

	<b>GESTIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS Y BIBLIOTECARIOS</b>		<b>CÓDIGO</b>	FO-GS-15	
			<b>VERSIÓN</b>	02	
	<b>ESQUEMA HOJA DE RESUMEN</b>			<b>FECHA</b>	03/04/2017
				<b>PÁGINA</b>	1 de 1
<b>ELABORÓ</b>		<b>REVISÓ</b>	<b>APROBÓ</b>		
Jefe División de Biblioteca		Equipo Operativo de Calidad	Líder de Calidad		

## RESUMEN TRABAJO DE GRADO

**AUTOR(ES): NOMBRES Y APELLIDOS COMPLETOS**

NOMBRE(S): JESSICA ALEXANDRA      APELLIDOS: LIZCANO MENESES

**FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE**

**PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA BIOTECNOLOGICA**

**DIRECTOR:**

NOMBRE(S): IAN ALAIN      APELLIDOS: GARCÍA AGUIRRE

**TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): “ESTUDIO DEL EFECTO ANTI-SENESCENTE DE LA CLOROQUINA EN UN MODELO *IN VITRO* DE SENESCENCIA INDUCIDA MEDIANTE LA HIPERACETILACIÓN DE LAS HISTONAS”**

Cloroquina se pondera como un posible compuesto con actividad geroprotectora, ante esto; se resalta la necesidad de evaluar la actividad senolítica de la Cloroquina en un modelo de senescencia inducida. Debido a lo antes mencionado, distintos grupos de investigación han desarrollado terapias farmacológicas las cuales tienen como diana a las células senescentes. La carrera por seguir descubriendo compuesto con estas bondades pero que adicionalmente sean bien tolerados por el humano o bien, existan datos sobre su farmacodinamia y parámetros farmacocinéticos, cuyos datos son obtenidos mediante un arduo proceso de investigación el cual implica; mucho tiempo, dinero y esfuerzo. El descubrimiento de la actividad senolítica en algún compuesto que ya cuente con todos estos datos, tendría una gran ventaja frente aquellos compuestos recién sintetizados.

**PALABRAS CLAVES:** Senescencia celular, Cloroquina, NaBu, inmunofluorescencia,  $\beta$ -gal

**PÁGINAS:** 51 **PLANOS:** 2 **ILUSTRACIONES:** 10 **CD ROOM:** \_\_\_\_

**“ESTUDIO DEL EFECTO ANTI-SENESCENTE DE LA CLOROQUINA EN UN  
MODELO *IN VITRO* DE SENESCENCIA INDUCIDA MEDIANTE LA  
HIPERACETILACIÓN DE LAS HISTONAS”**

**JESSICA ALEXANDRA LIZCANO MENESES**

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTA DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
INGENIERIA BIOTECNOLOGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA**

**2023**

**“ESTUDIO DEL EFECTO ANTI-SENESCENTE DE LA CLOROQUINA EN UN  
MODELO *IN VITRO* DE SENESCENCIA INDUCIDA MEDIANTE LA  
HIPERACETILACIÓN DE LAS HISTONAS”**

**JESSICA ALEXANDRA LIZCANO MENESES**

**Proyecto de investigación presentado como requisito para obtener el grado de  
INGENIERO BIOTECNOLÓGICO**

**Director:**

**DR. IAN ALAIN GARCIA AGUIRRE**

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTA DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
INGENIERIA BIOTECNOLOGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA**

**2023**



## ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

**FECHA:** 16 de mayo del 2023

**HORA:** 08:00 A.M.

**LUGAR:** UFPS - CUCUTA, NORTE DE SANTANDER - SC301

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

**TITULO:** “ESTUDIO DEL EFECTO ANTI-SENESCENTE DE LA CLOROQUINA EN UN MODELO IN VITRO DE SENESCENCIA INDUCIDA MEDIANTE LA HIPERACETILACIÓN DE LAS HISTONAS.”

**MODALIDAD:** INVESTIGACIÓN

**JURADO:** GERMAN LUCIANO LOPEZ BARRERA  
EDWIN JAVIER DUARTE GÓMEZ  
ROMINA ESMERALDA FUENTES DÍAZ

**ENTIDAD:** Laboratorio de Genética y Biología Molecular LTDA.

**Director:** DR. Bulmaro Cisneros  
**Co-Director:** DR. Ian Alain García Aguirre

NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
Jessica Alexandra Lizcano Meneses	1611400	4.6

**OBSERVACIONES:** MERITORIA.

**FIRMA DE LOS JURADOS**

Edwin Javier Duarte G

Romina E. Fuentes D.

\_\_\_\_\_  
**German Luciano López Barrera** **Edwin Javier Duarte Gómez** **Romina Esmeralda Fuentes Diaz**

**Vo. Bo Coordinador Comité Curricular** \_\_\_\_\_

## **Dedicatoria**

A mis padres Marleny & Henry por sus esfuerzos y siempre creer en mí.

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quisiera agradecerle a Dios y a la vida por todas las oportunidades y aquellas buenas personas que ha puesto en mi camino durante el transcurso de mi carrera profesional para poder culminar esta etapa de la mejor manera.

A mis padres Marleny Meneses y Henry Lizcano, gracias por sus esfuerzos y enseñarme a ser cada día una mejor persona, a mis hermanos Sol y Henry por ser los mejores compañeros de vida, ustedes fueron mi motivo de inspiración cada día.

Quiero agradecer enormemente al Dr. Bulmaro Cisneros por abrirme las puertas de su laboratorio, a mi director de tesis el Dr. Ian García por su paciencia, sus consejos y dedicación, por transmitirme tantos conocimientos y darme la oportunidad de ser una de sus alumnas. Gracias por ser los mejores jefes.

A mis compañeros del Laboratorio 12 por hacer de mi estancia en México una de las mejores experiencias de mi vida, agradezco especialmente a Pablo Gómez el mejor técnico del CINVESTAV , por cada uno de sus consejos y enseñarme de la cultura y comida mexicana. Los llevaré siempre en el corazón.

A mis amigos de la U, por estar en esta etapa de tantos años de lucha y aprendizaje. Nhata y Sharom estoy segura que el destino nos hizo compañeras, pero la vida nos convirtió en hermanas. Sebas, las verdaderas amistades se dan en momentos exactos y México era ese momento.

Ron, Gracias por su apoyo y creer en mi desde el primer momento

## Tabla de contenido

<b>Introducción</b>	<b>14</b>
<b>1. El problema</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Título</b>	<b>16</b>
<b>1.2 Planteamiento del problema</b>	<b>16</b>
<b>1.3 Formulación del problema</b>	<b>17</b>
<b>1.4 Justificación</b>	<b>17</b>
<b>1.5 Objetivos</b>	<b>18</b>
<b>1.5.1. Objetivo general</b>	<b>18</b>
<b>1.5.2. Objetivos específicos</b>	<b>18</b>
<b>1.6 Alcances y limitaciones</b>	<b>19</b>
<b>1.6.1 Alcances</b>	<b>19</b>
<b>1.6.2 Limitaciones</b>	<b>20</b>
<b>1.7 Delimitaciones</b>	<b>20</b>
<b>1.7.1 Delimitación espacial</b>	<b>20</b>
<b>1.7.2 Delimitación temporal</b>	<b>20</b>
<b>1.7.3 Delimitación conceptual</b>	<b>21</b>
<b>2. Marco referencial</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Antecedentes</b>	<b>22</b>

<b>2.2</b>	<b>Marco teórico</b>	<b>25</b>
2.2.1	Senescencia celular	25
2.2.2	Morfología celular senescente	26
2.2.3	Morfología nuclear	27
2.2.4	Morfologia nucleolar	28
2.2.5	Actividad lisosomal	28
2.2.6	Butirato de Sodio	29
2.2.7	Cloroquina	30
<b>2.3</b>	<b>Marco conceptual</b>	<b>31</b>
<b>2.4</b>	<b>Marco legal</b>	<b>33</b>
<b>3.</b>	<b>Diseño metodológico</b>	<b>34</b>
3.1	Tipo de investigación	34
3.2	Población y muestra	34
3.2.1	Población	34
3.2.2	Muestra	35
3.3	Hipótesis	35
3.4	Variables	36
3.4.1	Dependientes	36
3.4.2	Independientes	36
3.5	Fases de la investigación	37
<b>4.</b>	<b>Resultados y discusiones</b>	<b>42</b>

<b>4.1 Efecto anti-senescente generado por la Cloroquina en un modelo in vitro de senescencia inducida.</b>	<b>42</b>
<b>4.2 El tratamiento con CQ disminuye el número de células con alteraciones morfológicas asociadas a senescencia.</b>	<b>44</b>
<b>Conclusión</b>	<b>50</b>
<b>Recomendaciones</b>	<b>50</b>
<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>51</b>

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Anticuerpos utilizados en el ensayo de Inmunofluorescencia indirecta.	<b>40</b>
<b>Tabla 2.</b> Descripción de la Cloroquina.	<b>41</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1. El tratamiento con CQ disminuyó el porcentaje de células senescentes en fibroblastos con envejecimiento prematuro y fisiológico.</b>	<b>23</b>
<b>Figura 2. El tratamiento con CQ alivia las marcas de senescencia.</b>	<b>24</b>
<b>Figura 3. Características generales de la senescencia celular.</b> <small>Modificado apartir de ( Zabaleta,2022)</small>	<b>26</b>
<b>Figura 4. Morfología celular en fibroblastos primarios de un individuo con envejecimiento patológico.</b>	<b>27</b>
<b>Figura 5. Modelo de acción de la Cloroquina en autofagia.</b> <small>Tomada de ( Autofagia,s.f.)</small>	<b>30</b>
<b>Figura 6. Microscopia de campo claro donde se representa un cultivo celular de Fibroblastos de piel, GM03440, de un individuo de 20 años.</b> <small>Cortesía del Laboratorio 12 , genética Humana. Dr Bulmaro Cisneros V, y Pablo Gómez, cinvestav.</small>	<b>35</b>
<b>Figura 7. Identificación de células senescentes.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 8. El tratamiento con CQ disminuye el número de células con alteraciones morfológicas asociadas a senescencia.</b>	<b>47</b>
<b>Figura 9. El tratamiento con Cloroquina alivia las distintas marcas de senescencia en fibroblastos de 20 años inducidos a senescencia.</b>	<b>48</b>
<b>Figura 10. Esquema del modelo de inducción y tratamiento con Cloroquina.</b> <small>Autor</small>	<b>49</b>

## Resumen

La senescencia celular puede definirse como un proceso mediante el cual una célula presentará un arresto permanente en el ciclo celular, una célula senescente no responderá al tratamiento con mitógenos. La acumulación de células senescentes en un tejido puede comprometer la función del órgano en el que se encuentren y predisponer al desarrollo de distintas patologías, tales como: neurodegeneración, enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoartritis o llevar a un estado de crónico de inflamación y cáncer. Se ha propuesto que la eliminación de las células senescentes o la prevención de llegar al fenotipo senescente puede ejercer un efecto terapéutico a nivel celular, de tejido, órgano u organismo. Es por ello que actualmente hay una carrera por el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad senolítica (compuestos que inducen la eliminación de las células senescentes) o anti-senescente (compuestos que previenen la senescencia o que modulan los fenotipos de una célula senescente). Ante esto surge también una alternativa en el estudio de este tipo de compuestos, dando una vuelta de tuerca y volteando la mirada a compuestos ya existentes, los cuales son bien tolerados por el humano o de los cuales se cuenta con una gran cantidad de información acerca de su farmacodinamia y sobre sus parámetros farmacocinéticos. Previamente en el grupo de trabajo del Dr. Bulmaro Cisneros, mediante resultados aún no publicados y realizados por el Dr. Ian García, se describió el efecto anti-senescente de la Cloroquina en un modelo de envejecimiento prematuro y fisiológico o normal, cabe señalarse que la Cloroquina es un compuesto descubierto ya varias décadas atrás, el cual encaja en la descripción del viraje antes mencionado en la carrera por estudiar fármacos ya existentes con nuevas actividades terapéuticas. Sin embargo, surge el interés de investigar si la Cloroquina puede tener un efecto anti-senescente aún más generalizado y fuera del contexto del

envejecimiento. Con lo cual, de manera muy interesante en el presente trabajo encontramos que la Cloroquina mantiene su efecto anti-senescente incluso en un modelo alejado del envejecimiento, esto fue demostrado en un modelo de fibroblastos inducidos a senescencia mediante la hiperacetilación de las histonas, mediante tratamientos con Butirato de sodio. De forma sorprendente el tratamiento con Cloroquina en estas células inducidas a senescencia provocó una gran disminución en el porcentaje de células senescentes (positivas para la actividad de la beta-galactosidasa asociada a senescencia), alivió las alteraciones en la morfología nuclear, alivió la morfología celular senescente (células expandidas), redujo la expansión nucleolar y recuperó la marca de Heterocromatina H3K9me3. Estos resultados en conjunto indican las capacidades terapéuticas de la Cloroquina como un compuesto anti-senescente, el cual es capaz de ejercer dicho efecto terapéutico en diferentes modelos celulares de senescencia, los cuales abarcan: envejecimiento prematuro, envejecimiento fisiológico y senescencia inducida. Los resultados de este trabajo apoyarían la hipótesis de que la Cloroquina podría ejercer su efecto anti-senescente en diferentes patologías en donde la constante y probable etiología sean las células senescentes, tales como; cáncer, diabetes, inflamación crónica, neurodegeneración y enfermedades cardiovasculares.

## Introducción

La senescencia celular se presenta mediante la alteración de distintos procesos, la expresión de marcadores específicos, actividades enzimáticas especiales durante este proceso, etc. Una célula senescente se puede identificar si presenta un arresto permanente en el ciclo celular, una mayor expresión de p16, p21, una mayor área celular (fenómeno llamado, morfología celular senescente), si tiene una disminución en la marca de heterocromatina H3K9me3 (fenotipo llamado, pérdida de la heterocromatina perinuclear), la presencia de focos de heterocromatina asociados a senescencia (fenotipo definido por sus siglas en inglés; SAHF: Senescence-Associated Heterochromatin Foci), además, una célula senescente presentará una elevada actividad enzimática de la beta-galactosidasa asociada a senescencia, una menor expresión de la Lámina B1 y del receptor de las láminas tipo B (LBR) y la generará un fenotipo secretor asociado a senescencia o SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype). Una célula senescente puede secretar diferentes citocinas y cambiar el microambiente en su respectivo nicho celular, lo cual incluso puede generar un efecto en cascada de alteraciones que puede a su vez generar más células senescentes; lo que como consecuencia podría llevar una disfunción más generalizada de un tejido específico y provocar una disfunción respecto al órgano relacionado.

Debido a lo antes mencionado, distintos grupos de investigación han desarrollado terapias farmacológicas las cuales tienen como diana a las células senescentes, podemos agrupar estas estrategias en al menos 2 grupos: Senomórficos o Senolíticos, cuyas estrategias se basan en modificar marcadores característicos de una célula senescente o en eliminar las células senescentes respectivamente. Aunque existe una amplia batería de compuestos con alguna de éstas dos

actividades (senomórfica o senolítica), la carrera por seguir descubriendo compuesto con estas bondades pero que adicionalmente sean bien tolerados por el humano o bien, existan datos sobre su farmacodinamia y parámetros farmacocinéticos, cuyos datos son obtenidos mediante un arduo proceso de investigación el cual implica; mucho tiempo, dinero y esfuerzo. El descubrimiento de la actividad senolítica en algún compuesto que ya cuente con todos estos datos, tendría una gran ventaja frente aquellos compuestos recién sintetizados. Recientemente en el grupo de investigación del Dr. Bulmaro Cisneros y mediante ensayos realizados por el Dr. Ian García, se describió el efecto anti-senescente de la Cloroquina, estudios que fueron llevados a cabo de manera *in vitro* en distintos modelos de envejecimiento (prematureo y fisiológico), mediante el uso de fibroblastos de piel obtenidos de pacientes con envejecimiento prematureo (Síndrome de Progeria Hutchinson-Gilford) y fibroblastos obtenidos de un individuo geriátrico (individuo aparentemente sano de edad avanzada; 96 años). Éstos resultados reposicionan a la Cloroquina como un posible compuesto con actividad geroprotectora, ante esto; se resalta la necesidad de evaluar la actividad senolítica de la Cloroquina en un modelo de senescencia diferente al empleado anteriormente, es decir, un modelo de senescencia que no tenga las diversas alteraciones que podría presentar una célula con envejecimiento en donde los efectores del fenotipo senescente pueden ser demasiado amplios, con base en lo antes mencionado, se propuso en el presente trabajo generar un modelo de senescencia inducida mediante el uso de Butirato de Sodio para provocar un estado de hiperacetilación de las histonas llevando la cromatina a un estado generalizado de eucromatina, provocando así la senescencia celular, generando un modelo de senescencia inducida para evaluar el posible efecto anti-senescente de la Cloroquina y demostrar si dicho efecto anti-senescente es más generalizado, la cual indicaría que el efecto anti-senescente de la Cloroquina podría funcionar en distintos contextos disfuncionales que tengan en común la senescencia.

## 1. El problema

### 1.1 Título

Estudio del efecto anti-senescente de la Cloroquina en un modelo *in vitro* de senescencia inducida mediante la hiperacetilación de las histonas.

### 1.2 Planteamiento del problema

La senescencia se puede definir como un arresto permanente en el ciclo celular, en donde ésta ha perdido la respuesta a mitógenos. La acumulación de las células senescentes es dañina para el tejido en el que se encuentra y por lo tanto para el organismo que las acumula. Una célula senescente puede identificarse mediante el análisis de diversos fenotipos tales como: una elevada expresión de p16 y p21 (González-Gualda et al., 2021), una mayor actividad de la enzima beta-galactosidasa (Debacq-Chainiaux et al., 2009a), la pérdida de la heterocromatina perinuclear (González-Gualda et al., 2021), alteraciones en la morfología nuclear, expansión celular (Moujaber et al., 2019), expansión nucleolar (Buchwalter & Hetzer, 2017), entre otras. En el presente trabajo evaluamos el efecto anti-senescente de la Cloroquina, un fármaco con un nuevo reposicionamiento en el campo del envejecimiento y la senescencia. Anteriormente en el grupo de trabajo del Dr. Bulmaro Cisneros Vega y mediante ensayos realizados por el Dr. Ian Alain García Aguirre, se describió el efecto anti-senescente de la Cloroquina en un modelo de envejecimiento prematuro y fisiológico. Debido a lo antes mencionado, nos cuestionamos si la Cloroquina tiene un efecto anti-senescente más generalizado, es decir; llevando a cabo pruebas en un modelo alejado del envejecimiento, en donde nosotros induzcamos a senescencia, esto a través de la

hiperacetilación de las histonas mediante el tratamiento con Butirato de Sodio en fibroblastos provenientes de un individuo aparentemente sano de 20 años.

### **1.3 Formulación del problema**

¿La Cloroquina mantiene su efecto anti-senescente en un modelo de senescencia inducida mediante la hiperacetilación de las histonas?

### **1.4 Justificación**

A la senescencia celular le acompaña un desbalance en la producción de distintas citocinas, distintos cambios morfológicos, la pérdida de la heterocromatina que altera el perfil de expresión génica, alteraciones en la arquitectura nuclear lo cual desprotege al contenido nuclear y lo hace más susceptible a diversos tipos de daños, el daño al ADN, la expansión nuclear, estrés oxidativo, etc. Todo esto contribuye a la generación de un estado crónico de daño en donde la célula en cuestión no muere, pero tampoco responde a mitógenos. Debido a que una célula senescente no muere, cambia el microambiente en el que se encuentra, incluso enviando citocinas a células de forma parácrina y exocrina, las cuales pueden llevar a éstas a un estado senescente, al mismo tiempo esto puede llevar a alteraciones en el tejido en donde se encuentren éstas células senescentes, lo que a su vez puede comprometer la función del órgano en el que se encuentren, llevando al desarrollo de distintas patologías como cáncer, diabetes, neurodegeneración y disfunción cardiovascular. Ante lo antes mencionado, surge nuevas estrategias terapéuticas las cuales tienen como objetivo eliminar (Senolíticos), cambiar (Senomórficos) o prevenir

(compuestos anti-senescentes) el fenotipo senescente. La Cloroquina ha demostrado tener actividad anti-senescente en un modelo de envejecimiento prematuro y fisiológico, sin embargo; la Cloroquina podría tener un mayor espectro en cuanto al contexto en el que podría ejercer su actividad anti-senescente, llevándolo a un efecto más generalizado, es decir, alejado del contexto de envejecimiento, uno de éstos es la senescencia inducida. El posible efecto anti-senescente de la Cloroquina en diversos contextos en los que el envejecimiento no es preponderante podría abrir las puertas al tratamiento de distintas patologías que involucren a las células senescentes como una causa; diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, etc.

## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1. Objetivo general**

Estudiar el efecto anti-senescente de la Cloroquina en un modelo *in vitro* de senescencia inducida mediante la hiperacetilación de las histonas.

### **1.5.2. Objetivos específicos**

- Generar un modelo de senescencia inducida empleando fibroblastos a través de la hiperacetilación de las histonas al tratar con Butirato de Sodio.
- Estudiar el efecto Anti-senescente de la Cloroquina en el modelo de fibroblastos inducidos a senescencia mediante la evaluación de distintos fenotipos asociados a la senescencia:

- Evaluar la actividad de la beta galactosidasa asociada a senescencia en fibroblastos normales inducidos a senescencia al tratar con la Cloroquina.
- Analizar la morfología nuclear aberrante en fibroblastos normales inducidos a senescencia al tratar con la Cloroquina.
- Estudiar la pérdida de la heterocromatina en fibroblastos normales inducidos a senescencia al tratar con la Cloroquina.
- Evaluar la morfología nucleolar en fibroblastos normales inducidos a senescencia al tratar con la Cloroquina.
- Analizar la morfología celular en fibroblastos normales inducidos a senescencia al tratar con la Cloroquina.

## **1.6 Alcances y limitaciones**

### **1.6.1 Alcances**

Este proyecto se enfoca en la evaluación de la actividad anti-senescente de la Cloroquina en fibroblastos provenientes de un individuo aparentemente sano de 20 años, los cuales previamente fueron inducidos a senescencia mediante el tratamiento con Butirato de Sodio, cuyo tratamiento induce la hiperacetilación de las histonas.

## **1.6.2 Limitaciones**

El proyecto estará centrado a ensayos *in vitro*, los cuales son un punto de partida para la futura experimentación con algún tipo de modelo animal, lo cual por el momento no se abordará debido a la falta de datos experimentales más generalizados en modelos *in vitro*. Algo que el presente trabajo pretende cubrir.

## **1.7 Delimitaciones**

### **1.7.1 Delimitación espacial**

Proyecto realizado en el Laboratorio de Genética Humana, en el departamento de Biología Molecular, perteneciente al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, el cual se encuentra ubicado en la Avenida Instituto Politécnico Nacional, #2508, en la Delegación Gustavo A. Madero, en la localidad San Pedro Zacatenco, con código postal #07360, Ciudad de México, México.

### **1.7.2 Delimitación temporal**

El tiempo utilizado para cumplir con los objetivos de este proyecto de investigación fue de 1 año.

### 1.7.3 Delimitación conceptual

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se contemplaron los siguientes grupos de conocimientos:

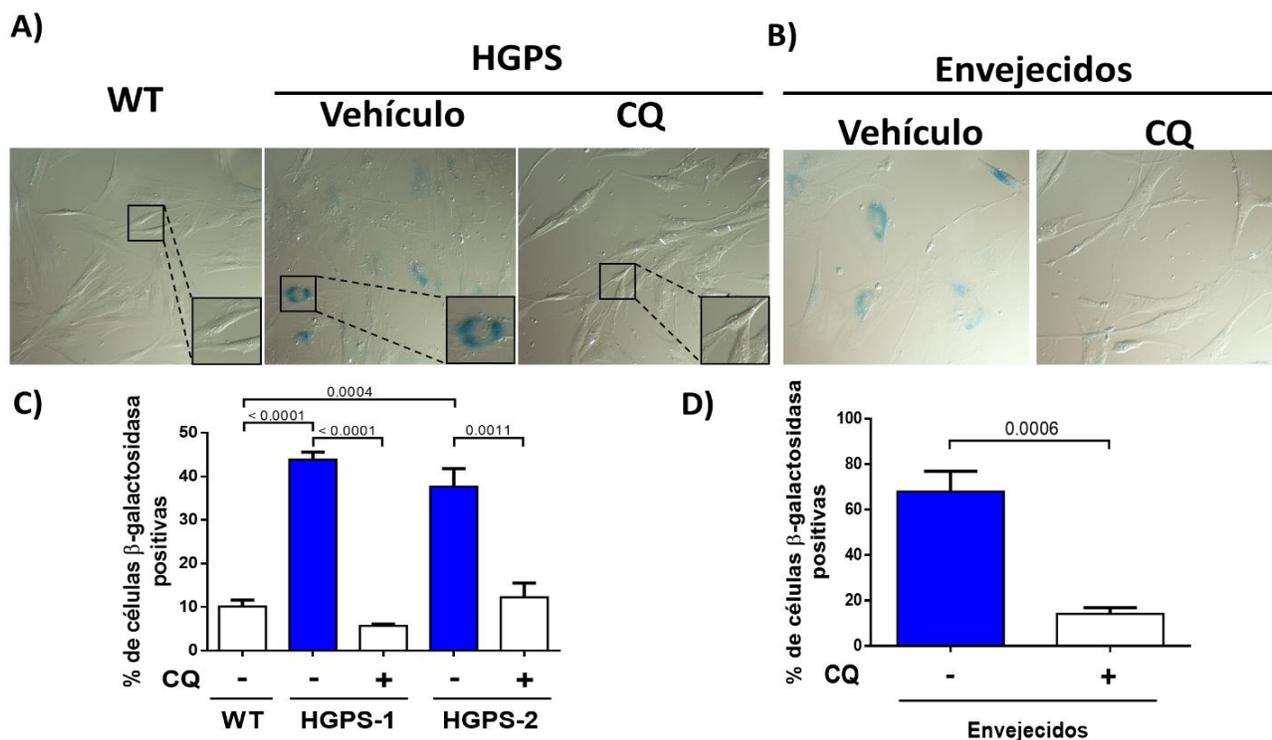
- La Senescencia Celular
- Modelos *in vitro* de senescencia inducida y no inducida
- Compuestos anti-senescentes
- Fenotipos en una célula senescente
- Inmunofluorescencia
- Análisis de microscopia confocal
- Análisis morfométrico de células mediante uso del software ImageJ

## 2. Marco referencial

### 2.1 Antecedentes

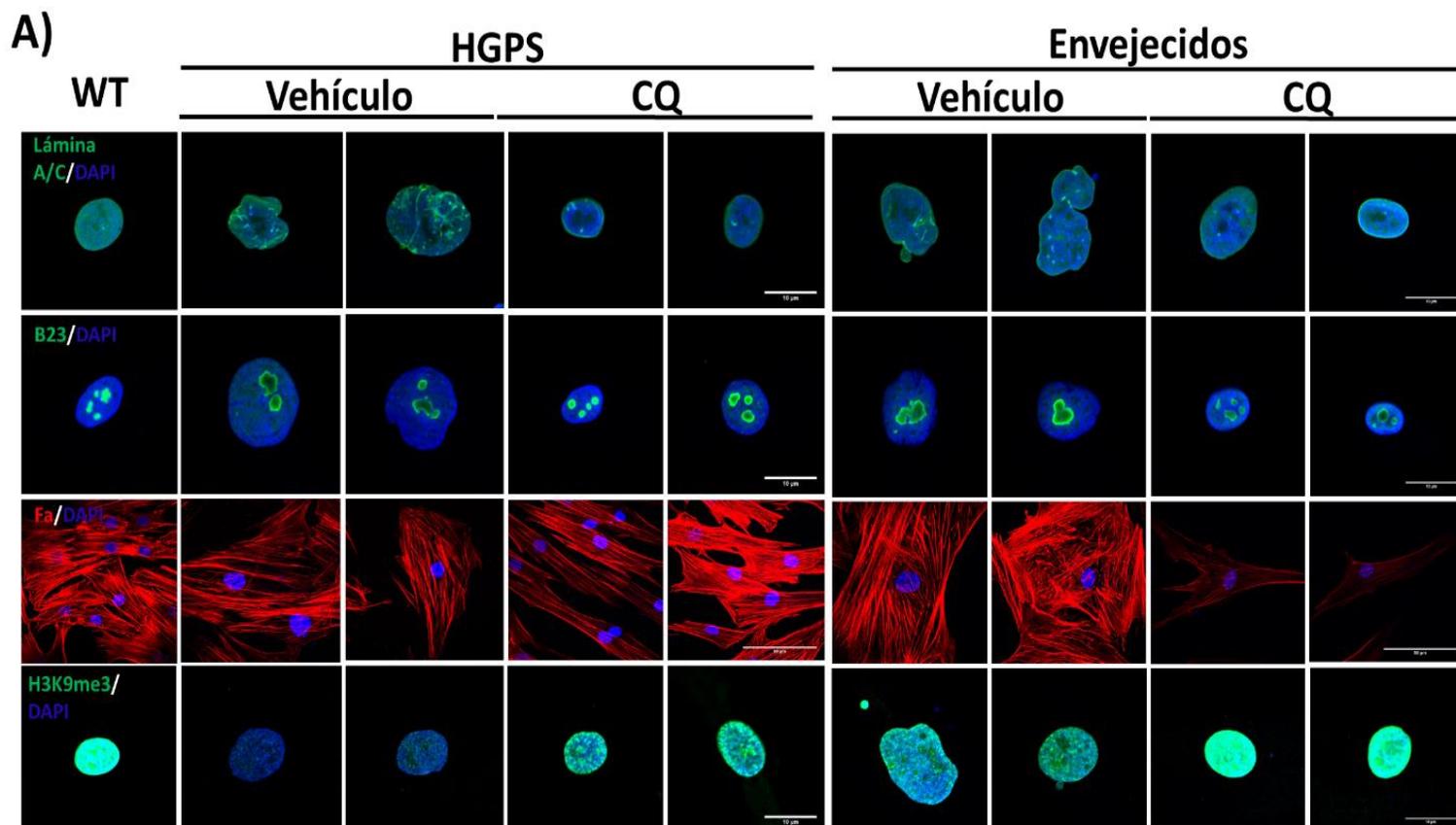
Resultados aún no publicados en el grupo del Dr. Bulmaro Cisneros V. y realizados por el Dr. Ian A. García A. demostraron que la Cloroquina tiene un efecto anti-senescente. Esto fue demostrado de manera *in vitro* empleando un modelo de fibroblastos senescentes debido a envejecimiento prematuro (fibroblastos provenientes de un paciente con el Síndrome de Progeria Hutchinson-Gilford (HGPS), en donde una de las principales características es la expresión de una proteína aberrante llamada Progerina que lleva a las células a un estado senescente) y fisiológico (fibroblastos provenientes de un individuo geriátrico de 96 años). De esta manera, los efectos benéficos de la Cloroquina fueron demostrados en los fibroblastos senescentes debido a envejecimiento prematuro y fisiológico, mediante el análisis de distintos marcadores de senescencia, dentro de los cuales se destaca que la Cloroquina redujo el porcentaje de células con actividad de la beta-galactosidasa asociada a la senescencia, mejoró la morfología nuclear, recuperó la marca de la Heterocromatina H3K9me3, redujo la expansión nucleolar y celular ( Fig. 1-2). Estos resultados en conjunto demuestran el efecto anti-senescente de la Cloroquina, sin embargo; las bondades de la Cloroquina se encuentran atadas a un contexto de senescencia asociada al envejecimiento. La pregunta es si las bondades de la Cloroquina pueden tener un mayor espectro y ejercer el mismo efecto en un modelo celular de senescencia inducida alejado del envejecimiento, un ejemplo de uno de estos modelos es la inducción a senescencia mediante la hiperacetilación de las histonas al tratar con Butirato de sodio (Jimenez-Gutierrez et al., 2020). Debido a lo antes mencionado, surge la necesidad de investigar si la Cloroquina mantiene su efecto anti-senescente incluso en un modelo de senescencia inducida y alejado del envejecimiento, lo

cual nos ayudará a entender de una mejor manera que tan escalables pueden ser las bondades de la Cloroquina, en cuanto a su efecto terapéutico anti-senescente.



**Figura 1. El tratamiento con CQ disminuyó el porcentaje de células senescentes en fibroblastos con envejecimiento prematuro y fisiológico.**

**A-B)** Fibroblastos WT, HGPS y envejecidos fueron tratados con 50  $\mu$ M de CQ o sólo con PBS ( Vehículo) durante 48h. La actividad de la beta galactosidasa fue evaluada como se describe en el apartado de materiales y métodos. Se muestran imágenes representativas. **C-D)** El porcentaje de las células senescentes fue calculado a partir de 3 experimentos independientes (n>300 células para cada condición).



**Figura 2. El tratamiento con CQ alivia las marcas de senescencia.**

A) Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta, donde los fibroblastos WT, HGPS, y envejecidos (96 años) se tiñeron con anticuerpos contra la Lamina A/C para observar morfología nuclear, B23 para analizar la morfología nucleolar y la histona H3K9me3 para evaluar la heterocromatina, así mismo; se tiñó el núcleo y el citoesqueleto con DAPI y faloidina respectivamente. Previo al análisis por microscopia confocal.

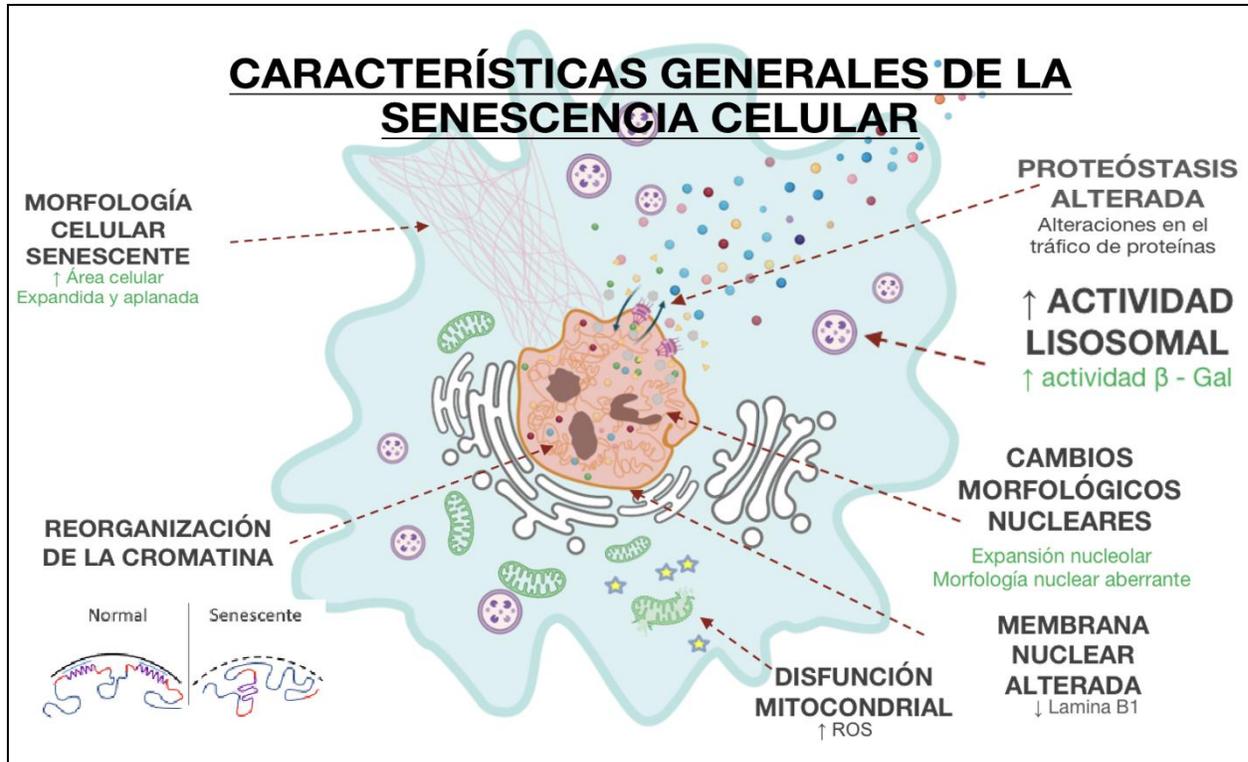
## 2.2 Marco teórico

### 2.2.1 Senescencia celular

La senescencia celular se define como el mecanismo por el cual una célula entra en un proceso de detención permanente del ciclo celular perdiendo la respuesta ante señales mitogénicas, lo cual puede ser inducido por distintos tipos de estrés, además, las células senescentes permanecen metabólicamente activas (González-Gualda et al., 2021).

Existen diversos tipos de estímulos o de estresores que pueden promover la senescencia celular, dentro de los inductores más comunes se encuentran: el agotamiento replicativo, las radiaciones ionizantes y no ionizantes, los fármacos genotóxicos, el estrés oxidativo y los agentes desmetilantes y acetilantes (Hernandez-Segura, Brandenburg, et al., 2018). De esta manera, podemos clasificar a éstos inductores en tres principales grupos: senescencia prematura, inducida por estrés o senescencia replicativa (Kohli et al., 2021).

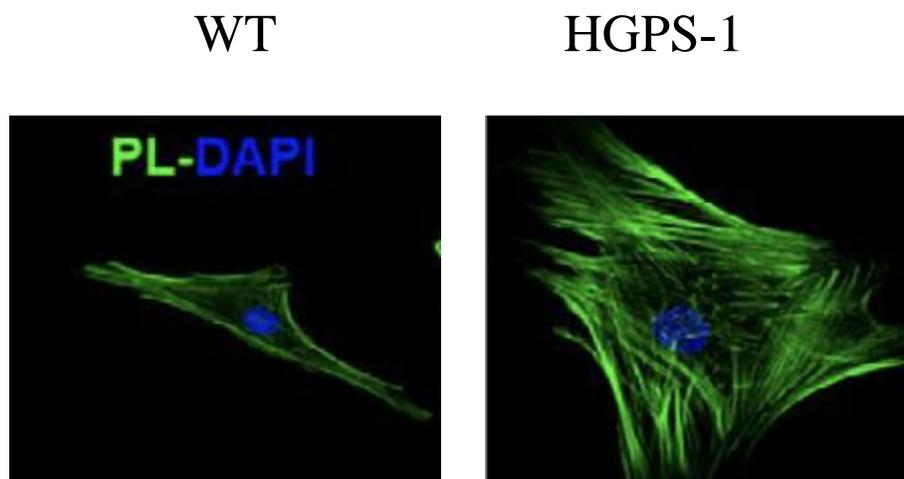
Es un hecho que, para poder estudiar la senescencia celular, es de suma importancia poder identificar a una célula senescente, sin embargo, hasta el día de hoy no se ha logrado identificar un marcador de senescencia universal. Ante surge el estudio y la identificación de una batería amplia de distintos marcadores, los cuales nos permiten estudiar e identificar a las células senescentes (González-Gualda et al., 2021). Dichas características distintivas se muestran en la **figura 3** y se describen en los siguientes apartados.



**Figura 3. Características generales de la senescencia celular.** Modificado apartir de ( Zabaleta,2022)

### 2.2.2 Morfología celular senescente

Una de las principales características de una célula senescente es una morfología celular senescente, es decir; una morfología celular expandida y aplanada, lo cual se ha asociado a un aumento en la hipertrofia celular la cual puede explicarse por dos razones: una elevada actividad metabólica y a una elevada síntesis de las proteínas (**Fig. 3**) (González-Gualda et al., 2021). En la figura 4 se muestra un ejemplo de éste fenotipo en fibroblastos senescentes provenientes de un paciente con una patología de envejecimiento prematuro (HGPS), (García-Aguirre et al., 2019), (Zavaleta, 2022).



**Figura 4. Morfología celular en fibroblastos primarios de un individuo con envejecimiento patológico.**

Morfología celular en fibroblastos provenientes de un individuo sano (izquierda) y de un individuo con HGPS por sus siglas en inglés (Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome) (derecha). Las células se marcaron con faloidina para visualizar el citoesqueleto de actina. Tomada y modificada de (García-Aguirre et al., 2019)

### 2.2.3 Morfología nuclear

Durante varios años distintos grupos de investigación en trabajos centrados en la senescencia, mostraban resultados en donde había una correlación entre una célula senescente con alteraciones morfológicas nucleares de la misma, sin embargo, hasta no hace mucho en el 2022 fue que Indra Heckenbach y colaboradores publicaron un estudio en donde se demuestra que las alteraciones morfológicas nucleares pueden predecir con una exactitud cercana al 95% el fenotipo de senescencia celular, un trabajo el cual fue realizado con diferentes tipos celulares, pero que dentro de los cuales se destacan para el presente trabajo los estudios demostrados con fibroblastos humanos y de envejecimiento prematuro (Heckenbach et al., 2022).

#### **2.2.4 Morfología nucleolar**

En el 2017 Abigail Buchwalter<sup>1</sup> & Martin W. Hetzer demostraron en un trabajo muy interesante una correlación entre la expansión nucleolar y el envejecimiento prematuro. Esto fue demostrado en un estudio en el cual se detalla que la no represión en el ADN<sub>r</sub> (ADN ribosomal) provoca un aumento en la transcripción del ARN<sub>r</sub>, lo cual a su vez va acompañado de un incremento de ARNs ribosomales como los maduros 28S y 18s, esto a su vez; se correlaciona con un aumento del área nucleolar, fenotipo llamado expansión nucleolar y también se asocia con una disminución en el número de nucleolos por célula. Aunque una correlación directa con la senescencia no fue abordada, cabe señalarse que también se describieron alteraciones nucleolares en fibroblastos provenientes de individuos de edad avanzada o geriátricos. Aunado a esto en el grupo de investigación del Dr. Bulmaro Cisneros mediante resultados aún no publicados y resultados que también engloban los de este proyecto, se ha observado que las células senescentes tienden a tener nucleolos más grandes, es decir, expansión nucleolar, además de una reducción en el número de nucleolos por célula. Aunque faltan esfuerzos para tener una correlación directa con el proceso de senescencia, hay evidencia que sugiere esta íntima correlación, si bien no puede ser empleado como tal como un marcador de senescencia, si nos otorga una idea más global de las alteraciones celulares que una célula senescente puede tener (Buchwalter & Hetzer, 2017).

#### **2.2.5 Actividad lisosomal**

Una de las principales características y quizá la más empleada para identificar y estudiar a una célula senescente, es un aumento en la actividad lisosomal, la cual puede analizarse mediante

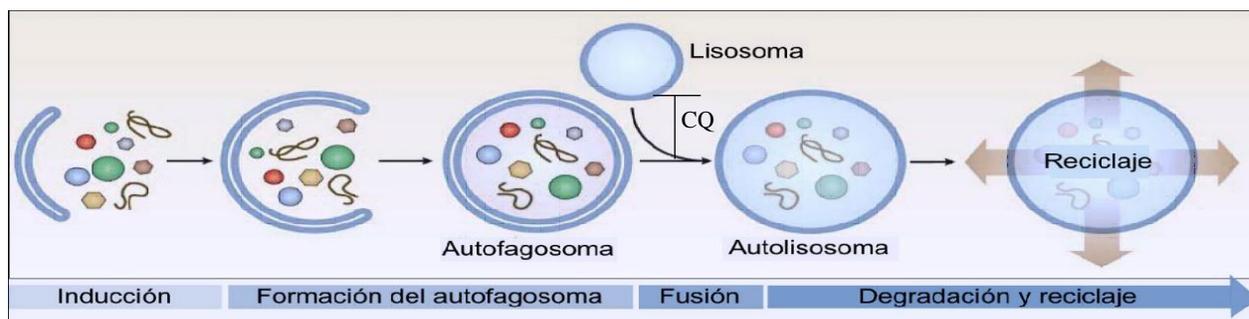
la evaluación de la actividad de la enzima beta-galactosidasa asociada a senescencia, en donde el sistema es forzado por encima del pH óptimo de ésta enzima (pH 4), realizando el estudio a pH (6), en donde la actividad enzimática será tan alta que aún dos puntos por arriba del pH óptimo seguirá siendo funcional para poder degradar el glucósido X-gal y con ello producir un precipitado de color azul. Por lo tanto, las células azules dentro de este ensayo serán muy probablemente las células senescentes. Cabe mencionarse que el estudio tiene distintas limitantes y diversas variables a considerar, las cuales fueron tomadas en cuenta para el presente estudio, además, cabe mencionarse que para resolver estas dificultades se utilizaron otros marcadores de senescencia, como los ya descritos en éste apartado (Debacq-Chainiaux et al., 2009).

### **2.2.6 Butirato de Sodio**

El butirato de sodio es la sal de sodio del butirato con potencial actividad antineoplásica. El butirato, es un ácido graso de cadena corta que se une competitivamente a los sitios de zinc de las histonas desacetilasas (HDAC) de clase I y II. Esta unión induce la hiperacetilación de las histonas, lo que da como resultado un estado de la cromatina más relajada o eucromatina. La accesibilidad mejorada de la cromatina a los complejos reguladores de la transcripción conduce a una mayor activación transcripcional de varios genes suprimidos epigenéticamente. Además, el butirato tiene la capacidad de inducir una detención del ciclo celular en las fases G1 o G2/M (PubChem, s. f.). Butirato de sodio ha sido analizado con más de 50 inductores químicos de senescencia celular y se ha evidenciado que presentan estados similares a la senescencia, clasificándolo en un modificador epigenético que inhibe la histona desacetilasa (Petrova et al., 2016).

### 2.2.7 Cloroquina

La Cloroquina se descubrió en 1934, es un compuesto que ha sido utilizado como antimalárico desde esa fecha. Además de ser un fármaco antipalúdico, la Cloroquina ha demostrado ser un compuesto eficiente para detener el proceso de autofagia mediante su capacidad para inhibir la fusión de los autofagosomas con los lisosomas. Por otro lado, la Cloroquina ha sido utilizada para tratar enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso. En los últimos años se han realizado estudios que sugieren que la Cloroquina podría tener efectos antitumorales mediante la supresión de autofagia. En 2018 un grupo de investigadores confirmaron que el mecanismo de acción de la Cloroquina en la autofagia es que este fármaco está bloqueando la fusión de los autofagosomas con los lisosomas. (Mauthe et al., 2018)



**Figura 5. Modelo de acción de la Cloroquina en autofagia.** Tomada de (Autofagia,s.f.)

### 2.3 Marco conceptual

- **Senescencia Celular:** Arresto permanente en el ciclo celular, en el cual la célula no responde a mitógenos y en donde la misma se caracteriza por la presencia de distintos fenotipos celulares, tales como: Aumento del área celular (expandida y aplanada), reorganización de la cromatina, proteóstasis alterada, aumento de la actividad lisosomal, cambios morfológicos nucleares, membrana nuclear alterada y disfunción mitocondrial (Hernandez-Segura, Nehme, et al., 2018).
- **Autofagia:** Es un mecanismo de citoprotección el cual se activa ante distintos tipos de estrés, mediante el cual se degradan organelos y proteínas de vida media larga. La autofagia correctamente activada proporciona energía para apoyar el metabolismo celular cuando las células viven bajo estrés, mientras que la autofagia sobre activada puede llevar a la muerte celular (Tingting et al., 2019).
- **Evaluación de la actividad de la Beta-galactosidasa asociada a la senescencia:** Ensayo empleado para estudiar e identificar a una célula senescente, basado en el aumento de la actividad lisosomal. (Debacq-Chainiaux et al., 2009).

- **Butirato de Sodio:** Ácido graso de cadena corta, el cual se une de manera competitiva a los sitios de zinc de las histonas desacetilasas (HDAC) de clase I y II. Induce la detención en el ciclo celular en la fase G1 o G2/M (PubChem, s. f.). Compuesto que induce una hiperacetilación de las histonas lo cual lleva a las células a senescencia.
- **Cloroquina:** Compuesto utilizado para tratar enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide y el lupus. Además, se ha descrito que inhibe el flujo autofagia ya que bloquea la unión del autofagosoma con el lisosoma, impidiendo que se forme el autolisosoma (Mauthe et al., 2018).
- **Inmunofluorescencia:** Técnica comúnmente empleada para estudiar la distribución de distintas proteínas. En éste proyecto empleamos la inmunofluorescencia indirecta la cual consiste en utilizar un anticuerpo marcado por un fluorocromo el cual se utiliza para reconocer el anticuerpo primario y seguidamente estas muestras marcadas son examinadas por microscopia confocal (Hernández Ramírez & Cabiedes, 2010).

## 2.4 Marco legal

Este trabajo presenta el siguiente marco legal sujeto a la normatividad del país de México y los cuales de rigen en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) de la ciudad de México.

- Norma oficial Mexicana NOM-004-STPS-1999, Sistemas de protección y dispositivos de seguridad en la maquinaria y equipo que se utilice en los centros de trabajo.
- Norma Oficial Mexicana NOM-006-STPS-2014, Manejo Y Almacenamiento De Materiales-Condicionas De Seguridad Y Salud En El Trabajo.
- Norma Oficial Mexicana NOM-028-STPS-2012, Sistema Para La Administración Del Trabajo-Seguridad En Los Procesos Y Equipos Críticos Que Manejen Sustancias Químicas Peligrosas.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental- salud ambiental- Residuos peligrosos biológico, infecciosos, clasificación y especificaciones de manejo.
- Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSA1-1993, Que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo. Generalidades.

### **3. Diseño metodológico**

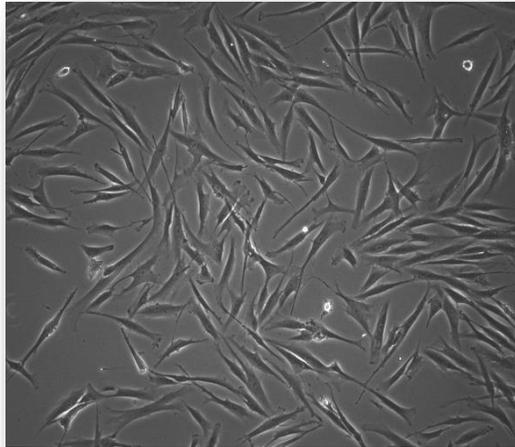
#### **3.1 Tipo de investigación**

En esta investigación según el propósito es puro, debido a que se buscó determinar el efecto anti-senescente de Cloroquina en los fibroblastos inducidos a senescencia. De igual forma, fue una investigación de nivel descriptivo, ya que se evaluó el tipo de senescencia inducida en los fibroblastos inducidos y tratados con Cloroquina, además de ser una estrategia de tipo experimental donde se planteó una hipótesis de los efectos de Cloroquina en células inducidas que se comprobó con los distintos ensayos planteados.

#### **3.2 Población y muestra**

##### **3.2.1 Población**

Cultivos primarios de fibroblastos de piel de un individuo aparentemente sano de 20 años de edad adquiridos del Instituto Coriell # Catalogo GM03440. (Fig. 6)



**Figura 6. Microscopia de campo claro donde se representa un cultivo celular de Fibroblastos de piel, GM03440, de un individuo de 20 años.** Cortesía del Laboratorio 12 , genética Humana. Dr Bulmaro Cisneros V, y Pablo Gómez, cinvestav.

### 3.2.2 Muestra

Como parte del objeto de estudio se utilizaron Fibroblastos de piel, GM03440, inducidos a senescencia mediante Butirato de Sodio y tratados con Cloroquina para estudiar diversas características tales como: morfología nuclear, morfología nucleolar, Evaluar la actividad de la beta galactosidasa asociada a senescencia y pérdida de heterocromatina.

### 3.3 Hipótesis

La Cloroquina tendrá un efecto anti-senescente en un modelo *in vitro* de fibroblastos inducidos a senescencia mediante la hiperacetilación de las histonas.

### **3.4 Variables**

#### **3.4.1 Dependientes**

- Porcentaje de células senescentes inducidas por Butirato de Sodio
- Morfología celular en fibroblastos normales inducidos a senescencia al tratar con la Cloroquina.
- Área celular y nucleolar en fibroblastos normales inducidas a senescencia y tratados con cloroquina
- Intensidad relativa de la heterocromatina en células inducidas a senescencia y tratadas con cloroquina

#### **3.4.2 Independientes**

- Concentración de Butirato de Sodio para la Inducción a senescencia celular
- Días de inducción a senescencia celular

### 3.5 Fases de la investigación

#### 3.5.1 Cultivo celular

Se utilizaron fibroblastos primarios provenientes de piel de un individuo de 20 años aparentemente sano y adquiridos del instituto Coriell (GMO3440, Coriell Institute for Medical research, New Jersey, EE. UU.). Los fibroblastos fueron cultivados en medio MEM (Mínimum Essential Medium Eagle # M0268-1L) el cual se suplementó con suero fetal bovino al 10% (v/v), penicilina a 50 U/mL, estreptomycin 50µg/mL y finalmente con piruvato de sodio. Así mismo las células fueron incubadas a 37°C a una atmosfera con una concentración al 5% de. Los cultivos de fibroblastos se utilizaron entre los pases 3-10.

#### 3.5.2 Inducción a senescencia

Para lleva a cabo la inducción de senescencia de los fibroblastos, éstos fueron sembrados sobre cubre objetos en cajas Petri de 35 mm, al llegar a la confluencia deseada fueron tratados con Butirato de Sodio 5 mM (NaBu , Sigma-Aldrich) , diluido con PBS o sólo vehículo durante 3 y 5 días. Mediante los siguientes Cálculos:

Partiendo de una solución Stock = [500mM]

$$(C1)(V1) = (C2)(V2)$$

$$(500mM)(V1) = (5mM)(2mL)$$

$$(V1) = \frac{(5mM)(2mL)}{(500mM)}$$

$$V1 = 0,02mL = 20\mu L$$

### 3.5.3 Tratamiento con Cloroquina

Para llevar a cabo el tratamiento de los fibroblastos inducidos a senescencia mediante Butirato de Sodio 5 mM (NaBu , Sigma-Aldrich) , diluido con PBS o sólo vehículo durante 3 días y estos se trataron por 48 h con CQ a una concentración de 50  $\mu$ M obtenido de los siguientes cálculos.

$$50\text{mM} \rightarrow 5.0 \times 10^4$$

$$(C1)(V1) = (C2)(V2)$$

$$(50\text{mM})(V1) = (50\mu\text{M})(2\text{mL})$$

$$(50000\mu\text{M})(V1) = (50\mu\text{M})(2\text{mL})$$

$$(V1) = \frac{(50\mu\text{M})(2\text{mL})}{(50000\mu\text{M})}$$

$$V1 = 0,002 \text{ mL} = 2 \mu\text{L}$$

### 3.5.4 Caracterización de células senescentes mediante el análisis de la $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- $\beta$ -gal)

El cultivo celular de fibroblastos se sembró y trató para las distintas condiciones acordadas sobre cubreobjetos hasta alcanzar la confluencia deseada del 70-80% y seguidamente se fijaron y tiñeron siguiendo el protocolo estándar del kit “Senescent Cell Histochemical Staining Kit” (CS0030-1KT) de Sigma-Aldrich. La reacción de este ensayo está dirigida para detectar la

actividad de  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia a un pH de 6. X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactopiranosido) el cual es un compuesto orgánico, se forma estructuralmente, mediante un grupo indol y enlazado covalentemente a un galactósido. Donde X-gal se hidroliza por la  $\beta$ -galactosidasa, pasando a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, siendo este último oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, compuesto azul insoluble cuya detección indica actividad positiva para  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia. Las células se contabilizaron y analizaron en el microscopio de campo claro.

### **3.5.5 Inmunofluorescencia indirecta y microscopia confocal.**

El cultivo celular de fibroblastos (figura 6) se sembró y trató para las distintas condiciones acordadas sobre un cubreobjetos hasta alcanzar una confluencia deseada del 70-80% aproximadamente, seguidamente al cultivo celular se les retiró el medio MEM, se lavaron 2 veces con solución amortiguadora de fosfato salino (PBS), posteriormente estas células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 minutos, ya fijadas se bloquearon y permeabilizaron con Buffer IF (Tritón; SDS; BSA) Durante 10 minutos. Seguidamente el anticuerpo primario se incubó en la caja húmeda durante toda la noche a 4°C y el anticuerpo secundario se aplicó 1 hora a temperatura ambiente en la caja húmeda cubierto de la luz. En todos los ensayos se aplicó DAPI a una concentración de 1:500 durante 10 minutos a temperatura ambiente y cubierto de la luz. Finalmente se montaron las preparaciones en portaobjetos aplicando 5 $\mu$ L de VectaShield para evitar el fotoblanqueamiento. se fijaron los cubreobjetos con esmalte transparente y seguidamente se analizó las preparaciones por microscopio confocal (Nikon, i, Japón). Donde se observó las distintas marcas celulares como: Lamina A/C, B23, Faloidina, H3K9me3.

### 3.5.6 Anticuerpos

Se utilizaron anticuerpos comerciales los cuales se describen a continuación en la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Anticuerpos utilizados en el ensayo de Inmunofluorescencia indirecta.

<b>Proteína</b>	<b>Anticuerpo primario/ Marca, # de catálogo</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Dilución IF</b>
<b>Lamina A/C</b>	Monoclonal de ratón anti-lámina A/C Santa cruz, Sc-517580	Anti-ratón verde	1:200
<b>B23</b>	Monoclonal de ratón anti-B23 (NPM1) InvitroGen, 325200	Anti-ratón verde	1:80
<b>H3K9me3</b>	Monoclonal de conejo anti-HP1- $\alpha$ Abcam, Ab8898	Anti-conejo verde	1:500

### 3.5.7 Compuesto (Cloroquina)

Se evaluó la posible actividad anti-senescente que podría presentar el compuesto llamado Cloroquina el cual como se ha descrito es un fármaco antipalúdico utilizado para tratar distintas infecciones susceptibles por *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. falciparum*. Además, es utilizado como tratamiento de la artritis reumatoide, profilaxis del virus Zika y la amebiasis extraintestinal. Este compuesto actualmente se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento de COVID-19 (*Chloroquine*, 2016).(Mauthe et al., 2018)

**Tabla 2.** Descripción de la Cloroquina.

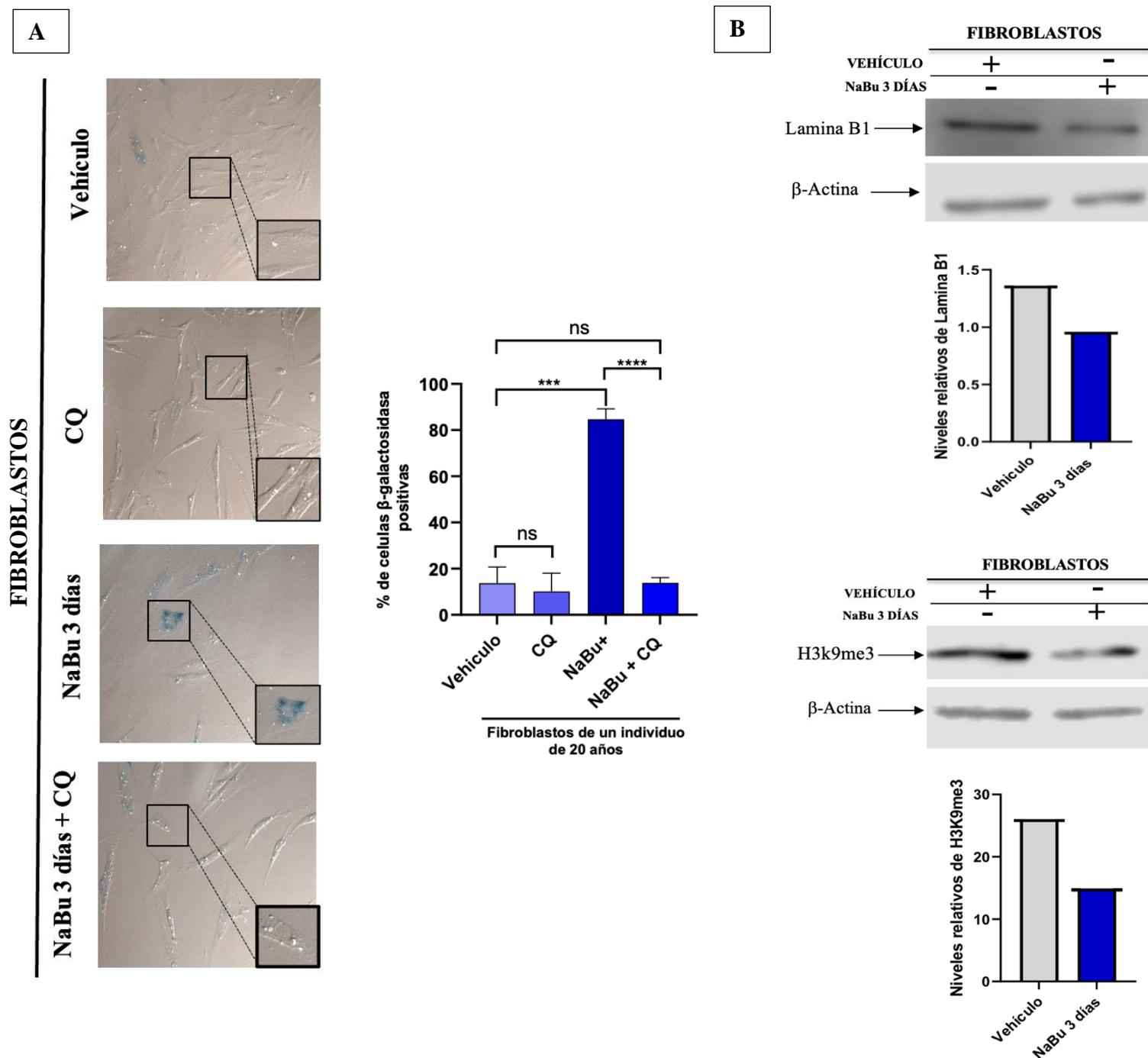
<b>CLOROQUINA</b>	
<b>Nombre del producto</b>	Difosfato de cloroquina
<b>Referencia</b>	C6628
<b>Marca</b>	Sigma
<b>Formula</b>	$C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$
<b>Peso molecular</b>	515.86 g/mol

## 4. Resultados y discusiones

### 4.1 Efecto anti-senescente generado por la Cloroquina en un modelo *in vitro* de senescencia inducida.

Para evaluar si la cloroquina tiene un efecto anti-senescente más generalizado, nosotros analizamos si el tratamiento con la Cloroquina evita o previene distintos fenotipos celulares asociados a senescencia en un modelo *in vitro* distanciado del envejecimiento, es decir; empleando un modelo de senescencia inducida a través de una inducción de la acetilación de las histonas mediante el tratamientos con Butirato de Sodio. Los fibroblastos normales que fueron tratados con NaBu durante 3 días a una concentración 5 mM, presentaron fenotipos característicos de la senescencia, tales como: un aumento en el porcentaje de células con actividad de beta-galactosidasa asociada a senescencia y una disminución en la expresión de la Lámina B1 y H3k9me3 (**Fig. 7A y 7B**). De manera muy interesante al tratar con la Cloroquina 24h después de la inducción a senescencia y dejando el compuesto durante 48 h, se pudo observar una drástica disminución en el porcentaje de células senescentes, una reducción cercana al 60%, además, no se observaron cambios significativos al tratar los fibroblastos normales solamente con la Cloroquina.

En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento farmacológico con la Cloroquina disminuye el porcentaje de células senescentes incluso en un modelo de senescencia inducida, sugiriendo así un efecto anti-senescente más generalizado y no exclusivo de un modelo asociado al envejecimiento.



**Figura 7. Identificación de células senescentes.**

A) Imágenes representativas del ensayo de β-galactosidasa de 3 experimentos independientes (n=150 células). B) Los lisados de fibroblastos GM03440 previamente inducidos a senescencia durante 3 días o el vehículo solo, se analizaron por Western Blot utilizando anticuerpos contra Lámina B1, H3K9me3 y actina (control de carga). Se muestran las cuantificaciones de los niveles de la lámina B1 (panel superior) y H3K9me3 (panel inferior).

#### **4.2 El tratamiento con CQ disminuye el número de células con alteraciones morfológicas asociadas a senescencia.**

Con la finalidad de estudiar de manera más fina el efecto de la Cloroquina sobre la senescencia celular, diferentes fenotipos fueron evaluados, uno de ellos la morfología nuclear senescente. Como se ha descrito anteriormente, las células inducidas a senescencia presentaron núcleos con diversas alteraciones morfológicas, tales como; invaginaciones y protuberancias (**Fig. 8A y 8B**). Interesantemente, el tratamiento con la Cloroquina 24h después de la inducción a senescencia y dejando el compuesto durante 48h, generó una reducción en el porcentaje de células con distintas aberraciones nucleares (**Fig.8A y 8B**).

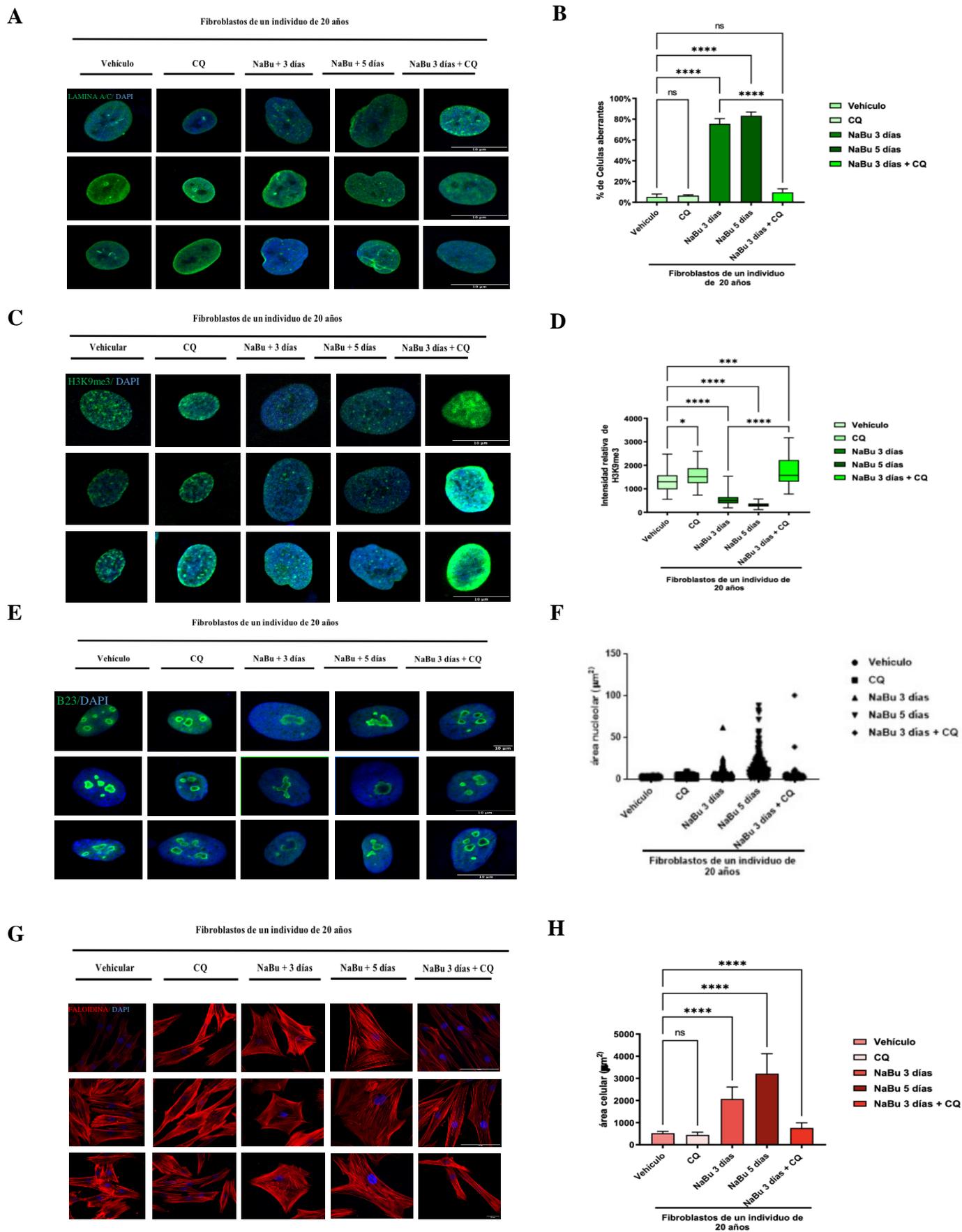
Dado que existe una estrecha relación entre la morfología nuclear con el estado de la cromatina y la pérdida de la cromatina a su vez se correlaciona con la senescencia celular, decidimos evaluar la organización de la cromatina mediante el análisis de la marca de heterocromatina H3K9me3. Los fibroblastos inducidos a senescencia presentaron una disminución en la marca H3K9me3 como se ha reportado anteriormente (**Fig. 8C y 8D**). Además, el tratamiento con la Cloroquina 24h después de la inducción a senescencia y dejando el compuesto durante 48h, ayudó a la recuperación de la tinción perinuclear de la marca de heterocromatina H3K9me3 (**Fig. 8C y 8D**).

De igual manera, se ha descrito que la organización de la cromatina tiene un impacto en la estructura y función nucleolar, en donde una pérdida de la heterocromatina se asocia a la expansión de los nucleolos y esto a su vez contribuye al desarrollo de la senescencia. Como se ha

descrito anteriormente los fibroblastos inducidos a senescencia presentaron nucleolos expandidos y una reducción en el número de estos fue observada (**Fig.8E y 8F**). Notablemente, el tratamiento con la Cloroquina alivió el fenotipo de expansión nuclear al reducir el área de estos y al aumentar el número de los nucleolos en células que previamente fueron inducidas a senescencia con NaBu (**Fig. 8E y 8F**).

Debido a que la expansión nuclear se ha asociado con el desarrollo de una morfología celular senescente, llevando a una hipertrofia celular. Como se ha descrito, los fibroblastos inducidos a senescencia presentaron una morfología celular senescente, es decir un aumento en el área celular (**Figura 8G y 8H**). Sin embargo, al tratar con la Cloroquina se alivió la morfología celular senescente, al observarse una reducción en el área celular (**Figura 8G y 8H**).

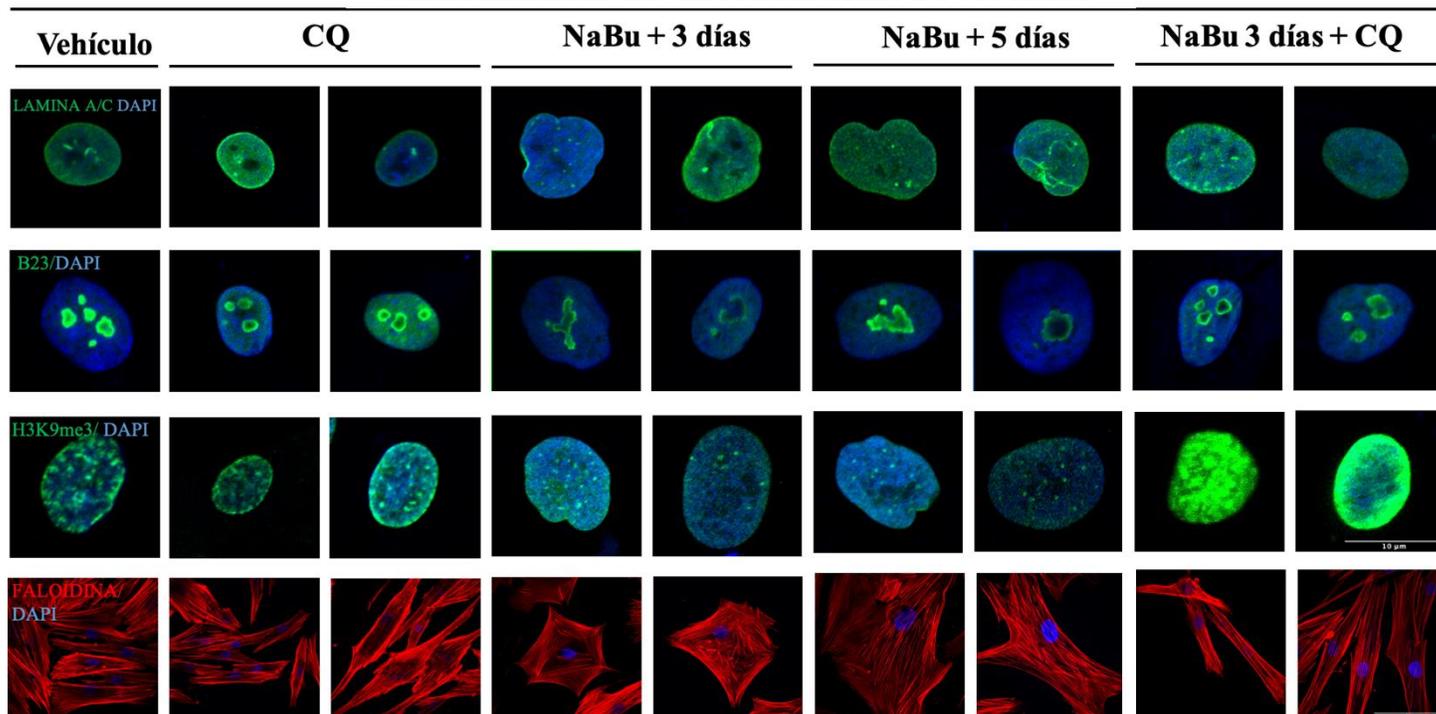
(**Figura 9**) recopila a manera de resumen los resultados antes descritos. En conjunto esto indica que la Cloroquina ejerce su efecto anti-senescente mediante la recuperación de la morfología nuclear, lo cual posiblemente ayuda al anclaje de la heterocromatina, en donde a su vez ayuda a mantener una correcta morfología nuclear evitando así el fenotipo de hipertrofia celular o la morfología celular senescente. Así mismo nos estarían corroborando a la hipótesis de que la cloroquina estará teniendo un efecto anti-senescente en un modelo *in vitro* de fibroblastos inducidos a senescencia mediante la hiperacetilación de las histonas. Es decir, así como está actuando en un modelo de senescencia prematura y patológica (HGPS) ahora también participa en el modelo de senescencia inducida. Por lo que observamos como las características descritas como marcadores de senescencia: Aumento del área celular (expandida, aplanada), nucleolos agrandados y pérdida de la heterocromatina, se mejoran tras el tratamiento durante 48 horas con CQ.



**Figura 8. El tratamiento con CQ disminuye el número de células con alteraciones morfológicas asociadas a senescencia.**

**A)** Los fibroblastos inducidos a senescencia y tratados con CQ o solo vehículo, se inmunotñieron, donde se empleó un anticuerpo contra la proteína Lamina A/C para observar la envoltura nuclear y caracterizar las células con morfología aberrante. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes (n=150 células). **B)** Cuantificación del porcentaje de células con morfología nuclear aberrante mediante la herramienta informática ImageJ \*Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ . **C)** imágenes representativas de Inmunofluorescencia indirecta de 3 experimentos independientes (n=150 células) donde se empleó un anticuerpo contra la histona H3K9me3. **D)** Cuantificación de la intensidad relativa mediante la herramienta informática ImageJ de fluorescencia en los cultivos de fibroblastos de 20 años \*Barra 50  $\mu\text{m}$ . **E)** Imágenes representativas de 3 experimentos independientes (n=150 células) donde se empleó un anticuerpo contra la proteína B23 para observar el área nucleolar en las distintas condiciones de los fibroblastos de 20 años. **F)** cuantificación del área nucleolar de B23 mediante la herramienta informática de ImageJ en los cultivos de fibroblastos de 20 años \*Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ . **G)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia indirecta de 3 experimentos independientes (n=150 células) donde se tiño el citoesqueleto de actina con Faloidina para observar el área celular de los fibroblastos bajo las distintas condiciones. **H)** Cuantificación del área celular mediante la herramienta informática ImageJ \*Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ .

### Fibroblastos de un individuo de 20 años



**Figura 9. El tratamiento con Cloroquina alivia las distintas marcas de senescencia en fibroblastos de 20 años inducidos a senescencia.**

Panel representativo de los fibroblastos de 20 años los cuales se tiñeron contra la Lamna A/C para analizar la morfología nuclear , contra B23 para observar la morfología de los nucleolos y contra la histona H3K9me3 para evaluar el nivel de la heterocromatina. Así mismo se tiñeron con Faloidina y DAPI para decorar el citoesqueleto y el núcleo, previo al análisis por microscopia confocal y analizado mediante ImageJ \*Barra 50  $\mu$ m.

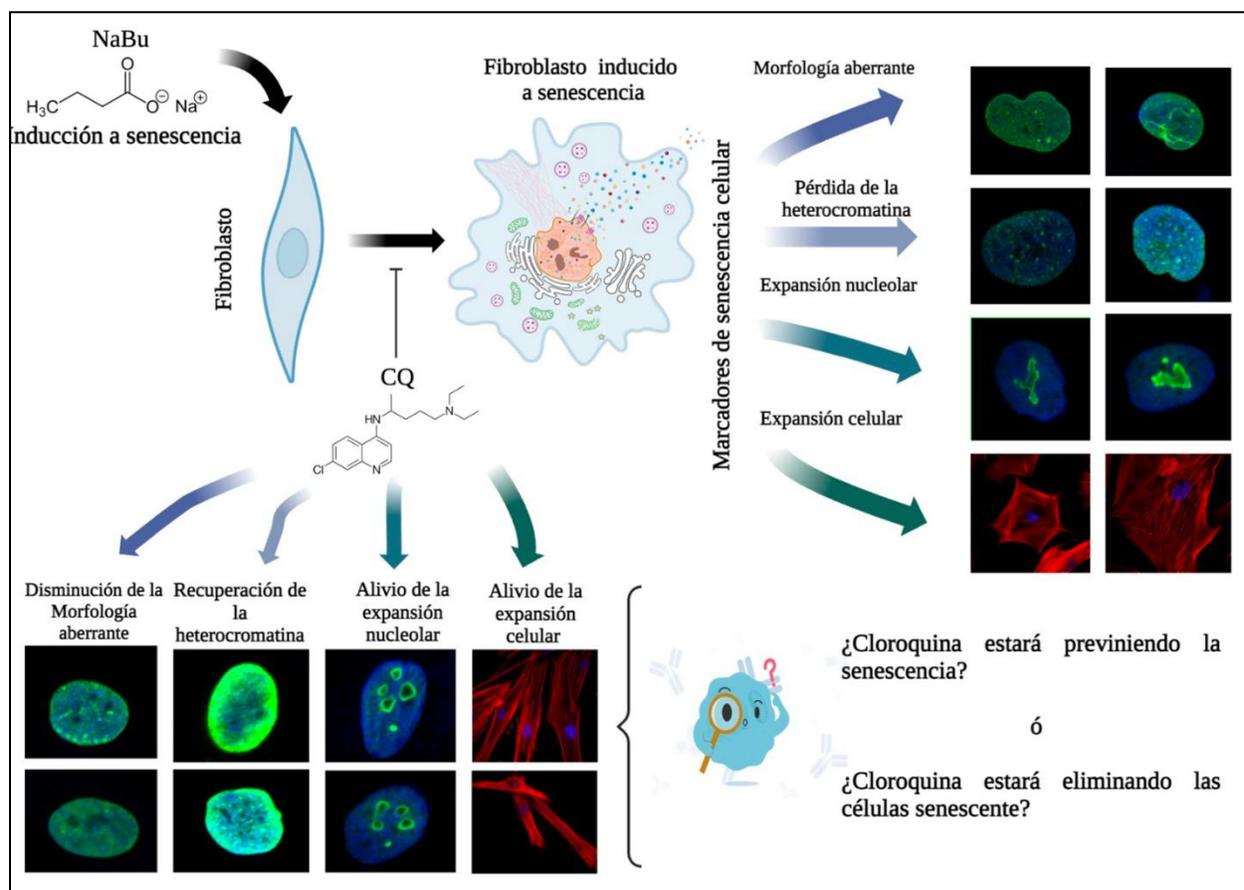


Figura 10. Esquema del modelo de inducción y tratamiento con Cloroquina. <sup>Autor</sup>

## Conclusión

En resumen, nuestros resultados demuestran que la Cloroquina tiene un efecto anti-senescente en un modelo de senescencia inducida mediante la hiperacetilación de las histonas.

## Recomendaciones

- Prevenir el estrés celular mediante buenas técnicas de manejo en el cultivo.
- Evitar el aumento de la confluencia celular >80%.
- se recomienda utilizar los cultivos en pases no muy altos para prevenir la senescencia replicativa.
- Seguir cuidadosamente los pasos de los protocolos de cada ensayo.
- Corroborar estos resultados con triplicados de Western blot de las células inducidas y tratadas con Cloroquina
- Se requiere seguir analizando este compuesto ( Cloroquina) en más modelos de senescencia para seguir corroborando con la hipótesis y poder llevar este estudio a un nivel terapéutico.

## Referencias bibliográficas

1. Buchwalter, A., & Hetzer, M. W. (2017). Nucleolar expansión and elevated protein translation in premature aging. *Nature Communications*, 8, 328. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00322-z>
2. *Chloroquine*. (2016, noviembre 25). InvivoGen. <https://www.invivogen.com/chloroquine>
3. Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., & Toussaint, O. (2009a). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols*, 4(12), 1798-1806. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.191>
4. Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., & Toussaint, O. (2009b). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols*, 4(12), 1798-1806. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.191>
5. García-Aguirre, I., Alamillo-Iniesta, A., Rodríguez-Pérez, R., Vélez-Aguilera, G., Amaro-Encarnación, E., Jiménez-Gutiérrez, E., Vásquez-Limeta, A., Samuel Laredo-Cisneros, M., Morales-Lázaro, S. L., Tiburcio-Félix, R., Ortega, A., Magaña, J. J., Winder, S. J., & Cisneros, B. (2019). Enhanced nuclear protein export in premature aging and rescue of the progeria phenotype by modulation of CRM1 activity. *Aging Cell*, 18(5), e13002. <https://doi.org/10.1111/accel.13002>
6. González-Gualda, E., Baker, A. G., Fruk, L., & Muñoz-Espín, D. (2021). A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *The FEBS Journal*, 288(1), 56-80. <https://doi.org/10.1111/febs.15570>

7. Heckenbach, I., Mkrtchyan, G. V., Ezra, M. B., Bakula, D., Madsen, J. S., Nielsen, M. H., Oró, D., Osborne, B., Covarrubias, A. J., Idda, M. L., Gorospe, M., Mortensen, L., Verdin, E., Westendorp, R., & Scheibye-Knudsen, M. (2022). Nuclear morphology is a deep learning biomarker of cellular senescence. *Nature Aging*, 2(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/s43587-022-00263-3>
8. Hernández Ramírez, D. F., & Cabiedes, J. (2010). Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. *Reumatología Clínica*, 6(3), 173-177. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2009.10.003>
9. Hernandez-Segura, A., Brandenburg, S., & Demaria, M. (2018). Induction and Validation of Cellular Senescence in Primary Human Cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 136, 57782. <https://doi.org/10.3791/57782>
10. Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*, 28(6), 436-453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>
11. Jimenez-Gutierrez, G. E., Mondragon-Gonzalez, R., Soto-Ponce, L. A., Gómez-Monsiváis, W. L., García-Aguirre, I., Pacheco-Rivera, R. A., Suárez-Sánchez, R., Brancaccio, A., Magaña, J. J., C.R. Perlingeiro, R., & Cisneros, B. (2020). Loss of Dystroglycan Drives Cellular Senescence via Defective Mitosis-Mediated Genomic Instability. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 4961. <https://doi.org/10.3390/ijms21144961>
12. Kohli, J., Wang, B., Brandenburg, S. M., Basisty, N., Evangelou, K., Varela-Eirin, M., Campisi, J., Schilling, B., Gorgoulis, V., & Demaria, M. (2021). Algorithmic assessment of cellular senescence in experimental and clinical specimens. *Nature Protocols*, 16(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00505-5>

13. Martins, F., Sousa, J., Pereira, C. D., da Cruz e Silva, O. A. B., & Rebelo, S. (2020). Nuclear envelope dysfunction and its contribution to the aging process. *Aging Cell*, *19*(5), e13143. <https://doi.org/10.1111/ace1.13143>
14. Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K.-J., Coppes, R. P., Engedal, N., Mari, M., & Reggiori, F. (2018). Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, *14*(8), 1435-1455. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>
15. Moujaber, O., Fishbein, F., Omran, N., Liang, Y., Colmegna, I., Presley, J. F., & Stochaj, U. (2019). Cellular senescence is associated with reorganization of the microtubule cytoskeleton. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *76*(6), 1169-1183. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2999-1>
16. Petrova, N. V., Velichko, A. K., Razin, S. V., & Kantidze, O. L. (2016). Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell*, *15*(6), 999-1017. <https://doi.org/10.1111/ace1.12518>
17. PubChem. (s. f.). *Sodium butyrate*. Recuperado 20 de abril de 2023, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5222465>
18. Tingting, C., Shizhou, Y., Songfa, Z., Junfen, X., Weiguo, L., Xiaodong, C., & Xing, X. (2019). Human papillomavirus 16E6/E7 activates autophagy via Atg9B and LAMP1 in cervical cancer cells. *Cancer Medicine*, *8*(9), 4404-4416. <https://doi.org/10.1002/cam4.2351>
19. Zavaleta, T. (2022). *Efecto de selinexor sobre el envejecimiento fisiológico en un modelo celular*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.