-34.
- Gotea V & Ovcharenko I. DiRE: identifying distant regulatory elements of co-expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(2):W133-W139.
- Greenwood SK, Hill RB, Sun JT, Armstrong MJ, Johnson TE, Gara JP, Galloway SM. Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the in vitro assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results. *Environmental and molecular mutagenesis*, 2004; 43(1):36-44.
- Grinspoon S, Carr A. Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. *N Engl J Med* 2005; 352:48 – 62.
- Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD, Shumaker DK, Wilson KL. The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6(1):21-31.
- Guillot PV, Gotherstrom C, Chan J, Kurata H, Fisk NM. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells.* 2007; 25:646-654.

- Haigis MC & Yankner BA. The aging stress response. *Mol. Cell.* 2010; 40:333-344.
- Hayflick L and Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 1961; 25:585-621.
- Hayflick L. How and why we age. New York. *Ballantine Books.* 1994.
- Heessen S, Fornerod M. The inner nuclear envelope as a transcription factor resting place. *EMBO Rep.* 2007; 8:914-9.
- Hekimi S, J. Lapointe, Y. Wen. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* 2011; 21: 569-576.
- Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell.* 2001; 107:67-77.
- Hernandez L, Roux KJ, Wong ES, Mounkes LC, Mutalif R, Navasankari R, JW, Wang H, Lee HS, Kozlov S, Grunert M, Keeble T, Jones CM, Meta MD, Young SG, Daar IO, Burke B, Perantoni AO, Stewart CL. Functional coupling between the extracellular matrix and nuclear lamina by Wnt signaling in progeria. *Dev Cell.* 2010; 19(3):413-25.
- Hernandez-Vallejo SJ, Beaupere C, Larghero J, Capeau J, Lagathu C. HIV protease inhibitors induce senescence and alter osteoblastic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells: beneficial effect of pravastatin. *Aging Cell.* 2013; 12:955-965.
- Herr W, Sturm RA, Clerc RG, Corcoran LM, Baltimore D, Sharp PA, Ingraham HA, Rosenfeld MG, Finney M, Ruvkun G, Horvitz HR. The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products. *Genes Dev.* 1988; 2:1513-1516.
- Hewitt G, Jurk D, Marques FD, Correia-Melo C, Hardy T, Gackowska A, Anderson R, Taschuk M, Mann J, Passos JF. Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat. Commun.* 2012; 3:708.
- Hoeijmakers JH. DNA damage, aging and cancer. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361:1475–1485.
- Höhn A, Weber D, Jung T, Ott C, Hugo M, Kochlik B, Kehm R, König J, Grune T, Castro JP. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biology.* 2017; 11:482-501.
- Huang dW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:1-13.
- Huang dW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009; 4:44-57.
- Ibrahim MX, Sayin VI, Akula MK, Liu M, Fong LG, Young SG, Bergo MO. Targeting isoprenylcysteine methylation ameliorates disease in a mouse model of progeria. *Science.* 2013; 340: 1330-1333.
- Imai R, Asai K, Hanai J-i, Takenaka M. Transgenic mice overexpressing glia maturation factor- β , an oxidative stress inducible gene, show premature aging due to Zmpste24 downregulation. *Aging.* 2015; 7:486-498.
- Imai S, Nishibayashi S, Takao K, Tomifuji M, Fujino T, Hasegawa M, Takano T. Dissociation of Oct-1 from the nuclear peripheral structure induces the cellular aging-associated collagenase gene expression. *Mol Biol Cell.* 1997; 8:2407-2419.
- Infante A, Ruiz de Eguino, Gago A, Rodríguez C.I. LMNA-linked lipodystrophies: experimental models to unravel the molecular mechanisms Adipogenesis. In *Signaling Pathways, Molecular Regulation and Impact on Human Disease.* Edited by Nova Science Publishers. ISBN:978-1-62808-750-5. 2013: 35-93.
- Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology.* 2004; 5:1-10.
- Ivorra C, Kubicek M, González JM, Sanz-González SM, Alvarez-Barrientos A, O'Connor JE, Burke B, and Andres V. A mechanism of AP-1 suppression through interaction of c-Fos with lamin A/C. *Genes Dev.* 2006; 20:307-20.
- Jeninga EH & Kalkhoven E. Central players in inherited lipodystrophies. *Trends Endocrinol Metab.* 2010; 21:581-8.

- Jung H-J, Coffinier C, Choe Y, Beigneux AP, Davies BSJ, Yang SH, Barnes II RH, Hong J, Sun T, Pleasure SJ, Young SG, Fong LG. Regulation of prelamin A but not lamin C by miR-9, a brain-specific microRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(7):E423-E431.
- Jurk D, Wilson C, Passos JF, Oakley F, Correia-Melo C, Greaves L, Saretzki G, Fox C, Lawless C, Anderson R, Hewitt G, Pender SL, Fullard N, Nelson G, Mann J, van de Sluis B, Mann DA, von Zglinicki T. Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nat. Commun*. 2014; 2:4172.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*. 2000; 19:5720-5728.
- Kasper G, Mao L, Geissler S, Draycheva A, Trippens J, Kühnisch J, Tschirschmann M, Kaspar K, Perka C, Duda GN, Klose J. Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton. *Stem Cells*. 2009; 27:1288-1297.
- Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, Franceschi C, Lithgow GJ, Morimoto RI, Pessin JE, Rando TA, Richardson A, Schadt EE, Wyss-Coray T, Sierra F. Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell*. 2014; 159, 709-713.
- Kenyon C. The genetics of ageing. *Nature*. 2010; 464:504-512.
- Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004; 109:1543-1549.
- Klionsky DJ, *et al*. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016; 12:1-222.
- Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Res. Rev*. 2011; 10(2):205-215.
- Krishnan V, Chow MZY, Wang Z, Zhang L, Liu B, Liu X, Zhou Z. Histone H4 lysine 16 hypoacetylation is associated with defective DNA repair and premature senescence in Zmpste24-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; 108, 12325-12330.
- Kubben N, Voncken JW, Konings G, van Weeghel M, van den Hoogenhof MM, Gijbels M, van Erk A, Schoonderwoerd K, van den Bosch B, Dahlmans V, Calis C, Houten SM, Misteli T, Pinto YM. Post-natal myogenic and adipogenic developmental: defects and metabolic impairment upon loss of A-type lamins. *Nucleus*. 2011; 2(3):195-207.
- Kubben N, Zhang W, Lixia Wang L, Voss TyC, Yang J, Qu J, Liu G-H, Misteli T. Repression of the Antioxidant NRF2 Pathway in Premature Aging. *Cel.l* 2016; 165(6):1361-74.
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. 2010; 24:2463-2479.
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci*. 2000; 113:3613-3622.
- Labbadia J & Morimoto RI. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem*. 2015; 84:435-464.
- Larson K, Yan S-J, Tsurumi A, Liu J, Zhou J, Gaur K, Guo D, Eickbush TH, Li WX. Heterochromatin formation promotes longevity and represses ribosomal RNA synthesis. *PLoS Genet*. 2012; 8:e1002473.
- Lattanzi G, Columbaro M, Mattioli E, Cenni V, Camozzi D, Wehnert M, Santi S, Riccio M, Del Coco R, Maraldi NM, Squarzone S, Foisner R, Capanni C. Pre-Lamin A processing is linked to heterochromatin organization. *J Cell Biochem*. 2007; 102(5):1149-59.
- Lattanzi G, Ortolani M, Columbaro M, Prencipe S, Mattioli E, Lanzarini C, Maraldi NM, Cenni V, Garagnani P, Salvioli S, Storci G, Bonafè M, Capanni C, Franceschi C. Lamins are rapamycin targets that impact human longevity: a study in centenarians. *J Cell Sci*. 2014; 127:147-157.
- Lavasani M, Robinson AR, Lu A, Song M, Feduska JM, Ahani B, Tilstra JS, Feldman CH, Robbins PD, Niedernhofer LJ, Huard J. Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model. *Nat. Commun*. 2012; 3:608.

- Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*. 2006; 2:187-195.
- Lee DC, Welton KL, Smith ED, Kennedy BK. A-type nuclear lamins act as transcriptional repressors when targeted to promoters. *Exp Cell Res*. 2009; 315(6):996-1007.
- Lee R, Chang SY, Trinh H, Tu Y, White AC, Davies BS, Bergo MO, Fong LG, Lowry WE, Young SG. Genetic studies on the functional relevance of the protein prenyltransferases in skin keratinocytes. *Hum Mol Genet*. 2010; 19(8):1603-17.
- Lefèvre C, Auclair M, Boccara F, Bastard JP, Capeau J, Vigouroux C, Caron-Debarle M. Premature senescence of vascular cells is induced by HIV protease inhibitors: implication of prelamin A and reversion by statin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30:2611-2620.
- Levin VA, Panchabhai SC, Shen L, Kornblau SM, Qiu Y, Baggerly KA. Different changes in protein and phosphoprotein levels result from serum starvation of high-grade glioma and adenocarcinoma cell lines. *J Proteome Res*. 2010; 9:179-191.
- Levine B & Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008; 132:27-42.
- Lin F & Worman HJ. Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1. *Genomics*. 1995; 27:230-6.
- Lin F & Worman HJ. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem*. 1993; 268:16321-6.
- Lin K, Dorman JB, Rodan A, Kenyon C. daf-16: anHNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 1997; 278: 1319–1322.
- Liu GH, Barkho BZ, Ruiz S, Diep D, Qu J, Yang SL, Panopoulos AD, Suzuki K, Kurian L, Walsh C, Thompson J, Boue S, Fung HL, Sancho-Martinez I, Zhang K, Yates J 3rd, Izpisua Belmonte JC. Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson- Gilford progeria syndrome. *Nature*. 2011; 472:221-225.
- Liu GH, Ding Z, Izpisua Belmonte JC. iPSC technology to study human aging and aging-related disorders. *Curr Opin Cell Biol*. 2012; 24: 765-74.
- Liu Y, Wang Y, Sun X, Mei C, Wang L, Li Z, Zha X. miR-449a promotes liver cancer cell apoptosis by downregulation of Calpain 6 and POU2F1. *Oncotarget*. 2016; 7(12):13491-13501.
- Liu, B., Wang, J., Chan, K. M., Tjia, W. M., Deng, W., Guan, X., Huang, J., Li, K. M., Chau, P. Y., Chen, D. J., Pei, D., Pendas, A. M., and 9 others. Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nature Med*. 2005; 11:780-785.
- Lo Cicero A and Nissan X. Pluripotent stem cells to model Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS): current trends and future perspectives for drug discovery. *Ageing Res. Rev*. 2015; 24:343-348.
- Loffredo FS, Steinhauser ML, Jay SM, Gannon J, Pancoast JR, Yalamanchi P, Sinha M, Dall'Osso C, Khong D, Shadrach JL, Miller CM, Singer BS, Stewart A, Psychogios N, Gerszten RE, Hartigan AJ, Kim MJ, Serwold T, Wagers AJ, Lee RT. Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. *Cell*. 2013; 153: 828-839.
- Lombardi F, Gullotta F, Columbaro M, Filareto A, D'Adamo M, Vielle A, Guglielmi V, Nardone AM, Azzolini V, Grosso E, Lattanzi G, D'Apice MR, Masala S, Maraldi NM, Sbraccia P, Novelli G. Compound heterozygosity for mutations in LMNA in a patient with a myopathic and lipodystrophic mandibuloacral dysplasia type A phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92:4467-4471.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013; 153:1194-1217.
- Lutz W, Sanderson W, Scherbov S. The coming acceleration of global population ageing. *Nature*. 2008; 451: 716-9.
- Maddox J, Shakya A, South S, Shelton D, Andersen JN, Chidester S, Kang J, Gligorich KM, Jones DA, Spangrude GJ, Welm BE, Tantin D. Transcription factor Oct1 is a somatic and cancer stem cell determinant. *PLoS Genet*. 2012; 8:e1003048.
- Malhas AN, Lee CF, Vaux DJ. Lamin B1 controls oxidative stress responses via Oct-1. *J Cell Biol*. 2009; 184:45-55.

- Maraldi NM & Lattanzi G. Involvement of prelamin A in laminopathies. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2007; 17:317–334.
- Mariño G, Ugalde AP, Salvador-Montoliu N, Varela I, Quirós PM, Cadiñanos J, van der Pluijm I, Freije JM, López-Otín C. Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction. *Hum Mol Genet.* 2008; 17:2196-2211.
- Martínez P & Blasco MA. Role of shelterin in cancer and aging. *Aging Cell.* 2010; 9:653-666.
- Martínez P & Blasco MA. Telomere-driven diseases and telomere targeting therapies. *J Cell Biol.* 2017; 1-13. doi: 10.1083/jcb.201610111 [Epub ahead of print]
- Maske CP, Hollinshead MS, Higbee NC, Bergo MO, Young SG, Vaux DJ. A carboxyl-terminal interaction of lamin B1 is dependent on the CAAX endoprotease Rce1 and carboxymethylation. *J Cell Biol.* 2003; 162:1223-32.
- Matthias P, Lymphoid-specific transcription mediated by the conserved octamer site: who is doing what? *Semin Immunol.* 1998; 10: 155-163.
- McClintock D, Ratner D, Lokuge M, Owens DM, Gordon LB, Collins FS, Djabali K. The mutant form of lamin A that causes Hutchinson-Gilford progeria is a biomarker of cellular aging in human skin. *PLoS One.* 2007; 2:e1269.
- McKenna T, Rosengardten Y, Viceconte N, Baek JH, Grochová D, Eriksson M. Embryonic expression of the common progeroid lamin A splice mutation arrests postnatal skin development. *Aging Cell.* 2014; 13(2):292-302.
- Miller JD, Y. M. Ganat, S. Kishinevsky, R. L. Bowman, B. Liu, E. Y. Tu, P. K. Mandal, E. Vera, J. W. Shim, S. Kriks, T. Taldone, N. Fusaki, M. J. Tomishima, D. Krainc, T. A. Milner, D. J. Rossi, L. Studer. Human iPSC-Based Modeling of Late-Onset Disease via Progerin-Induced Aging. *Cell Stem Cell.* 2013; 13:691-705.
- Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med.* 2001; 226:507-20.
- Missios P, Zhou Y, Guachalla LM, von Figura G, Wegner A, Chakkarappan SR, Binz T, Gompf A, Hartleben G, Burkhalter MD, Wulff V, Günes C, Sattler RW, Song Z, Illig T, Klaus S, Böhm BO, Wenz T, Hiller K, Rudolph KL. Glucose substitution prolongs maintenance of energy homeostasis and lifespan of telomere dysfunctional mice. *Nat. Commun.* 2014; 5:4924.
- Moir RD, Yoon M, Khuon S, Goldman RD. Nuclear Lamins A and B1: Different Pathways of Assembly during Nuclear Envelope Formation in Living Cells. *The Journal of Cell Biology.* 2000; 151(6):1155-1168.
- Mounkes LC, Kozlov S, Hernandez L, Sullivan T, Stewart CL. A progeroid syndrome in mice is caused by defects in A-type lamins. *Nature.* 2003; 423(6937):298-301.
- Muchir A, van Engelen BG, Lammens M, Mislow JM, McNally E, Schwartz K, and Bonne G. Nuclear envelope alterations in fibroblasts from LGMD1B patients carrying nonsense Y259X heterozygous or homozygous mutation in lamin A/C gene. *Exp Cell Res.* 2003; 291: 352–362.
- Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 2003; 113:703-716.
- Navarro CL, Cadinanos J, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Courrier S, Boccaccio I, Boyer A, Kleijer WJ, Wagner A, Giuliano F, Beemer FA, Freije JM, Cau P, Hennekam RCM, López-Otín C, Badens C, Levy N. Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of lamin A precursors. *Hum. Molec. Genet.* 2005; 14:1503-1513.
- Navarro CL, De Sandre-Giovannoli, A, Bernard R, Boccaccio I, Boyer A, Genevieve D, Hadj-Rabia S, Gaudy-Marqueste C, Smitt HS, Vabres P, Faivre L, Verloes A, Van Essen T, Flori E, Hennekam R, Beemer FA, Laurent N, Le Merrer M, Cau P, Levy N. Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identity restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Hum. Molec. Genet.* 2004; 13: 2493-2503.
- Nissan X, Blondel S, Peschanski M. In vitro pathological modelling using patient-specific induced pluripotent stem cells: the case of progeria. *Biochem Soc Trans.* 2011; 39:1775-1779.
- Noda T, Ohsumi Y. Tor. A phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem.* 1998; 273:3963-3966.

- Novelli G, Muchir A, Sanguuolo F, Helbling-Leclerc A, D'Apice MR, Massart C, Capon F, Sbraccia P, Federici M, Lauro R, Tudisco C, Pallotta R, Scarano G, Dallapiccola B, Merlini L, Bonne G. Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am J Hum Genet.* 2002; 71:426-431.
- Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature.* 1997; 389: 994-999.
- Olive M, Harten I, Mitchell R, Beers JK, Djabali K, Cao K, Erdos MR, Blair C, Funke B, Gerhard-Herman M, Machan JT, Kutys R, Virmani R, Collins FS, Wright TN, Nabel EG, Gordon LB. Cardiovascular pathology in Hutchinson-Gilford progeria: correlation with the vascular pathology of aging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(11):2301-2309.
- Osorio FG, Barcena C, Soria-Valles C, Ramsay AJ, de Carlos F, Cobo J, Fueyo A, Freije JM, López-Otín C. Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF-kappaB activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. *Genes Dev.* 2012; 26:2311-2324.
- Osorio FG, Navarro CL, Cadiñanos J, López-Mejía IC, Quirós PM, Bartoli C, Rivera J, Tazi J, Guzmán G, Varela I, Depetris D, de Carlos F, Cobo J, Andrés V, De Sandre-Giovannoli A, Freije JM, Lévy N, López-Otín C. Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Sci Transl Med.* 2011; 3:106ra7.
- Osorio FG, Varela I, Lara E, Puente XS, Espada J, Santoro R, Freije JM, Fraga MF, López-Otín C. Nuclear envelope alterations generate an aging-like epigenetic pattern in mice deficient in Zmpste24 metalloprotease. *Aging Cell.* 2010; 9:947-957.
- Pacheco LM, Gomez LA, Dias J, Ziebarth NM, Howard GA, Schiller PC. Progerin expression disrupts critical adult stem cell functions involved in tissue repair. *Aging.* 2014; 6:1049-1063.
- Palchetti CZ, Patin RV, Gouvêa A de F, Szejnfeld VL, Succi RC, Oliveira FL. Body composition and lipodystrophy in prepubertal HIV-infected children. *Braz J Infect Dis.* 2013; 17(1):1-6.
- Palm W & de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu. Rev. Genet.* 2008; 42:301-334.
- Partridge L & Gems D. Benchmarks for ageing studies. *Nature.* 2007; 450:165-167.
- Pekovic V & Hutchison CJ. Adult stem cell maintenance and tissue regeneration in the ageing context: the role for A-type lamins as intrinsic modulators of ageing in adult stem cells and their niches. *J Anat.* 2008; 213:5-25.
- Pendas AM, Zhou Z, Cadinanos J, Freije JM, Wang J, Hultenby K, Astudillo A, Wernerson A, Rodriguez F, Tryggvason K, Lopez-Otin C. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nature Genet.* 2002; 31:94-99.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284:143-7.
- Plasilova M, Chattopadhyay C, Pal P, Schaub NA, Buechner SA, Mueller H, Miny P, Ghosh A, Heinemann K. Homozygous missense mutation in the lamin A/C gene causes autosomal recessive Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *J Med Genet.* 2004; 41:609-14.
- Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu. Rev. Biochem.* 2009; 78:959-991.
- Ragnauth CD, Warren DT, Liu Y, McNair R, Tajsic T, Figg N, Shroff R, Skepper J, Shanahan CM. Prelamin A acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging. *Circulation.* 2010; 121:2200-2210.
- Ramos FJ, Chen SC, Garelick MG, Dai DF, Liao CY, Schreiber KH, MacKay VL, An EH, Strong R, Ladiges WC, Rabinovitch PS, Kaeblerlein M, Kennedy BK. Rapamycin reverses elevated mTORC1 signaling in lamin A/C-deficient mice, rescues cardiac and skeletal muscle function, and extends survival. *Sci Transl Med.* 2012; 4:144ra103.
- Rao MS & Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev.* 2001; 122:713-34.

- Reddy KL, Zullo JM, Bertolino E, Singh H. Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature*. 2008; 452(7184):243-7.
- Richards SA, Muter J, Ritchie P, Lattanzi G, Hutchison CJ. The accumulation of un-repairable DNA damage in laminopathy progeria fibroblasts is caused by ROS generation and is prevented by treatment with N-acetyl cysteine. *Hum Mol Genet*. 2011; 20:3997-4004.
- Robin JD, Ludlow AT, Batten K, Magdinier F, Stadler G, Wagner GR, Shay JW, Wright WE. Telomere position effect: Regulation of gene expression with progressive telomere shortening over long distances. *Genes Dev*. 2014; 28:2464-2476.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of biological chemistry*. 1998; 273(10):5858-5868.
- Rosengardten Y, McKenna T, Grochová D, Eriksson M. Stem cell depletion in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Aging Cell*. 2011; 10:1011-1020.
- Ruiz de Eguino G, Infante A, Schlangen K, Aransay AM, Fullaondo A, Soriano M, García-Verdugo JM, Martín AG, Rodríguez CI. Sp1 transcription factor interaction with accumulated prelamin A impairs adipose lineage differentiation in human mesenchymal stem cells: essential role of Sp1 in the integrity of lipid vesicles. *Stem Cells Transl Med*. 2012; 1:309-321.
- Ryan AK & Rosenfeld MG. POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev*. 1997; 11:1207-1225.
- Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging*. 2012; 4:166-175.
- Scaffidi P & Misteli T. Good news in the nuclear envelope: loss of lamin A might be a gain. *J Clin Invest*. 2006; 116:632-634.
- Scaffidi P & Misteli T. Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat Cell Biol*. 2008; 10:452-459.
- Scaffidi P & Misteli T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science*. 2006; 312:1059-1063.
- Schreiber KH & Kennedy BK. When lamins go bad: nuclear structure and disease. *Cell*. 2013; 152:1365-1375.
- Sebastiano V, Dalvai M, Gentile L, Schubart K, Sutter J, Wu GM, Tapia N, Esch D, Ju JY, Hübner K, Bravo MJ, Schöler HR, Cavaleri F, Matthias P. Oct1 regulates trophoblast development during early mouse embryogenesis. *Development*. 2010; 137(21):3551-60.
- Shan X, Roberts C, Kim EJ, Brenner A, Grant G, Percec I. Transcriptional and Cell Cycle Alterations Mark Aging of Primary Human Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 2017; 00:00-00. doi: 10.1002/stem.2592.
- Signer RA & Morrison SJ. Mechanisms that regulate stem cell aging and life span. *Cell Stem Cell*. 2013; 12:152-65.
- Simha V & Garg A. Body fat distribution and metabolic derangements in patients with familial partial lipodystrophy associated with mandibuloacral dysplasia. *J. Clin. Endocr. Metab*. 2002; 87:776-785.
- Sinensky M, Fantle K, Trujillo M, McLain T, Kupfer A, Dalton M. The processing pathway of prelamin A. *J Cell Sci*. 1994; 107(1):61-7.
- Sive HL, Heintz N, Roeder RG. Multiple sequence elements are required for maximal in vitro transcription of a human histone H2B gene. *Mol Cell Biol*. 1986; 6:3329-3340.
- Smigiel R, Jakubiak A, Esteves-Viera V, Szela K, Halon A, Jurek T, Lévy N, De Sandre-Giovannoli A. Novel frameshifting mutations of the ZMPSTE24 gene in two siblings affected with restrictive dermopathy and review of the mutations described in the literature. *Am. J. Med. Genet*. 2010; 152A:447-452.
- Söderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstråle K, Leuchowius KJ, Jarvius J, Wester K, Hydbring P, Bahram F, Larsson LG, Landegren U. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods*. 2006; 3:995-1000.

- Soria-Valles C, Osorio FG, Gutierrez-Fernandez A, De Los Angeles A, Bueno C, Menendez P, Martin-Subero JI, Daley GO, Freije JM, López-Otín C. NF-kappa-B activation impairs somatic cell reprogramming in ageing. *Nat. Cell Biol.* 2015; 17:1004-1013.
- Stadler G, Rahimov F, King OD, Chen JC, Robin JD, Wagner KR, Shay JW, Emerson Jr CP, Wright WE. Telomere position effect regulates DUX4 in human facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013; 20:671-678.
- Stewart C & Burke B. Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B. *Cell.* 1987; 51(3):383-92.
- Sturm RA, Das G, Herr W. The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes Dev.* 1988; 2:1582-1599.
- Susmita K & Cuervo AM. Proteostasis and aging. *Nature Medicine.* 2015; 21:1406-1415.
- Taffet GE. Physiology of aging. In: Cassel CK, Leipzig RM, Cohen HJ, et al. [eds]. *Geriatric Medicine: An Evidence-Based Approach*, 4th ed. New York, Springer, 2003.
- Talens RP, Christensen K, Putter H, Willemsen G, Christiansen L, Kremer D, Suchiman HE, Slagboom PE, Boomsma DI, Heijmans BT. Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell.* 2012; 11:694-703.
- Tantin D, Schild-Poulter C, Wang V, Haché RJ, Sharp PA. The octamer binding transcription factor Oct-1 is a stress sensor. *Cancer Res.* 2005; 65:10750-10758.
- Thijs G, Marchal K, Lescot M, Rombauts S, De Moor B, Rouze P, Moreau Y. A Gibbs Sampling method to detect over-represented motifs in the upstream regions of co-expressed genes. *Journal of Computational Biology.* 2002; 9:447-464.
- Trigueros-Motos L, Gonzalez JM, Rivera J, Andres V. Hutchinson-Gilford progeria syndrome, cardiovascular disease and oxidative stress. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011; 3:1285-97.
- Ugalde AP, Ramsay AJ, de la Rosa J, Varela I, Mariño G, Cadiñanos J, Lu J, Freije JM, López-Otín C. Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53. *The EMBO Journal.* 2011; 30(11):2219-2232.
- Ukekawa R, Miki K, Fujii M, Hirano H, Ayusawa D. Accumulation of multiple forms of lamin A with down-regulation of FACE-1 suppresses growth in senescent human cells. *Genes Cells.* 2007; 12(3):397-406.
- Van Berlo JH, Voncken JW, NK, Broers JL, Duisters R, van Leeuwen RE, Crijns HJ, Ramaekers FC, Hutchison CJ, and Pinto YM. A-type lamins are essential for TGF-1 induced PP2A to dephosphorylate transcription factors. *Hum Mol Genet.* 2005; 14:2839-2849.
- Van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature.* 2014; 509:439-446.
- Varela I, Cadinanos J, Pendas AM, Gutierrez-Fernandez A, Folgueras AR, Sanchez LM, Zhou Z, Rodriguez FJ, Stewart CL, Vega JA, Tryggvason K, Freije JM, López-Otín C. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature.* 2005; 437:564-568.
- Varela I, Pereira S, Ugalde AP, Navarro CL, Suarez MF, Cau P, Cadinanos J, Osorio FG, Foray N, Cobo J, de Carlos F, Lévy N, Freije JM, López-Otín C. Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nature Med.* 2008; 14:767-772.
- Varga R, Eriksson M, Erdos MR, Olive M, Harten I, Kolodgie F, Capell BC, Cheng J, Faddah D, Perkins S, Avallone H, San H, Qu X, Ganesh S, Gordon LB, Virmani R, Wight TN, Nabel EG, Collins FS. Progressive vascular smooth muscle cell defects in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103:3250-5.
- Verstraeten VL, Broers JL, Ramaekers FC, Van Steensel MA. The nuclear envelope, a key structure in cellular integrity and gene expression. *Curr Med Chem.* 2007; 14(11):1231-48.
- Vijg J & Suh Y. Genome instability and aging. *Annu. Rev. Physiol.* 2013; 75:645-668.
- Villarroya F, Domingo P, Giralto M. Drug-induced lipotoxicity: lipodystrophy associated with HIV-1 infection and antiretroviral treatment. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1801:392-9.
- Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan TM, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, Lucin KM, Czirr E, Park JS, Couillard-Després S, Aigner L, Li G, Peskind ER, Kaye JA, Quinn JF,

- Galasko DR, Xie XS, Rando TA, Wyss-Coray T. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*. 2011; 477:90-94.
- Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One*. 2008; 3:e2213.
- Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell*. 2009; 8:311-323.
- Wang VE, Schmidt T, Chen J, Sharp PA, Tantin D. Embryonic lethality, decreased erythropoiesis, and defective octamer-dependent promoter activation in Oct-1-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 2004; 24:1022-1032.
- Weber K, Plessmann U, Traub P. Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyisoprenylation site from the precursor; implications for the structure of the nuclear lamina. *FEBS Lett*. 1989; 257:411-4.
- Weil BR, Markel TA, Herrmann JL, Abarbanell AM, Meldrum DR. Mesenchymal stem cells enhance the viability and proliferation of human fetal intestinal epithelial cells following hypoxic injury via paracrine mechanisms. *Surgery*. 2009; 146(2):190-7.
- Wilson KL & Foisner R. Lamin-binding Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010; 2(4):a000554.
- Wood AM, Rendtlew Danielsen JM, Lucas CA, Rice EL, Scalzo D, Shimi T, Goldman RD, Smith ED, Le Beau MM, Kosak ST. TRF2 and lamin A/C interact to facilitate the functional organization of chromosome ends. *Nat. Commun*. 2014; 5:5467.
- Worman HJ. Nuclear lamins and laminopathies. *J. Pathol*. 2012; 226:316-325.
- Yang SH, Bergo MO, Toth JI, Qiao X, Hu Y, Sandoval S, Meta M, Bendale P, Gelb MH, Ypung SG, Fong LG. Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:10291-6.
- Yang SH, Chang SY, Ren S, Wang Y, Andres DA, Spielmann HP, Fong LG, Young SG. Absence of progeria-like disease phenotypes in knock-in mice expressing a non-farnesylated version of progerin. *Hum Mol Genet*. 2011; 20:436-44.
- Yang SH, Meta M, Qiao X, Frost D, Bauch J, Coffinier C, Majumdar S, Bergo MO, Young SG, Fong LG. A farnesyltransferase inhibitor improves disease phenotypes in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *J Clin Invest*. 2006; 116:2115-2121.
- Yang SH, Qiao X, Fong LG, Young SG. Treatment with a farnesyltransferase inhibitor improves survival in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1781:36-9.
- Yaou RB, Navarro C, Quijano-Roy S, Bertrand AT, Massart C, De Sandre-Giovannoli A, Cadiñanos J, Mamchaoui K, Butler-Browne G, Estournet B, Richard P, Barois A, Lévy N, Bonne G. Type B mandibuloacral dysplasia with congenital myopathy due to homozygous *ZMPSTE24* missense mutation. *European Journal of Human Genetics*. 2011; 19(6):647-654.
- Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM, Narita M. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev*. 2009; 23:798-803.
- Young SG, Fong LG, Michaelis S. Prelamin A, Zmpste24, misshapen cell nuclei, and progeria: New evidence suggesting that protein farnesylation could be important for disease pathogenesis. *J Lipid Res*. 2005; 46:2531-2558.
- Yu K-R, Lee SH, Jung J-W, Hong I-S, Kim H-S, Seo Y, Shin T-H, Kang K-S. MicroRNA-141-3p plays a role in human mesenchymal stem cell aging by directly targeting ZMPSTE24. *J Cell Sci*. 2013; 126:5422-5431.
- Zhang FL & Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem*. 1996; 65:241-69.
- Zhang J, Lian Q, Zhu G, Zhou F, Sui L, Tan C, Mutalif RA, Navasankari R, Zhang Y, Tse HF, Stewart CL, Colman AI. A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell*. 2011; 8:31-45.

Zhang R, Chen W, Adams PD. Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Molecular and Cellular Biology*. 2007; 27:2343-58.

X. ANEXO

Publicaciones relacionadas con este trabajo de tesis.

Infante A, Gago A, de Eguino GR, Calvo-Fernández T, Gómez-Vallejo V, Llop J, Schlangen K, Fullaondo A, Aransay AM, Martín A, Rodríguez CI. Prelamin A accumulation and stress conditions induce impaired Oct-1 activity and autophagy in prematurely aged human mesenchymal stem cell. *Aging*. 2014; 6: 264-80.

Infante A, Ruiz de Eguino, Gago A, Rodríguez CI. LMNA-linked lipodystrophies: experimental models to unravel the molecular mechanisms Adipogenesis. In Signaling Pathways, Molecular Regulation and Impact on Human Disease. *Edited by Nova Science Publishers*. ISBN:978-1-62808-750-5. 2013: 35-93.

Infante A, Gago A, Rodríguez CI. A human experimental model of laminopathy based on adult stem cells establishes the relevance of Oct1 transcription factor in the aging process. *Stem Cell Transl Invest*. 2014; 1:e276.

