



ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
DE LA USC

Víctor
Núñez Quintela

Tesis doctoral

Reprogramación parcial como estrategia
frente al envejecimiento, el cáncer y la
obesidad

Santiago de Compostela, 2025

Programa de doctorado en Medicina Molecular

TESIS DOCTORAL

**REPROGRAMACIÓN PARCIAL
COMO ESTRATEGIA FRENTE AL
ENVEJECIMIENTO, EL CÁNCER Y
LA OBESIDAD.**

Autor

Víctor Núñez Quintela

Director: Manuel Collado Rodríguez

Tutor: Anxo Vidal Figueroa

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral en el grupo de investigación de Senescencia Celular, Cáncer y Envejecimiento del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) recibió financiación procedente del Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN/AEI/FEDER, UE [PID2021-125479OB-I00]) y de la Agencia Gallega de Innovación (GAIN, Xunta de Galicia [IN607B, 2024/13]).

El doctorando, Víctor Núñez Quintela, recibió financiación de la convocatoria IN606A-Ayudas de apoyo a la etapa predoctoral (IN606A-2021/016) de la Xunta de Galicia.



CONFLICTO DE INTERÉS

Víctor Núñez Quintela, autor de esta tesis, declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.

AGRADECIDIMIENTOS

Antes de sumergirme en los nombres y los recuerdos, quiero tomarme un momento para mirar atrás. Tras muchas madrugadas, esta tesis fue tomando forma, pero nunca se escribió sola. Detrás de cada párrafo hay voces, risas, cafés y palabras que hicieron que incluso los días más duros resultaran agradables. Este espacio es para agradecer, pero también para sonreír al pensar en todas las personas que, de una forma u otra, caminaron conmigo hasta aquí. Gracias a todos.

En primer lugar, gracias a Manuel, mi director de tesis. No solo te quiero agradecer por guiarme académicamente, sino por haber creado un ambiente de trabajo en el que era fácil aprender, preguntar y equivocarse sin miedo. Entre cafés, comidas estupendas y muchas bromas, hiciste que el camino se sintiera más acompañado que dirigido. De ti aprendí mucho más que ciencia, y eso es algo que me voy a llevar siempre conmigo.

Por supuesto, gracias a mi querido Labo 13, todos los días eran divertidos con vosotros. A Pablo, fuiste la primera persona en enseñarme de verdad lo que significa trabajar en el laboratorio y con animales, gracias por tu paciencia. A Migue, qué bueno compartir la mesa codo con codo (literalmente) con alguien tan alegre. A Valen, por tantos datos curiosos y tu (extravagante) humor, que hacían los días más largos, breves. A Patri, por ser la encargada de poner en su sitio a Valen y traer algo de cordura al laboratorio. A Álex, nuestro *técnico de citometría*, gracias por tu buen rollo y por dejarme ganar siempre a todos los deportes (aunque sabemos que no te queda otra). A Sabela, “la verdadera jefa”, gracias por tu paciencia y por todo lo que he aprendido de ti. A Miralles y Raquel, por llegar al laboratorio con tan buena energía y compañerismo. A Lucía, Séfira e Irimia, gracias por vuestra ilusión y por haberos integrado con tanta naturalidad. A Eloísa, que es casi, casi del Labo 13. A todas las (muchas) personas que han pasado por el laboratorio durante estos años, en especial a Christian, Natalia y Sandra, por dejar huella. Y, en general, gracias a todos los miembros del laboratorio por vuestra paciencia (incluso con mis chorradas de por medio), por el buen humor diario y por hacer que este camino haya sido mucho más llevadero. Ha sido un lujo compartir estos años con vosotros.

A las chicas del L20/Diversa, por todas las horas compartidas en la sala de cultivos, entre placas de cultivos y risas. Especialmente a Irene, eres una persona increíble, las charlas contigo de vuelta después de las fiestas hacían que el camino pasara volando.

Gracias a Aurora y a Diego, por ayudarme tanto en mi pequeña incursión en el maravilloso mundo de la mitocondria. Lo que empezó como una curiosidad terminó siendo una parte fundamental de esta tesis, y todo gracias a vuestra ayuda.

A las chicas del Labo 11, mil gracias por ser tan agradables y por sacarme de mil apuros de última hora con vuestros *buffers* y material.

A Ramón Lobato y el Servicio de Radiología, por irradiar mis células cientos de veces, siempre con una sonrisa y una disposición increíble.

A Mela y a todos los miembros de su laboratorio, siempre estuvisteis ahí cuando hacía falta. No recuerdo cuántas veces os llamé para pedir os reactivos y consejos.

A Tadeu, Sulay, Marta y Sabela, mil gracias por ayudarnos tanto en el proyecto de obesidad.

Thanks to Han for giving me the opportunity to join her lab in Paris and for guiding me through this project. Thanks to everyone in the lab, especially Elsa, for making every day in the office much more fun and manageable with her energy and sense of humor, and to Jeremy for his patience with the experiments and data analysis.

A mis amigos de Bio: Natalia, Paola, Abel, Sara, Pablo, Elena, Nerea, Sabela, Josep. No os hacéis una idea de cuánto he aprendido de vosotros. Gracias por estar ahí durante toda la carrera, me habéis ayudado un mundo.

A todos mis amigos de A Guarda, gracias por las tardes, las risas, las fiestas y por ser siempre la mejor forma de desconectar del mundo académico. No cambiéis nunca.

Muchísimas gracias a toda mi familia. En especial, a mi padre y a mi madre, por todo su cariño, por cómo me han educado y por estar siempre ahí, apoyándome en cada paso que he dado. Gracias por enseñarme a esforzarme, a confiar en mí y a mantenerme con los pies en la tierra.

A Gus, por supervisar cada página escrita desde la mesa y recordarme (con maullidos insistentes) que hay vida más allá de la tesis.

A Raquel, mi compañera de vida y la persona que ha estado a mi lado en cada etapa de esta tesis. Gracias por tu paciencia infinita, por animarme siempre, por celebrar cada pequeño logro, y por ser siempre mi refugio, incluso en los días más grises. Has sido mi pilar, mi calma y mi fuerza. Esta tesis no habría salido adelante sin ti, y tenerte a mi lado ha sido, sin duda, lo mejor de todo este camino. Te quiero.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
RESUMEN	20
RESUMO	21
ABSTRACT	22
1 INTRODUCCIÓN	24
1.1 REPROGRAMACIÓN CELULAR	24
1.1.1 Descubrimiento y técnicas de reprogramación celular	25
1.1.2 Reprogramación a través de OSKM	25
1.1.3 Reprogramación <i>in vivo</i>	26
1.1.4 Reprogramación no integrativa	27
1.1.5 Reprogramación química	27
1.1.6 Reprogramación parcial	28
1.1.7 Aplicaciones y limitaciones de la reprogramación parcial como herramienta terapéutica	30
1.2 SENESCENCIA CELULAR	31
1.2.1 Estímulos desencadenantes de la senescencia	32
1.2.1.1 Senescencia replicativa	32
1.2.1.2 Senescencia por daño en el ADN.....	32
1.2.1.3 Senescencia inducida por oncogenes	33
1.2.2 Características de las células senescentes	34
1.2.2.1 Detención del ciclo celular.....	34
1.2.2.2 Daño macromolecular	34
1.2.2.3 Disfunción mitocondrial	35
1.2.2.4 SASP.....	35
1.2.2.5 Aumento del compartimento lisosomal	36
1.2.2.6 Cambio morfológico	36
1.2.3 Papel dual de la senescencia	37
1.2.4 Conexión entre la reprogramación y la senescencia	39
1.3 CÁNCER	40
1.3.1 Características del cáncer	40
1.3.2 Papel del envejecimiento	41
1.3.3 Conexión entre la reprogramación y la progresión tumoral	43

1.4 OBESIDAD.....	44
1.4.1 Bases ambientales, genéticas y epigenéticas de la obesidad	44
1.4.2 Obesidad como patología metabólica.....	45
1.4.3 Relación de la obesidad con el envejecimiento y otras patologías.....	46
1.4.4 Conexión entre la reprogramación y la obesidad	47
2 HIPÓTESIS.....	49
3 OBJETIVOS	51
4 METODOLOGÍA	53
4.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	53
4.1.1 Condiciones de estabulación	53
4.1.2 Ratón i4F	53
4.1.3 Ratón OSKM- <i>only</i>	53
4.1.4 Genotipado	54
4.2 PROTOCOLOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	55
4.2.1 Administración de doxiciclina en agua de bebida	55
4.2.2 Inducción de obesidad	55
4.2.3 Fotos térmicas	55
4.2.4 Evaluación de temperatura.....	55
4.2.5 Resonancia electromagnética.....	55
4.2.6 Recolección de sangre periférica	55
4.2.6.1 Medición de glucosa en sangre periférica	55
4.2.6.2 Medición de colesterol en sangre periférica.....	56
4.2.7 ITT y GTT	56
4.2.8 Preparación e inyección de medios condicionados	56
4.2.9 Inyección de células	56
4.2.9.1 L1475	56
4.2.9.2 B6BC-Luc	56
4.2.10 Seguimiento de crecimiento tumoral por IVIS	57
4.2.11 Curva de supervivencia.....	57
4.2.12 Eutanasia y recolección de tejidos.....	57
4.2.12.1 Extracción células de médula ósea	57
4.3 CULTIVOS CELULARES	58
4.3.1 Condiciones de cultivos	58
4.3.2 Cultivos primarios	58
4.3.2.1 MEFs WT y MEFs i4F.....	58

4.3.2.2 Hepatocitos	59
4.3.3 Líneas celulares	59
4.3.4 Estudio de proliferación celular	60
4.3.4.1 Crecimiento de la población celular.....	60
4.3.4.2 Marcadores de proliferación	60
4.3.5 Condicionado de medios	60
4.3.5.1 Análisis de factores secretados	60
4.3.6 Tratamientos celulares.....	61
4.3.6.1 Medios condicionados	61
4.3.6.2 Radiación X	61
4.3.6.3 Doxiciclina.....	61
4.3.6.4 2c.....	62
4.3.6.5 Ácido oleico y BSA	62
4.3.7 Cultivo en <i>transwell</i>	62
4.3.8 Diferenciación de adipocitos.....	62
4.4 ANÁLISIS MITOCONDRIAL	63
4.4.1 Masa mitocondrial.....	63
4.4.2 Potencial de membrana	63
4.4.3 Acumulación de ROS	63
4.4.4 Consumo de oxígeno.....	63
4.4.5 Acidificación extracelular	64
4.4.6 Cuantificación de ATP mitocondrial.....	64
4.4.7 Extracción de proteínas (post- <i>Seahorse</i> /ATP)	64
4.5 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BETA GALACTOSIDASA ASOCIADA A SENESCENCIA (SA-BETA-GAL).....	64
4.5.1 Detección histoquímica de SA-beta-Gal	64
4.5.2 Detección por citometría de flujo de SA-beta-Gal.....	65
4.6 VECTORES PLASMÍDICOS.....	65
4.6.1 Cultivo bacteriano	65
4.6.2 Plásmidos utilizados	65
4.6.3 Extracción del ADN plasmídico	66
4.7 TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL	66
4.7.1 Transfección.....	66
4.7.2 Transducción	66
4.8 REPROGRAMACIÓN CELULAR	66
4.8.1 Reprogramación con medios condicionados.....	66

4.8.2 Tinción fosfatasa alcalina.....	67
4.9 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO	67
4.9.1 Extracción de ARNm.....	67
4.9.1.1 Extracción de ARNm de células	67
4.9.1.2 Extracción de ARNm de tejidos.....	67
4.9.2 Transcripción inversa del ARN.....	67
4.9.3 PCR cuantitativa.....	68
4.9.4 Secuenciación de ARN.....	69
4.9.4.1 Preparación de la biblioteca y secuenciación	69
4.9.4.2 Procesamiento de datos y control de calidad.....	69
4.9.4.3 Cuantificación y análisis de expresión diferencial	69
4.9.4.4 Análisis enriquecimiento.....	69
4.10 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA.....	69
4.10.1 Extracción de proteínas.....	69
4.10.1.1 Extracción de proteínas de extracto celular.....	69
4.10.1.2 Extracción de proteínas de tejidos.....	70
4.10.2 Cuantificación de proteínas	70
4.10.3 Western blot	70
4.11 INMUNOFLUORESCENCIA.....	72
4.12 ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO	72
4.12.1 Preparación y procesamiento de tejidos	72
4.12.2 Tinción Hematoxilina-Eosina	72
4.12.3 Tinción inmunohistoquímica	72
4.12.4 Microscopía	73
4.12.5 Análisis estadístico.....	73
5 RESULTADOS	75
5.1 EFECTO DE LA REPROGRAMACIÓN PARCIAL SOBRE EL FENOTIPO SENESCENTE	75
5.1.1 Inducción de senescencia por irradiación.....	75
5.1.2 El estado senescente no se revierte con la expresión de OSKM ni con el tratamiento con 2c	77
5.1.3 Cambios transcripcionales detectados tras los tratamientos.....	78
5.1.4 Efecto senomórfico de OSKM y 2c.....	80
5.1.5 La expresión de OSKM y el tratamiento con 2c reducen la senescencia paracrina	81
5.1.6 OSKM y 2c disminuyen la capacidad de migración de macrófagos	82
5.1.7 OSKM y 2c reducen el efecto potenciador de la reprogramación de las células senescentes <i>in vitro</i>	83

5.1.8 OSKM y 2c reducen el efecto potenciador de la reprogramación de las células senescentes <i>in vivo</i>	84
5.1.9 La expresión de OSKM y el tratamiento con 2c restauran parcialmente la alteración mitocondrial típica de la senescencia.....	85
5.2 EFECTO DE LA REPROGRAMACIÓN PARCIAL SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL EN ORGANISMOS ENVEJECIDOS	87
5.2.1 La reprogramación parcial disminuye el crecimiento tumoral en pulmones	88
5.2.2 La reprogramación parcial reduce el crecimiento tumoral en la glándula mamaria ..	89
5.2.3 La reprogramación parcial no revierte la inmunosenescencia	91
5.3 EFECTO DE LA REPROGRAMACIÓN PARCIAL SOBRE LA OBESIDAD	92
5.3.1 Efecto de la reprogramación parcial sobre el perfil glucémico de ratones obesos	93
5.3.2 La reprogramación parcial mejora la composición corporal y el perfil lipídico en ratones obesos	94
5.3.3 Efecto de la expresión de OSKM en la acumulación lipídica en adipocitos <i>in vitro</i>	95
5.3.4 Disminución de la activación inmunitaria y de la inflamación tras la reprogramación parcial.....	96
5.3.5 Efecto de la reprogramación parcial sobre la termogénesis.....	97
5.3.6 La reprogramación parcial aumenta el metabolismo lipídico en el hígado de animales obesos.....	98
5.3.7 Efecto de la expresión de OSKM en la acumulación lipídica en hepatocitos <i>in vitro</i> .	100
6 DISCUSIÓN.....	102
6.1 EFECTO SENOMÓRFICO DE LA REPROGRAMACIÓN PARCIAL	102
6.2 REDUCCIÓN DEL DESARROLLO TUMORAL MEDIANTE LA REPROGRAMACIÓN PARCIAL	105
6.3 EFECTO DE LA REPROGRAMACIÓN PARCIAL SOBRE EL FENOTIPO OBESO	106
7 CONCLUSIONES.....	112
8 BIBLIOGRAFÍA	116
ANEXOS	147
ÍNDICE DE FIGURAS.....	148
ÍNDICE DE TABLAS	150
DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE LAS FIGURAS	151
FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	152
AUTORIZACIONES PARA LA EDICIÓN Y USO DE MATERIAL GRÁFICO.....	155
RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROYECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	159
CERTIFICADOS DE CAPACITACIÓN PARA EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES	164

ABREVIATURAS

2c	Combinación de los compuestos RepSox y TCP
7c	Combinación de los compuestos RepSox, TCP, VPA, CHIR99021, Forskolina, DZNep y TTNPB
Acc	Acetil-CoA carboxilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
Akt	Proteína quinasa B
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
A.O.	Ácido oleico
Areg	Anfirregulina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNseq	Secuenciación de ARN
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
ATP	Adenosín trifosfato
ATR	Ataxia telangiectasia y Rad3 relacionada
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BAT	<i>Brown adipose tissue</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
c-Myc	<i>Cellular Myelocytomatosis oncogene</i>
C ₁₂ FDG	5-dodecanoilaminofluoresceína Di-β-D-galactopiranosido
CCFs	<i>Cytoplasmic chromatin fragments</i>
Ccl2	Quimioquina (C-C motif) ligando 2
Ccl5	Quimioquina (C-C motif) ligando 5
CDK4/6	<i>Cyclin-Dependent Kinase 4/6</i>
CDKi	<i>Cyclin-Dependent Kinase inhibitor</i>
Cdkn1a	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
Cdkn2a	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
cGAS	<i>Cyclic GMP-AMP Synthase</i>

CHK1/2	<i>Checkpoint kinase 1/2</i>
CiPSC	<i>Chemically Induced Pluripotent Stem Cells</i>
CM	<i>Conditioned media</i>
Cx3cl1	Fractalquina, quimioquina (C-X3-C motif) ligando 1
Cxcl1	Quimioquina (C-X-C motif) ligando 1
Cxcl2	Quimioquina (C-X-C motif) ligando 2
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DDR	<i>DNA Damage Response</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA-SCARS	DNA Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence
Doxy	Doxiciclina
DZNep	3-Deazaneplanocin A
E2F	Familia de factores de transcripción reguladores del ciclo celular
ECAR	<i>Extracellular Acidification Rate</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EDU	<i>5-Ethynyl-2'-deoxyuridine</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
Gapdh	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
Gck	Glucoquinasa
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GSK-3	Glucógeno sintasasa quinasa 3
GTT	Prueba de tolerancia a la glucosa
H3K9me2/3	Dimetilación/trimetilación de la lisina 9 de la histona H3
H3K4me2	Dimetilación de la lisina 4 de la histona H3
H/E	Tinción hematoxilina-eosina
hCiPSC	<i>Human Chemically Induced Pluripotent Stem Cells</i>
HEK-293T	<i>Human Embryonic Kidney 293T Cells</i>
HP1	<i>Heterochromatin Protein 1</i>
i4F-A	Modelo de ratón reprogramable: rtTA insertado en el <i>locus Rosa26</i> y OSKM en el <i>locus Neto2</i>
i4F-B	Modelo de ratón reprogramable: rtTA insertado en el <i>locus Rosa26</i> y OSKM en el <i>locus Pparg</i>

Il6	Interleucina 6
INK-ATTAC	Modelo transgénico de eliminación de células senescentes
iPSC	<i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
ITT	Prueba de tolerancia a la insulina
Ki67	Marcador de proliferación celular
Klf4	<i>Kruppel-Like Factor 4</i>
Lamin B1	Lámina nuclear B1
Lix	<i>Lipopolysaccharide (LPS)-induced CXC chemokine</i>
LSD1	<i>Lysine-specific histone demethylase 1A</i>
M-Cfs	<i>Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
MAO	Monoamino oxidasa
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associated gene 5</i>
MDM2	<i>Mouse Double Minute 2</i>
MEFs	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i>
Mmp2	Metaloproteinasa de matriz 2
Mmp3	Metaloproteinasa de matriz 3
mTor	Mammalian Target of Rapamycin
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NASP	SASP dependiente de NF-κB
ND	<i>Normal diet</i>
NES	<i>Normalized Enrichment Score</i>
Nf-KB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
OCR	<i>Oxygen Consumption Rate</i>
Oct4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
Opn	Osteopontina
OSKM	Factores de reprogramación (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc)
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) Polymerase</i>
PASP	SASP dependiente de p53
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEI	<i>Polyethylenimine</i>
PML	<i>Promyelocytic Leukemia Protein</i>

PVDF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i>
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RB	Proteína del retinoblastoma
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT	<i>Room temperature</i>
rtTA	<i>Reverse Tetracycline Transactivator</i>
SASP	<i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i>
SA- β -Gal	<i>Senescence-Associated β-Galactosidase</i>
Scd1	Estearoil-CoA desaturasa 1
SCNT	<i>Somatic Cell Nuclear Transfer</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SMAD	Familia de proteínas transductoras de señal de TGF- β
SNS	Sistema nervioso simpático
Sox2	<i>SRY-Box Transcription Factor 2</i>
Sting	<i>Stimulator of Interferon Genes</i>
TAE	<i>Tris-Acetate-EDTA Buffer</i>
TCP	Tranilcipromina
TetO	<i>Tetracycline Operator</i>
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TIF	<i>Telomere Dysfunction-Induced Foci</i>
Timpl	Inhibidor tisular de metaloproteinasas 1
TP53	<i>Tumor Protein p53</i>
TTNPB	Análogo del ácido retinoico
vHFD	<i>Very High Fat Diet</i>
VPA	<i>Valproic Acid</i>
WAT EP	<i>White adipose tissue, epididimal</i>
WAT SC	<i>White adipose tissue, subcutaneous</i>
WT	<i>Wild Type</i>
X-Gal	Substrato cromogénico β -galactosidasa
γ H2AX	Histona H2AX fosforilada
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

RESUMEN

La reprogramación celular es un proceso de dediferenciación celular que permite que una célula somática, mediante cambios epigenéticos, se convierta en una célula madre pluripotente inducida (iPSC). Este proceso es posible llevarlo a cabo promoviendo la expresión ectópica prolongada de 4 factores de transcripción: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc* (OSKM). Sin embargo, la expresión corta o intermitente de OSKM (reprogramación parcial) permite que cambien ciertas características de las células sin llegar a perder su identidad, adquiriendo un fenotipo propio de células más jóvenes. Por ello, en los últimos años la reprogramación parcial ha surgido como un enfoque prometedor para tratar distintas patologías asociadas con la edad.

La senescencia es un estado de parada estable en el ciclo celular que se desencadena como respuesta al daño y contribuye al proceso de envejecimiento. Hemos observado cómo la expresión de OSKM en células senescentes reduce significativamente ciertos marcadores de senescencia, restaura la función mitocondrial y disminuye el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). Además, la reducción del SASP ha demostrado tener implicaciones funcionales tanto *in vitro* como *in vivo*. Asimismo, el tratamiento con 2 compuestos químicos (RepSox y TCP), reproduce el efecto observado de la expresión de OSKM sobre el fenotipo senescente.

Por otra parte, la progresión tumoral es favorecida en organismos envejecidos por el ambiente proinflamatorio, la menor respuesta inmunitaria y la acumulación de daño en el ADN. La reprogramación parcial mediada por OSKM, al rejuvenecer los tejidos de los organismos viejos, reduce el crecimiento tumoral en el pulmón y en la mama de ratones envejecidos.

Por último, dado que la obesidad también es una patología asociada al envejecimiento, estudiamos el efecto de la reprogramación parcial en organismos obesos. Nuestros resultados demostraron cómo la expresión cíclica de OSKM mejora el perfil glucémico y lipídico, así como la composición corporal de los ratones, reduciendo la acumulación lipídica y disminuyendo el ambiente proinflamatorio del tejido adiposo de los ratones obesos.

En resumen, la reprogramación parcial mediante la expresión corta de OSKM ofrece un enfoque prometedor para abordar diversas patologías relacionadas con el envejecimiento, dado que actúa como senomórfico, modifica los tejidos envejecidos haciéndolos menos propensos a la progresión tumoral, y mejora distintos parámetros de la obesidad.

RESUMO

A reprogramación celular é un proceso de desdiferenciación celular que permite que unha célula somática, mediante cambios epixenéticos, se converta nunha célula nai pluripotente inducida (iPSC). Este proceso é posible levalo a cabo promovendo a expresión ectópica prolongada de 4 factores de transcrición: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* e *c-Myc* (OSKM). Porén, a expresión curta ou intermitente de OSKM (reprogramación parcial) permite que cambien certas características das células sen chegar a perder a súa identidade, adquirindo un fenotipo propio de células máis novas. Por iso, nos últimos anos a reprogramación parcial xurdiu como un enfoque prometedor para tratar distintas patoloxías asociadas coa idade.

A senescencia é un estado de parada estable no ciclo celular que se desencadea como resposta ao dano e contribúe ao proceso de envellecemento. Observamos como a expresión de OSKM en células senescentes reduce significativamente certos marcadores de senescencia, restaura a función mitocondrial e diminúe o fenotipo secretor asociado á senescencia (SASP). Ademais, a redución do SASP demostrou ter implicacións funcionais tanto *in vitro* como *in vivo*. Así mesmo, o tratamento con 2 compostos químicos (RepSox e TCP) reproduce o efecto observado da expresión de OSKM sobre o fenotipo senescente.

Por outra banda, a progresión tumoral vese favorecida en organismos envellecidos polo ambiente proinflamatorio, a menor resposta inmunitaria e a acumulación de dano no ADN. A reprogramación parcial mediada por OSKM, ao rexuvenecer os tecidos dos organismos vellos, reduce o crecemento tumoral no pulmón e na mama de ratos envellecidos.

Por último, dado que a obesidade tamén é unha patoloxía asociada ao envellecemento, estudamos o efecto da reprogramación parcial en organismos obesos. Os nosos resultados demostraron como a expresión cíclica de OSKM mellora o perfil glicémico e lipídico, así como a composición corporal dos ratos, reducindo a acumulación lipídica e diminuíndo o ambiente proinflamatorio do tecido adiposo dos ratos obesos.

En resumo, a reprogramación parcial mediante a expresión curta de OSKM ofrece un enfoque prometedor para abordar diversas patoloxías relacionadas co envellecemento, dado que actúa como senomórfico, modifica os tecidos envellecidos facéndoos menos propensos á progresión tumoral e mellora distintos parámetros da obesidade.

ABSTRACT

Reprogramming is a process of cellular dedifferentiation that allows a somatic cell, through epigenetic changes, to become an induced pluripotent stem cell (iPSC). This process can be conducted by promoting the prolonged ectopic expression of 4 transcription factors: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, and *c-Myc* (OSKM). However, the short or intermittent expression of OSKM (partial reprogramming) allows certain characteristics of the cells to change without losing their identity, acquiring a phenotype characteristic of younger cells. For this reason, in recent years, partial reprogramming has emerged as a promising strategy for treating various age-related diseases.

Senescence is a state of stable arrest in the cell cycle that is triggered as a response to damage and contributes to the aging process. We have observed how the expression of OSKM in senescent cells significantly reduces certain senescence markers, restores mitochondrial function, and decreases the senescence-associated secretory phenotype (SASP). Additionally, the reduction of SASP has been shown to have functional implications both *in vitro* and *in vivo*. Similarly, the treatment with two chemical compounds (RepSox and TCP) reproduces the observed effect of OSKM expression on the senescent phenotype.

On the other hand, tumor progression is favored in aged organisms due to the proinflammatory environment, the lower immune response, and the accumulation of DNA damage. Partial reprogramming mediated by OSKM, by rejuvenating the tissues of old organisms, reduces tumor growth in the lung and breast of aged mice.

Finally, since obesity is also a pathology associated with aging, we studied the effect of partial reprogramming in obese organisms. Our results demonstrated how the cyclic expression of OSKM improves the glycemic and lipid profile, as well as the body composition of the mice, reducing lipid accumulation and decreasing the proinflammatory environment of the adipose tissue of obese mice.

In summary, partial reprogramming through the short expression of OSKM offers a promising approach to addressing various aging-related pathologies, as it acts as a senomorphic, modifies aged tissues making them less prone to tumor progression, and improves different parameters of obesity.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 REPROGRAMACIÓN CELULAR

El desarrollo y crecimiento de un organismo multicelular depende de las células madre embrionarias, que originan los distintos tipos celulares que compondrán al organismo adulto. Este proceso, en el cual se generan células especializadas, se conoce como diferenciación celular. Para dar lugar a la amplia diversidad de tipos celulares necesarios y así cumplir funciones específicas, las células madre presentan dos características fundamentales: la pluripotencia y la capacidad de autorrenovación (Weissman et al., 2001; Sánchez Alvarado & Yamanaka, 2014). La pluripotencia es la capacidad que tienen las células madre para diferenciarse en cualquier tipo celular del organismo que componen, mientras que la capacidad de autorrenovación es el proceso por el que las células madre se dividen para generar más células, madre manteniendo así el estado indiferenciado (Shenghui et al., 2009). Durante el proceso de diferenciación celular, se produce una remodelación epigenética, lo que origina una transición progresiva desde una configuración de cromatina relativamente abierta a un estado más compacto, a medida que las células pierden potencialidad (T. Chen & Dent, 2014).

Este proceso lo ilustró Conrad Waddington con una analogía en la que la diferenciación celular es representada con una bola que desciende por una ladera con múltiples valles, donde cada uno representa un destino celular distinto. En la cima, la célula pluripotente va bajando, perdiendo así potencialidad mientras va ganando marcas epigenéticas y se va especializando en un tipo celular determinado (**Figura 1**) (Waddington, 1957).

En un principio la diferenciación celular se consideraba un proceso irreversible. Sin embargo, actualmente sabemos que las células diferenciadas pueden revertir este proceso mediante la reprogramación celular. Las técnicas de reprogramación inducen la pérdida de identidad de las células somáticas mientras recuperan potencialidad, generando así células madre pluripotentes inducidas (*induced Pluripotent Stem Cells*, iPSC) (Gurdon, 1962; Takahashi & Yamanaka, 2006). Durante este proceso, las marcas epigenéticas adquiridas durante la diferenciación celular se van borrando progresivamente, restaurando un patrón de expresión y demás características propias de una célula madre (Cipriano et al., 2023; Ocampo et al., 2016).

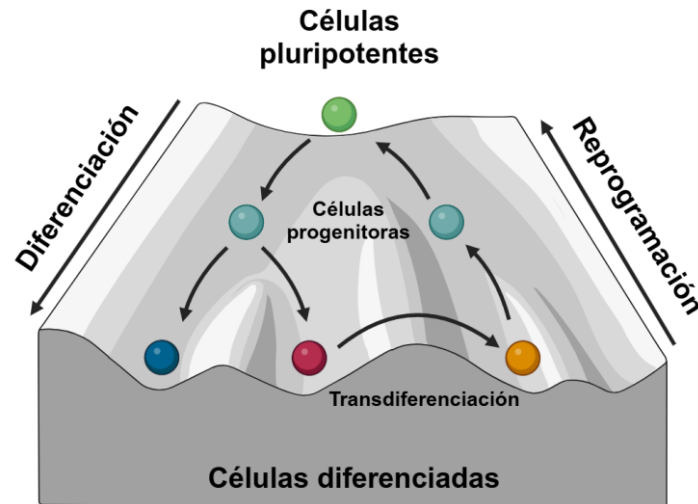


Figura 1. Paisaje epigenético de Waddington. Ilustración de la analogía de Conrad Waddington para describir el proceso de diferenciación celular (Waddington, 1957). En la imagen se ilustran también el proceso de transdiferenciación, pasando de un estado diferenciado a otro, y el de reprogramación celular, volviendo al estado indiferenciado. Figura generada con *Biorender*.

1.1.1 Descubrimiento y técnicas de reprogramación celular

La reprogramación celular tiene sus orígenes en los experimentos realizados por John Gurdon en 1962. Gurdon logró que una célula diferenciada recuperase la pluripotencia mediante la técnica de transferencia nuclear de célula somática (*Somatic Cell Nuclear Transfer*, SCNT). Mediante esta técnica, y partiendo de células de *Xenopus*, Gurdon transfirió el núcleo de una célula somática a un oocito enucleado, logrando dar lugar a un organismo completo que era genéticamente idéntico al donante de la célula somática (Gurdon, 1962). Posteriormente, a través de SCNT, con el experimento de la oveja Dolly se reportó el primero caso de clonación en mamíferos (Wilmut et al., 1997). Dos décadas después, el proceso de clonación también se realizó de manera exitosa en macacos (Z. Liu et al., 2018). Estos experimentos demostraron que la reprogramación mediante la técnica de SCNT no es exclusiva de *Xenopus*, sino que es totalmente trasladable a mamíferos y, más específicamente, a primates.

En el contexto de la reprogramación celular también se demostró cómo el patrón de expresión de una célula diferenciada se podía alterar al fusionarla con otro tipo de célula diferenciada (Blau et al., 1983). Posteriormente, se utilizó esta técnica para inducir la expresión de genes asociados al estado pluripotente en células somáticas, al fusionarlas con células madre embrionarias (Tada et al., 1997; Tada et al., 2001). Todos estos experimentos demostraron que el proceso de diferenciación no es irreversible, y que el núcleo de una célula diferenciada todavía conserva la capacidad para desdiferenciarse en una célula madre de una manera rápida y determinista (Buganim et al., 2012) y poder así generar de nuevo un organismo completo.

1.1.2 Reprogramación a través de OSKM

En el 2006, Takahashi y Yamanaka definieron un sistema de reprogramación celular en el que, al expresar diversos factores de transcripción, era posible reprogramar células diferenciadas, generando así iPSC. Estos investigadores partieron de un total de 24 genes enriquecidos en células madre embrionarias y relacionados directamente con la pluripotencia celular. Observaron que la expresión de estos 24 factores de transcripción en una célula diferenciada

podía generar iPSC. A partir de esta lista de factores, Takahashi y Yamanaka fueron descartando aquellos genes no indispensables para promover la formación de iPSC a partir de fibroblastos embrionarios de ratón (*Mouse Embryonic Fibroblasts*, MEFs), quedando finalmente solo 4 factores de transcripción esenciales: Oct3/4 (*octamer-binding transcription factor 4*), Sox2 (*sex-determining region Y-box2*), Klf4 (*Kruppel-like factor 4*) y c-Myc (*cellular myelocytomatosis oncogene*), conocidos conjuntamente como OSKM (Cipriano et al., 2023; Takahashi & Yamanaka, 2006). Si bien es cierto que c-Myc no es indispensable para la reprogramación celular, facilita y aumenta considerablemente la eficiencia de reprogramación (Nakagawa et al., 2008; Wernig, Meissner, et al., 2008).

La reprogramación celular mediada por OSKM es un proceso estocástico de baja eficiencia, en el que las células deben pasar distintas fases durante la dediferenciación. A lo largo de este proceso, OSKM ha de inducir en las células una transición mesénquima-epitelio, suprimir la expresión de genes relacionados con la identidad celular y reactivar genes de pluripotencia para culminar en una fase final donde las células pluripotentes ya son independientes de los factores de transcripción exógenos (Buganim et al., 2012; David & Polo, 2014).

Tras el descubrimiento de Takahashi y Yamanka, surgió un gran interés en el campo de la reprogramación celular a través de OSKM, y muy poco después se demostró que estos factores de reprogramación permiten la formación de iPSC partiendo de múltiples tipos celulares, tanto de ratón como de humanos (Hanna et al., 2007; Park et al., 2008; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007).

1.1.3 Reprogramación *in vivo*

La primera demostración de reprogramación *in vivo* se reportó en el año 2013, donde se demostró por primera vez un proceso completo de dediferenciación celular en distintos tejidos mediante la sobreexpresión de OSKM (Abad et al., 2013). Este grupo generó dos líneas de un modelo de ratón reprogramable: i4F-A e i4F-B. Ambas líneas de ratón poseían un casete policistrónico que codificaba para OSKM bajo el control de un promotor inducible (TetO). Estos ratones poseían también otra modificación localizada en el locus *Rosa26*, donde se encontraba insertado el transactivador reverso de tetraciclina (*reverse tetracycline-controlled transactivator*, rtTA). En presencia de una tetraciclina, como la doxiciclina (administrada en agua de bebida), rtTA se une a TetO, permitiendo así la expresión de OSKM (Figura 2). La única diferencia entre ambas líneas de ratón era el lugar de inserción del casete policistrónico que codificaba para los factores de reprogramación: el ratón i4F-A presentaba la inserción en el locus *Neto2*, mientras que el i4F-B lo presentaba en el locus *Pparg* (Abad et al., 2013).

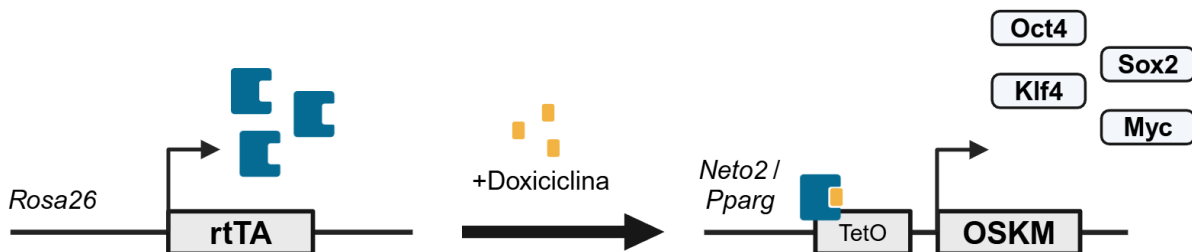


Figura 2. Representación esquemática del primer modelo de ratón reprogramable. En este esquema se representa cómo la expresión de OSKM es inducible por doxiciclina (Abad et al., 2013). Figura generada con Biorender.

Con estos modelos de ratón se demostró que la inducción de OSKM *in vivo* desencadena la desdiferenciación y la pluripotencia en distintos tipos celular, observando la pérdida de marcadores específicos de tejido (como el marcador epitelial Krt19) y la expresión del marcador de pluripotencia Nanog. La formación de iPSC *in vivo* conlleva la formación de estructuras tipo embrionarias y de teratomas, donde se comprobó histológicamente la formación de las 3 capas embrionarias, debido a la expansión y diferenciación desorganizada de las células pluripotentes. Como consecuencia, la formación de los teratomas en distintos órganos conllevaba la muerte de los ratones que habían expresado OSKM (Abad et al., 2013).

Cabe destacar que las iPSC generadas en este modelo de ratón presentaron la capacidad de desarrollar tejidos extraembrionarios, como el ectodermo extraembrionario y tejido similar al saco vitelino con eritropoyesis embrionaria asociada, presentando así un mayor grado de plasticidad que las células madre embrionarias o las iPSC generadas *in vitro* (Abad et al., 2013).

1.1.4 Reprogramación no integrativa

A raíz de la descripción de la reprogramación con factores definidos surgió una gran expectativa respecto a las posibles aplicaciones clínicas de la reprogramación. No obstante, la formación de teratomas y la reactivación de *Myc*, que está ligada al proceso de formación tumoral, hace que este sistema no sea directamente aplicable a humanos (Okita et al., 2007). Además, el hecho de que fuese necesaria la integración genética de los factores de reprogramación, pudiendo causar la interrupción o activación aberrante de genes vecinos, le restaba cualquier posible aplicabilidad terapéutica. Sin embargo, poco después se propuso la reprogramación a través de OSKM no integrativa. Para ello, se utilizaron distintas técnicas con este fin, como el uso de adenovirus (Stadtfeld et al., 2008), transposones (Woltjen et al., 2009), plásmidos (Okita et al., 2008; Yu et al., 2009), virus Sendai (Fusaki et al., 2009; Nishimura et al., 2011), ARNm sintéticos (Warren et al., 2010) o las proteínas recombinantes codificadas por OSKM (D. Kim et al., 2009). Además de todo esto, se ha descrito que mediante el tratamiento con compuestos químicos definidos es posible la reprogramación de fibroblastos de ratón a iPSC, independiente de OSKM (Hou et al., 2013; Takahashi & Yamanaka, 2016).

Estos avances han abierto una importante ventana terapéutica (Takahashi & Yamanaka, 2016). Por ejemplo, ratones con anemia de células falciformes han sido tratados con células hematopoyéticas derivadas de iPSC (Hanna et al., 2007), mientras que células neuronales derivadas de iPSC se han utilizado para tratar el Parkinson (Wernig et al. 2008) y lesiones medulares en ratones (Tsuji et al., 2010).

1.1.5 Reprogramación química

De entre todas las técnicas de reprogramación independiente de la integración genómica de OSKM, la reprogramación química es una de las más importantes, ya que ofrece un mayor potencial de integración en la práctica clínica. Para ello, fue necesaria la identificación de pequeñas moléculas que pudiesen alterar la identidad celular, promover la proliferación y reactivar genes de pluripotencia.

En 2013, Hou et al. identificaron 7 compuestos químicos que permitían llevar a cabo el proceso de reprogramación química: ácido valproico (VPA), CHIR99021, RepSox (E-616452), Tranilcipromina (TCP), Forskolina, 3-Deazaneplanocina A (DZNep) y TTNPB (Hou et al., 2013). La acción combinada de estos 7 compuestos (7c) generó células madre pluripotentes

inducidas químicamente (*Chemically induced Pluripotent Stem Cells*, CiPSC), que comparten similitudes con las células madre embrionarias en cuanto a su expresión génica, estado epigenético, capacidad de diferenciación *in vivo* y generación de quimeras (Hou et al., 2013; Xie et al., 2017). Desde entonces, distintos diseños experimentales y combinaciones con muchos otros compuestos químicos han sido propuestos para promover la reprogramación hacia células progenitoras o la transdiferenciación hacia distintos tipos celulares (Xie et al., 2017). Empleando distintas variaciones del cóctel de reprogramación química, se consiguió generar *in vitro* diversos tipos celulares, incluyendo neuronas (X. Li et al., 2015), células madre neurales (M. Zhang et al., 2016), cardiomiocitos (Fu et al., 2015), hepatocitos (Bai et al., 2023) y fotorreceptores (Mahato et al., 2020) partiendo de fibroblastos de ratón. Además, *in vivo* se consiguió a través de la reprogramación química, la conversión directa de astrocitos a neuronas (Ma et al., 2021), y de fibroblastos a cardíacos a cardiomiocitos (Huang et al., 2018), lo que demuestra la capacidad de la reprogramación química para la generación de distintos tipos celulares sin necesidad de manipulación genética.

Posteriormente, se descubrió que mediante el uso de compuestos químicos también era posible reprogramar células somáticas humanas, formando así CiPSC humanas (hCiPSC). Los investigadores, partiendo de los 7c descritos para reprogramación química de células de ratón, encontraron un conjunto de compuestos químicos que permitían la desdiferenciación de células humanas: VPA, CHIR99021, RepSox, TPC, DZNep, EPZ004777, UNC0379, Y27632 y PD0325901 (Guan et al., 2022). Estas modificaciones fueron necesarias debido a que las rutas que regulan la pluripotencia en células madre humanas, son diferentes de las que presentan las células madre murinas (Guan et al., 2022; Xie et al., 2017). Las hCiPSC resultaron ser molecular y funcionalmente similares a las células madre embrionarias humanas. Esto significa que las pequeñas moléculas también son capaces de modular el paisaje epigenético, restablecer la plasticidad celular y reiniciar el potencial regenerativo, revertiendo las modificaciones relacionadas con la diferenciación y el envejecimiento en las células humanas (Guan et al., 2022). Además, al igual que con células de ratón, se demostró que la reprogramación química permite generar neuronas partiendo de fibroblastos o astrocitos humanos (Hu et al., 2015; Yin et al., 2019; L. Zhang et al., 2015) y cardiomiocitos a partir de fibroblastos humanos (Cao et al., 2016).

1.1.6 Reprogramación parcial

El descubrimiento de la reprogramación celular dio lugar a múltiples estrategias para el tratamiento de enfermedades degenerativas, ya que las células reprogramadas poseen un potencial regenerativo ilimitado (Cerneckis et al., 2024). Sin embargo, su aplicabilidad clínica real es muy escasa dado el riesgo de formación de tumores y teratomas (Abad et al., 2013; Ohnishi et al., 2014). Además, la reprogramación *in vivo* se ha relacionado con la disfunción y el fallo de diversos órganos debido a la pérdida de identidad celular, que puede inducir la muerte del animal mucho antes de la formación de teratomas o tumores (Parras et al., 2023).

Debido a los problemas que suponía el proceso de reprogramación celular, se propuso como alternativa un proceso de reprogramación incompleto (reprogramación parcial) (**Figura 3**) en el que se da un rejuvenecimiento epigenético sin llegar a perder en ningún momento la identidad celular (Manukyan & Singh, 2012, 2014; P. B. Singh & Zacouto, 2010). Para conseguir una reprogramación parcial, sin promover una desdiferenciación completa ni dar lugar a la formación de iPSC, se promueve la expresión de los factores OSKM de manera corta. Se comprobó en células humanas envejecidas que el proceso de reprogramación parcial disminuía

la edad celular, reduciendo la edad epigenética y el perfil proinflamatorio, mientras que restauraba la capacidad regenerativa propia de una célula joven sin llegar a perder la identidad celular (Manukyan & Singh, 2014; Sarkar et al., 2020).

En el contexto *in vivo* se comprobó que tras varios ciclos de expresión corta de OSKM, los animales viejos presentaban una mejora significativa en relación al fenotipo asociado al envejecimiento, aumentando su esperanza de vida (Ocampo et al., 2016). El rejuvenecimiento tras la reprogramación parcial de ratones envejecidos se puede observar en la mejora significativa de marcadores transcriptómicos, epigenéticos y metabólicos relacionados con el envejecimiento (Chondronasiou, Gill, et al., 2022; Ocampo et al., 2016).

Se ha planteado también la posibilidad de promover la reprogramación parcial química. El hecho de que las células somáticas puedan reprogramarse para convertirse en células madre pluripotentes mediante reprogramación química, indica la posibilidad de revertir las marcas epigenéticas relacionadas con el envejecimiento utilizando únicamente compuestos químicos (J. Wang et al., 2023). Esto se ha comprobado en células envejecidas, donde el tratamiento con compuestos químicos logró revertir marcas epigenéticas asociadas al envejecimiento y promover el rejuvenecimiento transcriptómico, proteómico y metabólico, sin alterar la identidad celular (Mitchell et al., 2024; Schoenfeldt et al., 2022; Yang et al., 2023). Recientemente, se ha planteado como alternativa a la limitación temporal del tratamiento con compuestos químicos, el empleo de un subconjunto específico de los factores químicos presentes en 7c: RepSox y TCP (2c) (**Figura 3**) (Schoenfeldt et al., 2022). RepSox es un inhibidor de Alk5, el receptor tipo 1 de TFG- β (TFG- β -RI), cuyo tratamiento inhibe la ruta de señalización de la familia de proteínas SMAD. Esta molécula se ha descrito que reemplaza al factor de transcripción *Sox2* durante la reprogramación, mediante la inducción de *Nanog* (Ichida et al., 2009; Maherali & Hochedlinger, 2009). Por otra parte, TCP es un inhibidor de la demetilasa-1 específica de lisinas (LSD1), una monoamino oxidasa (MAO) mitocondrial que desmetila específicamente la histona H3K4 (Drechsel et al., 2020; M. G. Lee et al., 2006; Youdim et al., 1979). TCP tiene un efecto potenciador de la reprogramación (Y. Kim et al., 2020), permitiendo además la reprogramación solo con *Oct4* y *Klf4* en combinación con un inhibidor de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), CHIR99021 (W. Li et al., 2009). Así mismo, TCP al inhibir a LSD1 favorece la diferenciación epitelial al eliminar la represión de factores de transcripción clave para el destino celular, lo que demuestra que puede modular la accesibilidad de la cromatina (Egolf et al., 2019). La reprogramación parcial química con 2c en células envejecidas ha mostrado una mejora en distintos marcadores de envejecimiento, así como un aumento en la esperanza de vida en *Caenorhabditis elegans* (Schoenfeldt et al., 2022).

La reprogramación parcial, tanto genética como química, presenta un potencial rejuvenecedor al promover una remodelación epigenética y mejorar el fenotipo asociado con el envejecimiento en distintos tejidos y órganos (Cipriano et al., 2023; Ocampo et al., 2016; Schoenfeldt et al., 2022). Además, la reprogramación parcial no da lugar a la formación de teratomas y tumores, ni a la pérdida de funcionalidad del tejido que ocurre al desaparecer total o parcialmente la identidad celular.

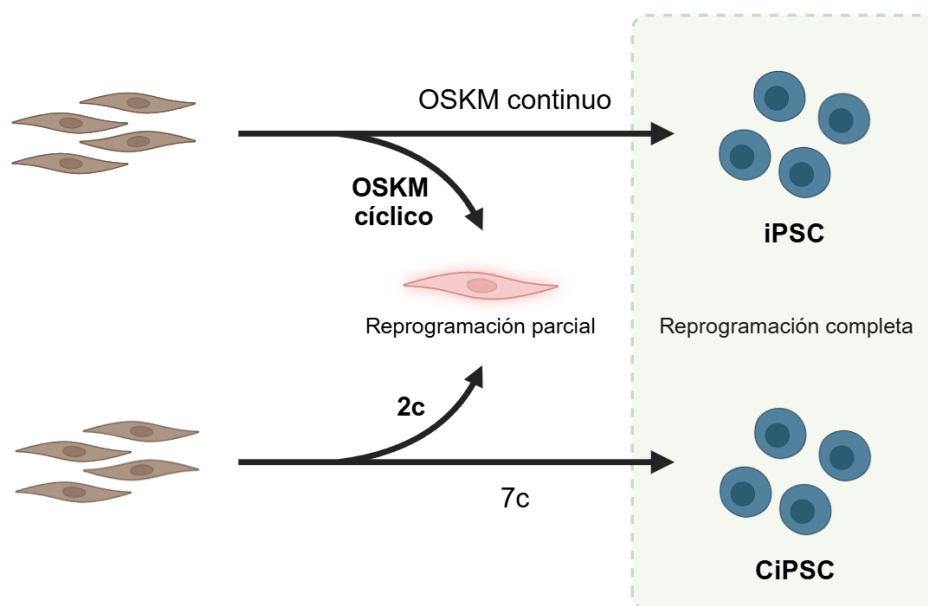


Figura 3. Representación esquemática de reprogramación completa y parcial. En la figura se representan la reprogramación completa mediante OSKM y 7c, y la alternativa de la reprogramación parcial, mediante la expresión de OSKM de manera cíclica y el tratamiento con 2c. Figura generada con *Biorender*, inspirado en Schoenfeldt et al., 2022.

1.1.7 Aplicaciones y limitaciones de la reprogramación parcial como herramienta terapéutica

A pesar del potencial rejuvenecedor de la reprogramación parcial *in vivo*, existen riesgos asociados a esta técnica bastante importantes. Uno de los principales riesgos es el de llevar a cabo involuntariamente un proceso de reprogramación celular completo, lo que daría lugar a la pérdida de identidad celular y a la formación de teratomas en el tejido (Abad et al., 2013). Dada la complejidad del microambiente tisular, y que ciertos factores proinflamatorios pueden promover la reprogramación celular (Mosteiro et al., 2016; Von Joest et al., 2022), controlar la reprogramación celular *in vivo* puede resultar complicado. Además, la reprogramación parcial de todo el organismo presenta un problema relacionado con la expresión no homogénea de OSKM y la dificultad de ciertos tejidos para reprogramarse, como es el caso del músculo (Chiche et al., 2017). Por otro lado, ya que el intestino y el hígado están implicados en la absorción y metabolismo de nutrientes, están más expuestos al tratamiento con doxiciclina. Esto, junto con la alta plasticidad de estos tejidos, hacen que la expresión de OSKM afecte a la funcionalidad del hígado e intestino mucho antes que a otros tejidos, lo que resulta en una mala absorción de los nutrientes, siendo muy perjudicial para los animales (Parras et al., 2023). En cuanto a la reprogramación parcial química, se necesita una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares implicados en los fármacos usados, para así minimizar los efectos no deseados (*off-target*) (Y. Kim et al., 2020; J. Wang et al., 2023). A todo esto ha de sumarse que el proceso de reprogramación, dada su naturaleza estocástica, es muy poco eficiente, haciendo que el resultado de la reprogramación parcial no sea del todo predecible (Hanna et al., 2009).

Aun con estas limitaciones, la reprogramación parcial *in vivo* sigue teniendo un potencial biomédico muy interesante. Limitando la expresión a tejidos de interés, evitando que se dé en órganos con plasticidad muy elevada como el hígado e intestino delgado, se reduce en gran

medida el efecto negativo de los factores de reprogramación, pudiendo así promover un rejuvenecimiento del animal de manera más segura (Parras et al., 2023).

Se comprobó que la reprogramación parcial favorece la regeneración del tejido esquelético, mejora la capacidad muscular y contribuye a la regeneración de cardiomiocitos (Y. Chen et al., 2021; De Lázaro et al., 2019; Ocampo et al., 2016; C. Wang et al., 2021). Estos estudios abren la posibilidad terapéutica del uso de la reprogramación parcial para tratar enfermedades cardíacas, ya que la regeneración de cardiomiocitos podría facilitar la reparación del tejido dañado en determinadas situaciones como el infarto de miocardio y la insuficiencia cardíaca. Por otro lado, al reducir la metilación del ADN asociada al envejecimiento, la reprogramación parcial dirigida a neuronas puede estimular la regeneración del nervio óptico (Lu et al., 2020) y mejorar la memoria en ratones y ratas (Antón-Fernández et al., 2024; Horvath et al., 2024; Rodríguez-Matellán et al., 2020). Asimismo, se demostró que la reprogramación parcial al favorecer el rejuvenecimiento epigenético y la restauración del metabolismo energético de las células del núcleo pulposo, inhibe la progresión de la degeneración del disco intervertebral (F. Cheng et al., 2022).

Como ya se ha mencionado anteriormente, a través de la reprogramación química es posible generar por transdiferenciación directa: neuronas (Hu et al., 2015; X. Li et al., 2015), cardiomiocitos (Fu et al., 2015) o distintas líneas progenitoras, como las células madre neuronales (L. Cheng et al., 2014), lo que abre una ventana terapéutica en cuanto a regeneración cardíaca y neuronal. Recientemente, la reprogramación parcial química se ha usado para tratar lesiones cutáneas por quemaduras en ratones, resultando en la regeneración de glándulas sudoríparas, crucial para la rehabilitación funcional de pacientes con quemaduras (H. Chen et al., 2024). Estos resultados demuestran la aplicabilidad de la transdiferenciación localizada mediante reprogramación química para el tratamiento de lesiones cutáneas.

De manera general, se ha comprobado que la reprogramación parcial promueve un aumento en la esperanza de vida de los ratones parcialmente reprogramados (Alle et al., 2022; Ocampo et al., 2016), y mejora diversas alteraciones patológicas específicas de distintos tejidos cuando se limita la reprogramación parcial a ciertos tipos celulares (Paine et al., 2024; Parras et al., 2023). Por todo esto, a pesar de sus limitaciones, la reprogramación parcial presenta un potencial biomédico muy prometedor. Específicamente, la reprogramación química representa una opción más interesante para su posible traslado a la clínica, ya que no es necesario el uso de factores genéticos y se podría ajustar el tratamiento de manera más controlada. El uso de 2c destaca como una alternativa especialmente prometedora, dado que estos dos compuestos por sí solos no promueven la pérdida de identidad celular ni la tumorigénesis, garantizando una mayor seguridad en sus potenciales usos terapéuticos.

1.2 SENESCENCIA CELULAR

La senescencia es un estado en el que las células presentan una parada estable, y generalmente irreversible, del ciclo celular, manteniéndose metabólicamente activas (Gorgoulis et al., 2019). Este proceso fue descrito por primera vez por Hayflick y Moorhead, quienes observaron *in vitro* que las células primarias, a diferencia de las tumorales, poseían una capacidad proliferativa limitada (Hayflick & Moorhead, 1961).

Esto no solo ocurre tras numerosas divisiones celulares, sino que ante determinado daño o estrés fisiológico que pueda comprometer a la homeostasis celular, las células activan mecanismos

para restaurar su integridad estructural y funcional. Cuando estos daños no pueden ser restaurados eficazmente, la célula puede desencadenar una respuesta de muerte celular programada (apoptosis) o promover la entrada en senescencia (Gorgoulis et al., 2019). La parada del ciclo celular se da como mecanismo de defensa para evitar la proliferación de las células cuya integridad genética se haya visto alterada de alguna forma, suponiendo una barrera que se opone al proceso de inicio y progresión tumoral (Collado et al., 2007; Prieur & Peper, 2008).

1.2.1 Estímulos desencadenantes de la senescencia

La senescencia se desencadena como respuesta a un daño en la célula y existe una amplia variedad de estímulos descritos que dan lugar a esta respuesta celular. De forma general, estos estímulos detienen el ciclo celular en la fase G1, mediante distintos mecanismos moleculares interconectados (**Figura 4**).

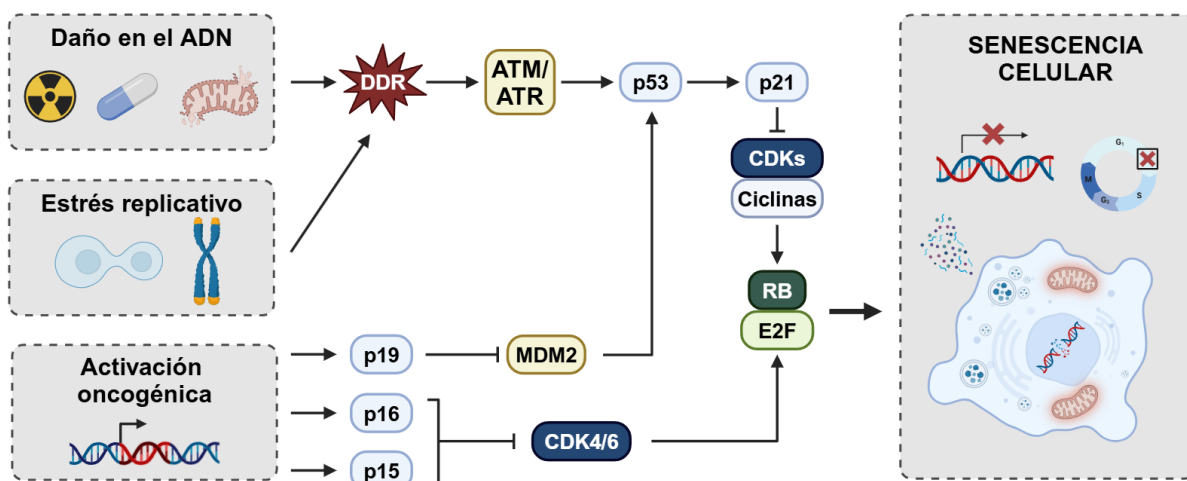


Figura 4. Esquema de los distintos mecanismos moleculares que inducen la entrada en senescencia. Se ilustran los estímulos clave que promueven este proceso y las rutas moleculares activadas en respuesta al daño. Imagen generada con *Biorender*.

1.2.1.1 Senescencia replicativa

La senescencia replicativa fue descrita por primera vez por Hayflick y Moorhead en 1961, quienes observaron que las células tenían una capacidad proliferativa limitada (“límite de Hayflick”) (Hayflick & Moorhead, 1961). Este fenómeno está asociado con el acortamiento telomérico progresivo promovido por las sucesivas divisiones celulares (Blasco, 2005). Cuando los telómeros alcanzan una longitud críticamente corta, se activa la respuesta de daño en el ADN, lo que a su vez activa la proteína de supresión tumoral p53 dando lugar a la entrada en senescencia (Collado et al., 2007; Gorgoulis et al., 2019). Dado que la expresión de la telomerasa es capaz de evitar el acortamiento telomérico (Blasco et al., 1997), promoviendo la expresión de telomerasa se previene la senescencia replicativa, confirmando así que el acortamiento telomérico es la causa principal de este proceso (Bodnar et al., 1998; Collado et al., 2007).

1.2.1.2 Senescencia por daño en el ADN

Cuando las células sufren un daño en el ADN inician un proceso de respuesta a dicho daño (*DNA Damage Response, DDR*), en el que detienen temporalmente su ciclo celular (Jackson &

Bartek, 2009). Cuando las células no son capaces de reparar eficazmente el daño en el ADN, entran en senescencia como respuesta protectora, ya que la estabilidad estructural cromosómica se ve comprometida (d'Adda Di Fagagna, 2008; Fumagalli et al., 2014). El daño persistente en el ADN es detectado por las quinasas ATR y ATM, cuya actividad induce la fosforilación local de la histona H2AX (γ H2AX). Esto genera un bucle de retroalimentación positiva, extendiendo la γ H2AX a lo largo de la cromatina, dando lugar así a focos de γ H2AX detectables. Además, el aumento significativo de ATR y ATM no tiene un efecto exclusivamente local, sino que al activar las quinasas CHK1/2, promueven la activación de p53 (Turenne et al., 2001). A su vez, la activación de p53 promueve la transcripción de p21 (*Cdkn1a*), un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (*Cyclin-Dependent Kinase inhibitor*, CDKi) que promueve la hipofosforilación de Rb, evitando así que se liberen los factores de la familia E2F. Estos son factores de transcripción involucrados en el control del ciclo celular y, al no estar libres, no se transcriben los genes necesarios para la progresión de la fase G1 a la fase S, lo que permite la entrada en senescencia (Collado et al., 2007; Sharpless, 2005).

Los inductores de senescencia por daño en el ADN más comunes son aquellos que ocasionan roturas simples o de doble cadena del ADN, como la radiación ionizante (Sedelnikova et al., 2004), radiación UV o los fármacos citotóxicos usados en quimioterapia (Gorgoulis et al., 2019; Novakova et al., 2010; Schmitt et al., 2002). Además, el estrés oxidativo que se produce por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) debido a la disfunción mitocondrial típica de la senescencia, promueve el daño en el ADN (general y telomérico), lo que potencia la parada del ciclo celular (Parrinello et al., 2003; Passos et al., 2007).

1.2.1.3 Senescencia inducida por oncogenes

La senescencia también puede ser activada como respuesta a un estímulo oncogénico (Serrano et al., 1997). La expresión de un oncogén (como los mutantes de RAS, RAF, o MEK) en una célula normal no es suficiente para promover la transformación celular, sino que activan la entrada en senescencia (Collado & Serrano, 2010; Prieur & Peeper, 2008). Esto se considera un mecanismo de supresión tumoral, dado que impide la proliferación de una célula que expresa un oncogén agresivo, restringiendo así la progresión tumoral (Collado et al., 2007).

Ante la expresión oncogénica se activa como mecanismo de defensa el gen *Cdkn2a*, que codifica para la proteína de supresión tumoral p16^{Ink4a} (Serrano et al., 1997; Yamakoshi et al., 2009). Esta proteína actúa inhibiendo las quinasas dependientes de ciclinas 4/6 (CDK4/6), lo que resulta en la hipofosforilación de la familia de proteínas del retinoblastoma (Rb). Como ya se ha explicado, este proceso tiene como consecuencia la entrada en senescencia al inhibir la progresión del ciclo celular. El gen *Cdkn2a* se encuentra en el locus *Ink4/Arf*, donde están también codificados otros 2 importantes genes para la supresión tumoral y la inducción de senescencia: *Arf* (p19 en ratones o p14 en humanos) y *Cdkn2b* (p15). La expresión de estas proteínas también se ve incrementada ante la activación de un oncogén: p19 estabiliza p53 al inhibir MDM2, promoviendo la transcripción de p21, mientras que p15 ayuda a la inhibición de CDK4/6, lo que en conjunto favorece la parada estable del ciclo celular (Erickson et al., 1998; Sharpless, 2005; Wagner & Wagner, 2022). Cabe destacar, que la expresión de este locus no se da únicamente por activación oncogénica, sino que el DDR y la erosión telomérica pueden también activar esta vía (Lujambio, 2016).

La activación oncogénica activa a su vez el DDR, que se desencadena por la hiperreplicación del ADN inducida por expresión de oncogenes (Di Micco et al., 2006). Se ha descrito que la activación oncogénica también aumenta la producción de ROS, lo que refuerza el DDR y promueve aún más la entrada en senescencia (Ogrunc et al., 2014).

1.2.2 Características de las células senescentes

A pesar de la heterogeneidad intrínseca de las células senescentes, existen características comunes que permiten identificar este estado celular. A continuación, se detallan las características interdependientes que definen en gran medida a las células senescentes (**Figura 5**).

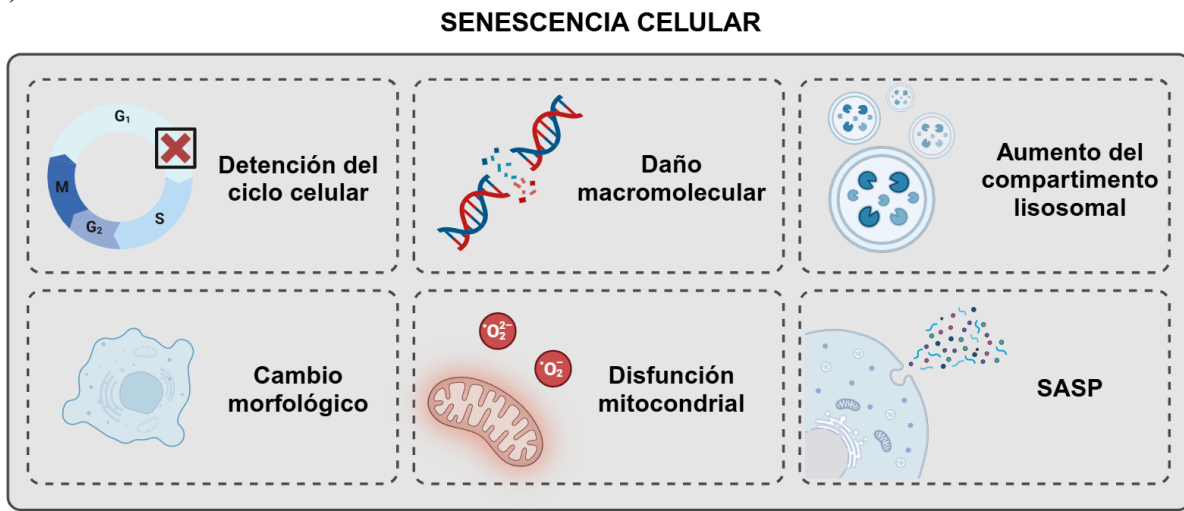


Figura 5. Esquema de las características de la senescencia celular. En esta figura se representan esquemáticamente las principales características de las células senescentes. Figura generada con Biorender.

1.2.2.1 Detención del ciclo celular

Es importante diferenciar la senescencia de otros tipos de parada del ciclo celular, como la diferenciación terminal o la quiescencia. Si bien es cierto que estos estados celulares comparten alguna característica con la senescencia (como la hipofosforilación de Rb), estos tipos de detención del ciclo celular difieren de la senescencia en su durabilidad y en otras características (S. He & Sharpless, 2017). La quiescencia es un estado de detención temporal en el que la proliferación se puede restablecer mediante estímulos apropiados, mientras que la diferenciación terminal es la adquisición de funciones celulares específicas acompañada de una detención duradera del ciclo celular mediada por vías distintas de las de la senescencia celular (Gorgoulis et al., 2019). Por el contrario, la senescencia supone un estado de detención del ciclo celular estable y generalmente irreversible, inducido por daño o estrés fisiológico, que presenta las características específicas que se detallan a continuación (Gorgoulis et al., 2019; S. He & Sharpless, 2017).

1.2.2.2 Daño macromolecular

Como ya se ha comentado anteriormente, el daño persistente en el ADN ocasionado por distintos estímulos es uno de los principales desencadenantes de la senescencia celular. Por ello, una característica común de las células senescentes es la presencia de focos de cromatina asociados a daño en el ADN (Gorgoulis et al., 2019), conocidos como *DNA-SCARS* (*DNA-Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence*). Estos focos nucleares de daño persistente se

asocian con cuerpos nucleares PML, carecen de proteínas de reparación como RPA o RAD51, y contienen formas activas de los mediadores de DDR como CHK2 y p53 (Rodier et al., 2011). Otra característica asociada con el daño en el ADN de las células senescentes son los fragmentos de cromatina libres en el citoplasma (*Cytoplasmic Chromatin Fragments*, CCFs), que activan una respuesta proinflamatoria mediada por la vía cGAS-STING (Gorgoulis et al., 2019). El daño persistente también se puede localizar en los telómeros, dando lugar a focos conocidos como TIF (*Telomere Dysfunction induced Foci*) (Campisi, 2013).

Además de en el ADN, las células senescentes se caracterizan por presentar daño no reversible en proteínas y lípidos. Este daño se debe principalmente a la producción y acumulación de ROS debido a la disfunción mitocondrial típica de la senescencia, que promueve la oxidación de proteínas y lípidos, además de otras modificaciones que afectan a su estructura y funcionalidad (Gorgoulis et al., 2019; Höhn et al., 2017; Ogrodnik et al., 2017).

1.2.2.3 Disfunción mitocondrial

Las células senescentes presentan varios cambios en la función, dinámica y morfología mitocondrial. Las mitocondrias de las células senescentes son menos funcionales dado que presentan una reducción en el potencial de membrana, repercutiendo negativamente en la producción de ATP (Gorgoulis et al., 2019; Passos et al., 2010). Para compensar esto, la masa mitocondrial durante la senescencia se ve aumentada, lo que deriva en la acumulación de mitocondrias disfuncionales. Esto aumenta la producción de ROS, que promueve el daño macromolecular y fortalece así la parada del ciclo celular (Korolchuk et al., 2017; Miwa et al., 2022). Cabe destacar que la reducción de ATP da lugar a ratios AMP:ATP y ADP:ATP alterados, lo que activa a AMPK y fortalece la entrada en senescencia. Además, las células senescentes suelen presentar fuga de protones, tasas de fusión/fisión mitocondrial reducidas y una mayor producción de metabolitos intermediarios del ciclo de Krebs (Gorgoulis et al., 2019; Kaplon et al., 2013).

Todo esto ocasiona un profundo impacto en la bioenergética celular. El aumento de la masa mitocondrial se traduce en un aumento en el consumo de oxígeno (*Oxygen Consumption Rate*, OCR). Sin embargo, dada la disfunción mitocondrial, se reduce la eficiencia en la producción de ATP mediante fosforilación oxidativa, lo que las células senescentes corrigen aumentando la producción de ATP a través de la glucólisis (Korolchuk et al., 2017).

La disfunción mitocondrial durante la senescencia también está íntimamente ligada con el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). La reducción del cociente NAD⁺/NADH y la consecuente alteración de la producción de PARP y sirtuinas, activa al regulador del SASP NF-κB (Birch & Passos, 2017; Gorgoulis et al., 2019). Recientemente se ha demostrado que la liberación durante la senescencia de ADN y ARN bicatenario mitocondrial al citosol a través de macroporos mitocondriales BAX/BAK, regulan positivamente la señalización proinflamatoria del SASP al activar las vías de cGAS/STING y RIG-I/MDA5, respectivamente (López-Polo et al., 2024; Victorelli et al., 2023). En conjunto, estos estudios demuestran la contribución de la alteración mitocondrial de las células senescentes sobre el SASP.

1.2.2.4 SASP

El fenotipo secretor asociado a la senescencia (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*, SASP) es una de las características más importantes de las células senescentes, que conecta este

estado celular con el proceso de envejecimiento del organismo y sus distintas patologías asociadas (Campisi, 2013). El fenotipo secretor engloba un conjunto muy complejo y heterogéneo de moléculas bioactivas como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, proteasas y vesículas extracelulares secretadas por las células senescentes (Coppé et al., 2010; Wallis et al., 2020), que varía según el tipo celular y el estímulo inductor de senescencia (Campisi, 2013). Aunque existen múltiples vías de regulación del SASP, se ha propuesto clasificarlo en dos grupos principales: las dependientes de NF- κ B (NASP) y las dependientes de p53 (PASP). El NASP se encuentra bajo el control del mediador clave de la inflamación cGAS/STING, que activan a NF- κ B (Chien et al., 2011; Salminen et al., 2012). Entre los factores del NASP se encuentran: IL1 α , IL β , IL6, IL8, IL10, CXCL1, CXCL2, VEGF, MMP3, TNF α y FGF (De Blander et al., 2021; Wiley et al., 2016). Por otra parte, entre los factores del PASP, regulados por el supresor tumoral p53, se encuentran: GRO α , IGFBP3, LIF, IL6, IL8, CCL2, CCL17, Leptina, ISG15, GDF15 y TGF α (De Blander et al., 2021; B. Wang et al., 2022).

El SASP juega un papel importante en la comunicación celular y en la modulación del microambiente tisular, tanto en procesos fisiológicos como patológicos (Coppé et al., 2008, 2010; Kuilman et al., 2008). Paradójicamente, se ha descrito un papel del SASP tanto positivo como negativo (**Figura 6**), que se desarrollará en el apartado “1.2.3 Papel dual de la senescencia”.

1.2.2.5 Aumento del compartimento lisosomal

Las células senescentes se caracterizan por el aumento en número y tamaño de los lisosomas (Robbins et al., 1970). Al igual que ocurre con la masa mitocondrial, el aumento del número lisosomal podría reflejar un intento de equilibrar la acumulación gradual de lisosomas disfuncionales mediante la producción de nuevos lisosomas (Gorgoulis et al., 2019; Salama et al., 2014). El aumento del compartimento lisosomal da lugar al aumento detectable de la actividad beta-galactosidasa, enzima localizada en los lisosomas que cataliza la hidrólisis de galactósidos a monosacáridos (B. Y. Lee et al., 2006). Por ello, el aumento detectable de la actividad de esta enzima se ha definido como una característica de la senescencia: actividad beta-galactosidasa asociada a la senescencia (*Senescence-Associated β -Galactosidase Activity*, SA- β -Gal) (Dimri et al., 1995; Kurz et al., 2000). Esta enzima tiene su funcionalidad óptima a un pH= 4 - 4,5. Sin embargo, dado el gran aumento del compartimento lisosomal durante la senescencia, es posible detectar su actividad a un pH = 6 en las células senescentes, lo que permite reconocer células senescentes *in vitro* e *in vivo* (Campisi, 2013; d’Adda Di Fagagna, 2008).

1.2.2.6 Cambio morfológico

Una de las características más importantes que nos permite reconocer a las células senescentes son los múltiples cambios morfológicos que presentan. Generalmente, las células senescentes muestran un citoplasma agrandado y aplanado (Hayflick & Moorhead, 1961). Esto se debe en gran medida al aumento de la masa mitocondrial y lisosomal, que aporta además un aspecto granular al citoplasma de las células senescentes (Gorgoulis et al., 2019; Korolchuk et al., 2017). Del mismo modo, el tamaño del núcleo y del nucleolo se ven aumentados durante la senescencia (Heckenbach et al., 2022; Narita et al., 2003), siendo común encontrar células senescentes multinucleadas con una característica pérdida de la lámina nuclear B1 (Lamin B1) (Dreesen et al., 2013; Freund et al., 2012).

Otro cambio detectable en las células senescentes se da en la cromatina. La mayoría de las células senescentes muestran una remodelación en el epigenoma, lo que afecta a la organización de la cromatina. Es por ello que en las células senescentes es posible detectar los conocidos como focos de heterocromatina asociados a la senescencia (*Senescence-Associated Heterochromatin Foci*, SAFHs) (Narita et al., 2003). Estos dominios de heterocromatina, enriquecidos con marcas represivas como H3K9me2/3 o HP1, se pueden detectar como estructuras nucleares densas positivas para DAPI (Aird & Zhang, 2013; Di Micco et al., 2021; Narita et al., 2003).

Cabe destacar que no existe un marcador universal para identificar la senescencia, por lo que es necesario utilizar una combinación de múltiples marcadores, optimizada para cada contexto y tipo celular, a fin de detectar de manera fiable a las células senescentes (Ogrodnik et al., 2024; Wallis et al., 2022).

1.2.3 Papel dual de la senescencia

La senescencia celular es un mecanismo biológico que tiene un efecto dual sobre el organismo. Si bien se origina como un mecanismo protector al contribuir a la homeostasis previniendo la proliferación descontrolada de células dañadas, su acumulación en distintos tejidos se ha asociado con numerosos procesos patológicos, mediados en muchos casos a través del SASP (**Figura 6**).

La senescencia se da durante el desarrollo embrionario de distintas especies de vertebrados, lo que sugiere que es un mecanismo evolutivo conservado. Este estado celular se ha detectado en la formación de numerosas estructuras embrionarias, como los mesonefros, el saco endolinfático, la cresta ectodérmica apical, las membranas interdigitales o el tubo neural (Muñoz-Espín & Serrano, 2014; Storer et al., 2013). La senescencia también juega un papel importante en el desarrollo de tejidos adultos, tal y como se puede observar en la involución de la glándula mamaria tras el periodo de lactancia (Chiche et al., 2024).

Una de las funciones más relevantes de la senescencia es la supresión tumoral (Collado et al., 2007). Tras la activación oncogénica, se activan vías clave de supresión tumoral (p16, p53), promoviendo la entrada en senescencia (Campisi, 2013; Muñoz-Espín & Serrano, 2014). Asimismo, el SASP promueve la senescencia de manera paracrina, lo que contribuye a la supresión tumoral al evitar que las células afectadas por el microambiente tumoral puedan seguir proliferando (Takasugi et al., 2023). Además de su papel directo antitumoral, a través del SASP, las células senescentes reclutan células del sistema inmunitario, fomentando la eliminación de células tumorales o células dañadas circundantes (Krizhanovsky, Xue, et al., 2008; Lecot et al., 2016; Ventura et al., 2007; Xue et al., 2007).

Cabe destacar que las células senescentes, mediante el SASP, favorecen la reparación de tejidos dañados (Demaria et al., 2014) y limitan la fibrosis, evitando la formación excesiva de tejido cicatricial y favoreciendo la homeostasis tisular (Krizhanovsky, Xue, et al., 2008; Krizhanovsky, Yon, et al., 2008; Lujambio et al., 2013).

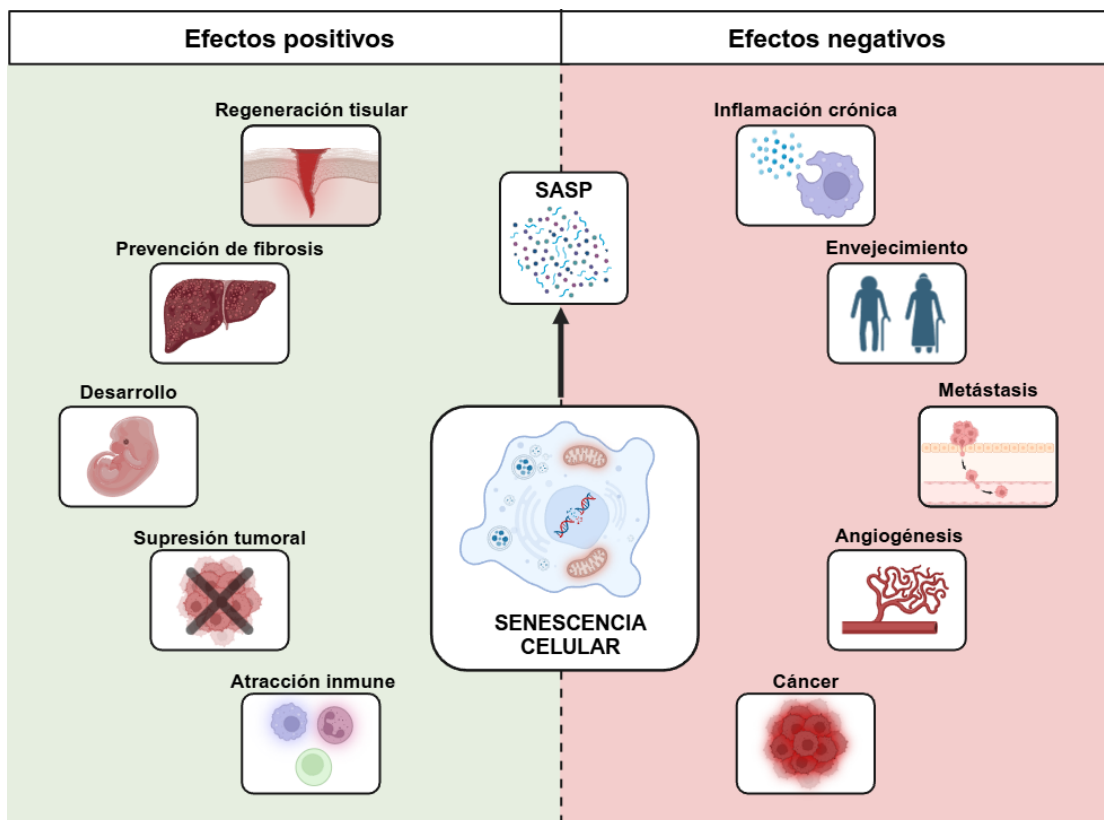


Figura 6. Efectos positivos y negativos de la senescencia. Representación esquemática de los distintos papeles que están relacionados con la senescencia celular. Inspirado en Lecot et al., 2016. Figura generada con *Biorender*.

Por otra parte, las células senescentes se van acumulando en los tejidos progresivamente con el envejecimiento, comprometiendo la estructura y funcionalidad de estos (Campisi, 2013). Cuando el sistema inmunitario no elimina de manera eficaz a las células senescentes, la secreción continua del SASP puede desembocar en una inflamación crónica del tejido. Esta situación propicia el desarrollo de distintas patologías asociadas con el envejecimiento, como la obesidad, la diabetes tipo 2, la fibrosis pulmonar, la osteoartritis o el cáncer (Campisi, 2013; Muñoz-Espín & Serrano, 2014). Como evidencia de la relación entre envejecimiento y senescencia, se comprobó en ratones transgénicos (INK-ATTAC) que la eliminación selectiva de las células senescentes reducía significativamente distintas patologías degenerativas asociadas con la edad, extendiendo la esperanza de vida de estos ratones (Baker et al., 2011).

En relación con el desarrollo del cáncer, las células senescentes a través del SASP pueden crear un microambiente protumoral de varias maneras. En primer lugar, los factores del SASP favorecen la invasión y la metástasis de las células tumorales, alterando y remodelando la estructura tisular (Coppé et al., 2008; Y. H. Kim et al., 2017; Rodier & Campisi, 2011). Las células senescentes secretan grandes cantidades de proteasas que degradan la matriz extracelular, lo que relaja la estructura del tejido y facilita la invasión de células cancerosas (Davalos et al., 2010). Además, la infiltración de células tumorales se ve favorecida por el SASP al inducir una transición epitelio-mesenquima en las células vecinas (Coppé et al., 2008; Lecot et al., 2016). En segundo lugar, el SASP incluye distintos factores angiogénicos, que promueven la proliferación y el ensamblaje de células endoteliales, además de reclutar macrófagos y polarizándolos hacia un fenotipo M2 proangiogénico (Davalos et al., 2010; Kelly et al., 2007; Lecot et al., 2016).

Dada la vinculación de las células senescentes con el desarrollo de múltiples patologías asociadas con el envejecimiento, el uso de estrategias que eliminen selectivamente a las células senescentes (senolíticas) representan una importante ventana de actuación terapéutica (L. Zhang et al., 2023). El uso de múltiples fármacos senolíticos ya ha demostrado *in vivo* que, al eliminar a las células senescentes, se consigue una mejoría de múltiples patologías (Chang et al., 2016; L. Zhang et al., 2023). Por ello, muchos de estos fármacos se encuentran ahora en ensayos clínicos, para estudiar su potencial terapéutico en el contexto de la fibrosis pulmonar, osteoartritis o Alzheimer, entre otras (L. Zhang et al., 2023). Sin embargo, a pesar de que la senescencia celular esté relacionada con distintas patologías, también juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis tisular y el correcto desarrollo de los organismos, por lo que el uso de senolíticos podría tener consecuencias perjudiciales en distintos contextos fisiológicos (Sahu et al., 2024). El tratamiento con estrategias moduladoras del fenotipo senescente (senomórficas), proporciona un enfoque farmacológico alternativo para abordar la senescencia celular (L. Zhang et al., 2023). Al igual que en el caso de los senolíticos, existe una gran variedad de compuestos senomórficos que afectan de distintas maneras a las células senescentes, aunque la mayoría de ellos actúan suprimiendo los efectos perjudiciales del SASP (L. Zhang et al., 2023).

1.2.4 Conexión entre la reprogramación y la senescencia

La reprogramación celular y la senescencia son dos procesos que se pueden considerar biológicamente opuestos. Sin embargo, en estudios recientes se ha descubierto una relación tanto positiva como negativa entre ambos procesos celulares. En primer lugar la senescencia es un proceso que interrumpe la proliferación celular, por lo que supone una barrera intrínseca para el proceso de reprogramación (Banito et al., 2009; Ebrahimi, 2015). Esto se debe a que la activación del locus *Ink4/Arf* y el eje p53/p21 impiden la reprogramación (Hong et al., 2009; Kawamura et al., 2009; H. Li et al., 2009; Marión et al., 2009; Utikal et al., 2009). Se demostró en varios estudios que, tras suprimir la actividad de estas vías reguladoras de senescencia, la eficiencia de reprogramación *in vitro* aumentaba considerablemente (Hong et al., 2009; Kawamura et al., 2009; H. Li et al., 2009; Marión et al., 2009; Utikal et al., 2009). Además, se ha visto que la reprogramación celular también puede desencadenar el proceso de senescencia (Banito et al., 2009), potenciando así el efecto barrera sobre la reprogramación (**Figura 7**). Esto se debe a que, al iniciarse la desdiferenciación, se produce un aumento en la división celular, lo que a su vez incrementa el estrés replicativo, acelera el acortamiento telomérico y activa la señalización de *Ink4/Arf* y p53/p21 (Herbig et al., 2004; Jacobs & De Lange, 2004).

Paradójicamente, la senescencia no solo actúa como una barrera para la reprogramación, sino que también promueve este proceso de manera paracrina (Chiche et al., 2017; Mosteiro et al., 2016) (**Figura 7**). A través del SASP, las células senescentes generan un microambiente tisular que favorece en células circundantes la reprogramación celular mediada por OSKM (Mosteiro et al., 2016), permitiendo la reprogramación en tejidos refractarios a este proceso, como es el caso del músculo esquelético (Chiche et al., 2017, 2020). Un factor clave en este mecanismo es la interleucina 6 (IL6), una de las principales citoquinas del SASP que activa vías de señalización asociadas a la plasticidad celular y potencia la adquisición de un estado pluripotente (Mosteiro et al., 2016). De acuerdo con estos datos, estudios *in vivo* demostraron que las células pluripotentes emergen cerca de las células senescentes, lo que correlaciona positivamente la reprogramación celular y la senescencia (Chiche et al., 2020; Mosteiro et al., 2016).

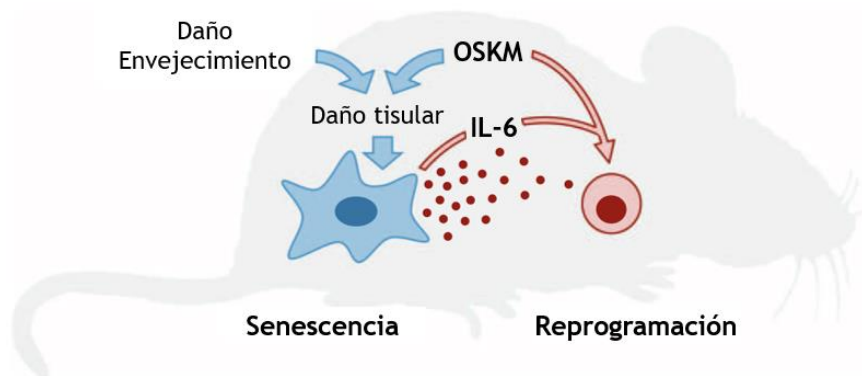


Figura 7. Relación entre la senescencia y la reprogramación celular. Se representa de manera esquemática cómo la expresión de OSKM *in vivo* reprograma algunas células, además de provocar daño y senescencia en otras. Las células senescentes liberan factores, como IL6, que promueven la reprogramación de células adyacentes. Además, el envejecimiento y el daño tisular favorecen la reprogramación *in vivo*, al aumentar la cantidad de células senescentes. Figura adaptada de Mosteiro et al., 2016, con el permiso de *American Association for the Advancement of Science*. Generada con *Biorender*.

Dado que la reprogramación parcial ha demostrado mejorar distintas patologías asociadas con el envejecimiento, y considerando el papel central de la senescencia en este proceso, resulta de gran interés investigar cómo la reprogramación parcial influye directamente sobre el fenotipo senescente. La reprogramación parcial dirigida a las células senescentes podría ser clave para desarrollar estrategias que mejoren la salud, prolonguen la vida y aumenten la resiliencia en personas mayores (Sahu et al., 2024).

Sin embargo, aún es necesario esclarecer de forma precisa cómo la reprogramación parcial, ya sea inducida genética o químicamente, puede modular las características del fenotipo senescente.

1.3 CÁNCER

1.3.1 Características del cáncer

El cáncer es un proceso de proliferación celular descontrolada que puede afectar a la estructura y funcionalidad del tejido donde se origina, y en algunos casos, dar lugar a metástasis al diseminarse y dañar otros tejidos u órganos (Hanahan & Weinberg, 2000). Este proceso patológico engloba a más de 100 tipos de cáncer distintos, además de otros subtipos tumorales presentes en tejidos específicos. Dada la amplia variedad tumoral, existen distintas características y procesos regulatorios para cada tipo. Sin embargo, se han descrito varias alteraciones esenciales en la fisiología celular que en conjunto conducen a una proliferación aberrante (Hanahan & Weinberg, 2000): resistencia a la apoptosis, aumento en la proliferación, evasión de los supresores tumorales, inducción de angiogénesis, inmortalidad replicativa, activación de la invasión y metástasis, evasión inmunológica, inflamación protumoral, mutación e inestabilidad genómica y desregulación energética (**Figura 8**) (Hanahan & Weinberg, 2011). Estas características son adquiridas por la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos, dirigidos principalmente por el proceso de mutación en el ADN, que otorgan una ventaja selectiva a las células cancerígenas (Hanahan & Weinberg, 2011; S. Zhang et al., 2024).

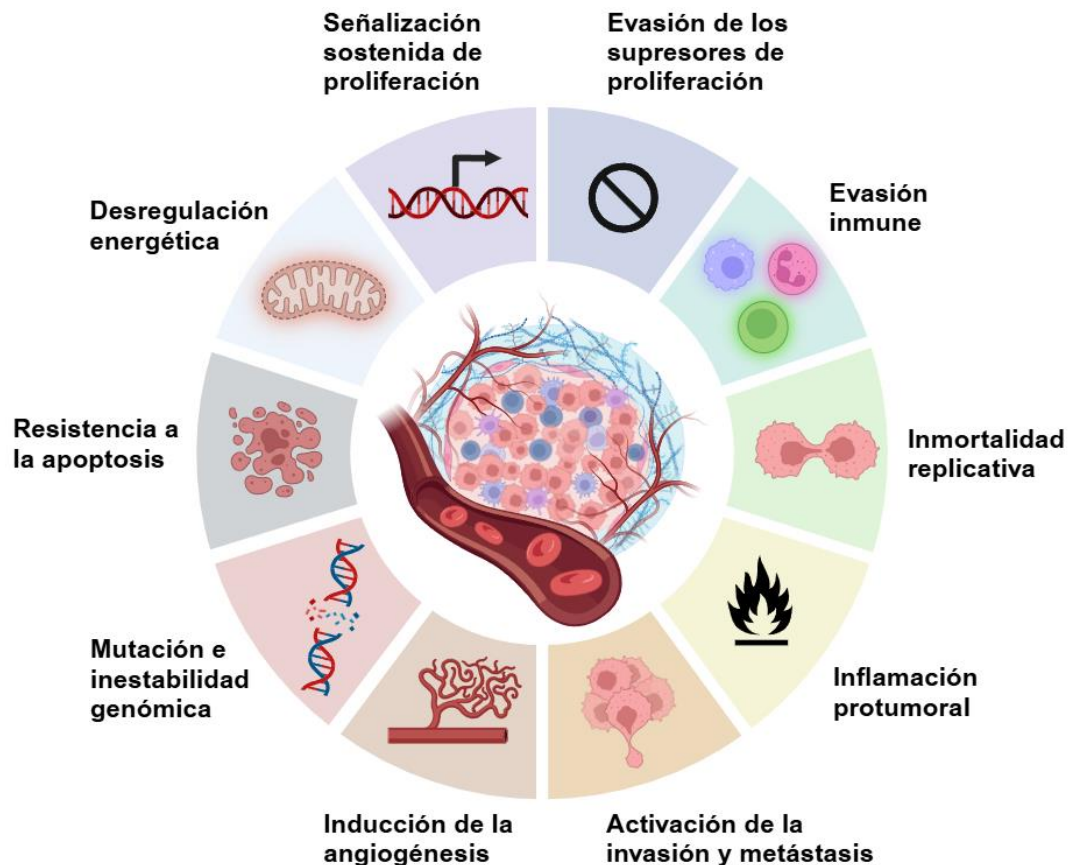


Figura 8. Características clave de las células cancerígenas. Representación esquemática de las principales características de las células tumorales. Figura adaptada de Hanahan & Weinberg (2011), con el permiso de Elsevier. Generada con *Biorender*.

Los oncogenes juegan un papel muy importante en el desarrollo tumoral. Proviene de la mutación de un proto-oncogén, que en condiciones normales controlan la diferenciación y proliferación celular, pero que una vez alterados favorecen la proliferación descontrolada, lo que impulsa el desarrollo del tumor. Existen numerosos oncogenes cuya mutación se ha relacionado con distintos procesos tumorales, como *Ras*, *Myc* o *Her2* (Kontomanolis et al., 2020; Weinberg, 1991). Por otro lado, los genes supresores de proliferación (o supresores tumorales), como por ejemplo *Rb1*, *Cdkn2a*, *Trp53* o *Pten*, actúan como frenos de la proliferación descontrolada. Por ello, muchos tipos tumorales presenta mutaciones en estos genes supresores tumorales, favoreciendo el desarrollo del cáncer (Den Hertog, 2016; Jiao et al., 2018; Kontomanolis et al., 2020; Weinberg, 1991).

1.3.2 Papel del envejecimiento

El desarrollo tumoral es un proceso que está altamente relacionado con el envejecimiento, ya que este es uno de los principales factores de riesgo para la formación de distintos tipos de cáncer (Hanahan & Weinberg, 2000; López-Otín et al., 2023). La inestabilidad genómica es un rasgo distintivo del envejecimiento, al igual que del cáncer. Durante el envejecimiento las células somáticas y las células madre acumulan daño en el ADN, así como diversos cambios en la cromatina y la expresión génica debido a la exposición a distintos tipos de estrés. Esto da lugar a la acumulación de células senescentes en el tejido que, a través del SASP, dan lugar a una inflamación crónica que favorece el desarrollo tumoral (Fane & Weeraratna, 2020; Finkel

et al., 2007; Muñoz-Espín & Serrano, 2014). Las células tumorales pre-malignas que se desarrollan en esta situación presentan una rápida proliferación, lo que favorece el aumento del daño y aumenta la acumulación de células senescentes. Cuando estas células que acumulan daño adquieren mutaciones que suprimen las vías de entrada en senescencia, como *Trp53* o *Cdkn2a*, se desencadena la progresión hacia un tumor maligno (Finkel et al., 2007). Además, los estadios iniciales del desarrollo tumoral pueden desembocar en una enfermedad metastásica agresiva debido a la vascularización, a los cambios en la estructura tisular y el microambiente tumoral promovidos por los factores secretados por las células senescentes acumuladas en los organismos envejecidos (Fane & Weeraratna, 2020).

En el contexto del cáncer de mama, se ha demostrado que las células epiteliales envejecidas muestran modificaciones epigenéticas y transcripcionales que se relacionan con cambios metabólicos, un contexto pro-inflamatorio y la expresión de genes asociados con el desarrollo tumoral (Angarola et al., 2024). Además, en el tejido mamario las células estromales envejecidas reducen la expresión de genes ligados con la identidad de fibroblastos, aumentando la expresión de genes relacionados con fibroblastos asociados al cáncer y marcadores de senescencia. Estos cambios, sumados a diversas alteraciones en las poblaciones celulares del sistema inmunitario, propician el desarrollo del cáncer de mama en organismos envejecidos (Angarola et al., 2024; Jiang et al., 2022).

Una de las principales causas de la relación entre el cáncer y el envejecimiento es la disminución progresiva de la respuesta inmunológica innata y adaptativa (inmunosenescencia) (Z. Liu et al., 2023; Mittelbrunn & Kroemer, 2021). Una de las características más importantes de la inmunosenescencia es la involución tímica, lo que reduce el número y variedad de células T. También se da la disfunción mitocondrial, alteraciones genéticas y epigenéticas, y la pérdida de proteostasis en linfocitos T con el envejecimiento (Z. Liu et al., 2023; Mittelbrunn & Kroemer, 2021). Además, con el aumento de la edad se observa una reducción en el receptor de células T, un desequilibrio en la proporción de células T *naïve* y de memoria, la acumulación de células T senescentes y la pérdida de plasticidad efectora, lo que compromete la capacidad del sistema inmunológico para responder eficazmente a nuevos antígenos (Lian et al., 2020; Mittelbrunn & Kroemer, 2021). En organismos envejecidos también aumenta la proporción de macrófagos de tipo M2 en diversos tejidos, lo que favorece la inmunosupresión y el proceso de angiogénesis y metástasis (Angarola et al., 2024; Jiang et al., 2022; Z. Liu et al., 2023). En conjunto, estas alteraciones en el sistema inmunitario reducen la eficacia de la vigilancia inmunológica y la eliminación de células malignas, lo que explica la mayor predisposición al desarrollo tumoral durante el envejecimiento.

El proceso de envejecimiento no solo favorece la formación natural de tumores, sino también una mayor eficiencia en la implantación tumoral en modelos de *xenograft*. Distintos estudios en modelos de ratón han demostrado que la progresión tumoral en animales envejecidos es más eficiente que en jóvenes, y que se ve favorecida por la acumulación de células senescentes en los distintos tejidos (D. Liu & Hornsby, 2007; Reed et al., 2007). Por otro lado, las condiciones inflamatorias de los tejidos envejecidos pueden favorecer la agresividad del tumor, aumentando la movilidad de las células tumorales e incrementando la mortalidad (Lan et al., 2021). No obstante, ciertos tipos de células tumorales, como es el caso de algunas líneas de melanoma, presentan un mejor desarrollo en organismos jóvenes, lo que demuestra que el efecto del envejecimiento sobre la implantación tumoral es dependiente del tipo celular (Reed et al., 2007).

1.3.3 Conexión entre la reprogramación y la progresión tumoral

Los procesos de pérdida de identidad somática y el aumento en la plasticidad celular típico de la reprogramación, además de tener un potencial rejuvenecedor suponen un riesgo de tumorigénesis (Ohnishi et al., 2014). La reprogramación celular comparte mecanismos moleculares con la transformación oncogénica (Puisieux et al., 2018; Suvà et al., 2013). Diversos estudios han identificado características transcriptómicas comunes entre el proceso de reprogramación mediada por OSKM y la transformación celular mediada por K-Ras (Chondronasiou, Martínez De Villarreal, et al., 2022), así como patrones epigenéticos similares en ambos procesos (Huyghe et al., 2022, 2024). La reprogramación y la transformación presentan en común una característica intrínseca, la remodelación epigenética, que actúa como eje central en la reconfiguración de la identidad celular y la adquisición de nuevas propiedades fenotípicas. Ambos procesos también tienen en común un aumento en la capacidad proliferativa, además de cambios metabólicos similares (Semi et al., 2013).

Asimismo, se ha demostrado que el proceso de reprogramación celular también está relacionado con el inicio, desarrollo y recurrencia del cáncer, pudiendo promover la formación de células madre cancerígenas (Ohnishi et al., 2014; Xiong et al., 2019). Esto se debe a que, dada la plasticidad de los intermediarios celulares generados durante el proceso de reprogramación, estas células pueden derivar en fenotipos no deseados, y también a que las células somáticas adquieren un paisaje epigenético inestable e híbrido. Una vez superado el punto de no retorno, límite después del que no es posible recuperar el estado original, las células adoptan una trayectoria de reprogramación o una trayectoria tumoral (**Figura 9**) (Huyghe et al., 2024).

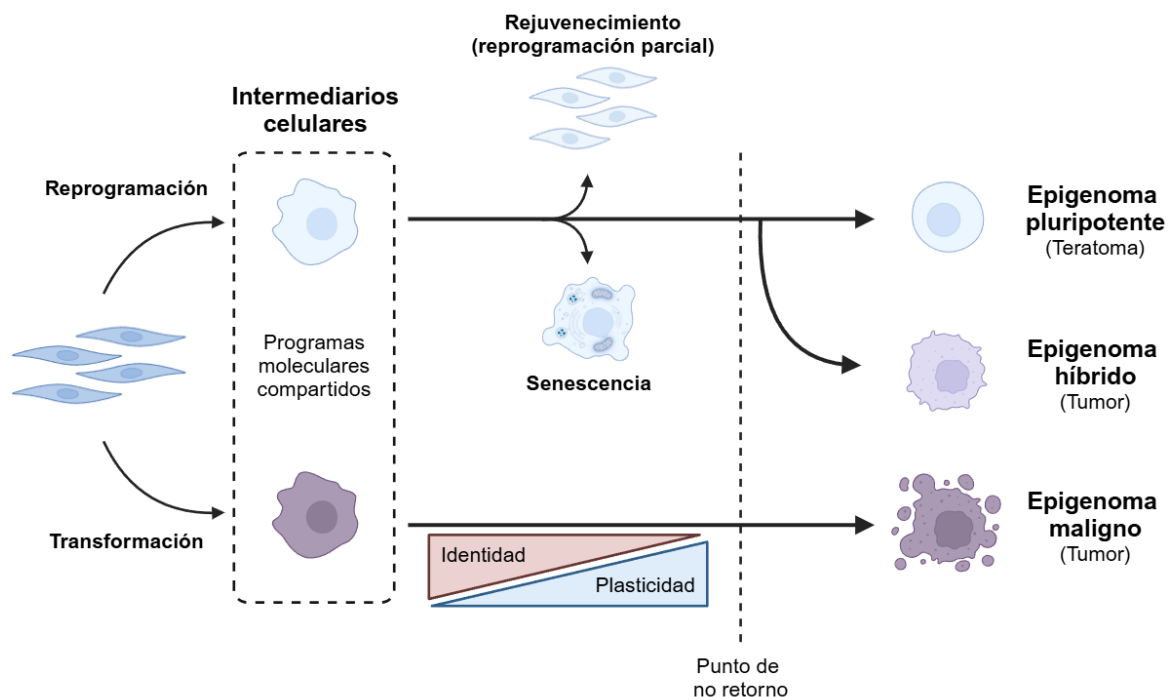


Figura 9. La reprogramación puede dar lugar al rejuvenecimiento y a desarrollo tumoral. Los procesos de reprogramación y transformación presentan características comunes, cambios epigenéticos, aumento en la plasticidad celular y la pérdida de identidad celular (Huyghe et al., 2024; Semi et al., 2013). Una vez superado el punto de no retorno, las células reprogramadas y transformadas presentan un paisaje epigenético remodelado que definirá el destino celular. Figura adaptada de Huyghe et al., 2024, con el permiso de Elsevier. Generada con *Biorender*.

La ambigüedad en el destino de la reprogramación celular también se debe a que los factores OSKM son capaces de unirse a múltiples sitios de la cromatina, lo que puede desembocar en una expresión génica aberrante (Huyghe et al., 2024). Además, los factores de reprogramación individualmente se han asociado con distintos tipos de cáncer. Por ejemplo, *Oct4* desempeña un papel importante en el potencial maligno de las células tumorales, y puede detectarse en diferentes tipos de tumores, como carcinomas embrionarios, tumores de células germinales testiculares y gliomas (Clemente-Periván et al., 2020); *Sox2* facilita la diferenciación neuroendocrina en el adenocarcinoma de próstata para adquirir resistencia a las terapias antihormonales (Kwon et al., 2021); *Klf4* promueve el cambio de identidad celular en la iniciación del cáncer de páncreas (Wei et al., 2016); *c-Myc* se encuentra alterado en una amplia variedad de tipos tumorales, ya que regula el metabolismo celular, el ciclo celular y la síntesis de proteínas, promoviendo tanto la pluripotencia como la proliferación tumoral (H. Chen et al., 2018; Semi et al., 2013).

Sin embargo, a pesar de ciertas similitudes entre el proceso de reprogramación y transformación celular, el programa epigenético activado durante la formación de iPSC es distinto del que se activa durante la tumorigénesis. Debido a ello, el estado transformado establece una importante barrera para la reprogramación celular (Ferreirós et al., 2019). Si bien es cierto que hay unos pocos casos reportados donde se lleva a cabo el proceso de reprogramación en células tumorales (J. Kim, 2020), estos suelen requerir modificaciones particulares para salvar la restricción impuesta por el proceso de transformación. Esto indica que las características génicas de las células tumorales, al ser distintas de las de iPSC, suponen una barrera que dificulta la reconfiguración epigenética necesaria para la activación completa de las redes de pluripotencia.

Por otra parte, recientemente se ha demostrado que la expresión de OSKM directamente en células transformadas promueve la expresión de p21, lo que limita su crecimiento a través de la inducción de apoptosis y senescencia. Esto se demostró con varios modelos *in vivo*, donde se vio cómo la expresión de OSKM restringe el crecimiento y reduce la carga tumoral (Pedrosa et al., 2024).

1.4 OBESIDAD

La obesidad es una patología compleja y multifactorial con una alta prevalencia en la población mundial, con más de mil millones de afectados (González-Muniesa et al., 2017). Se caracteriza por una acumulación excesiva de tejido adiposo y se asocia a múltiples comorbilidades, lo que compromete gravemente la salud de las personas. Esta enfermedad no tiene exclusivamente su origen en un desequilibrio entre la ingesta y el gasto calórico, sino que está definida por componentes genéticos, epigenéticos, metabólicos, ambientales y endocrinos (Lin & Li, 2021).

1.4.1 Bases ambientales, genéticas y epigenéticas de la obesidad

El componente ambiental es uno de los más importantes en el desarrollo de la obesidad. El tipo y cantidad de comida ingerida, en comparación con el gasto calórico del individuo, determinan el balance calórico. Cuando este balance es positivo de manera prolongada, conduce a la sobreproducción y acumulación de tejido adiposo blanco (González-Muniesa et al., 2017). Una dieta elevada en grasa y azúcar, sumada a una baja actividad física favorece al desarrollo de distintas anomalías metabólicas, como la obesidad (Nicolaidis, 2019; Saklayen, 2018).

A su vez, se ha demostrado que distintos contaminantes ambientales actúan como inductores de la obesidad. Por ejemplo, el consumo de tabaco durante el embarazo duplica el riesgo de padecer obesidad durante la infancia (Nicolaidis, 2008). Asimismo, distintos compuestos químicos pueden actuar como disruptores endocrinos, siendo capaces de interferir en el metabolismo (Nicolaidis, 2019). También existen evidencias sobre cómo la desnutrición durante la gestación puede desembocar en una mayor propensión al desarrollo de la obesidad en la descendencia, entre otros problemas (Kopelman, 2000).

La obesidad también tiene un componente genético muy importante. Esta patología puede tener una base monogénica, que puede ser sindrómica o no sindrómica. La obesidad monogénica sindrómica está asociada a otras muchas características, como problemas en el desarrollo cognitivo, características dismórficas y anormalidades en distintos órganos (Kaur et al., 2017). Estas características se ubican en el marco de síndromes bien definidos, como por ejemplo el síndrome de Prader-Willi, el síndrome de Bardet-Biedl o el síndrome de X frágil (Rohde et al., 2019). La obesidad monogénica no sindrómica se da por mutaciones de genes específicos que regulan la homeostasis energética a través del eje leptina-melanocortina. Se han descrito distintas mutaciones de genes individuales que participan en esta ruta, como *LEP*, *LEPR*, *POMC*, *MC4R* o *PCSK1*, que pueden derivar en un fenotipo obeso severo (Choquet & Meyre, 2011). Por otra parte, la obesidad también puede tener una base poligénica, donde la interacción de múltiples loci pueden propiciar el desarrollo de esta patología (Rohde et al., 2019).

A su vez, se ha descrito que la obesidad también tiene un componente epigenético, lo que incluye la metilación del ADN, modificación de histonas y ARN no codificante, que alteran la expresión génica sin modificar la secuencia de ADN. Estas modificaciones epigenéticas son sensibles a factores externos (como fármacos o la actividad física) y a factores internos (como cambios hormonales o genéticos). Además, este tipo de modificaciones son reversibles, específicas de tejido y se pueden transmitir a generaciones posteriores (González-Muniesa et al., 2017). Ya se han identificado un gran número de loci, cuya metilación se relaciona con el desarrollo de obesidad (Wahl et al., 2017). Por ejemplo, en el tejido adiposo se ha descrito cómo la metilación de genes como *FTO*, *HIF3A*, *IRS1* o *KCNQ1* favorecen el desarrollo de esta patología (Ling & Rönn, 2019). Cabe destacar que diversos cambios epigenéticos relacionados con la obesidad han sido relacionados con la disfunción inmunitaria, enfermedades inflamatorias y patologías neurodegenerativas (Hata et al., 2023).

1.4.2 Obesidad como patología metabólica

La obesidad se relaciona con distintas alteraciones en el metabolismo, que pueden desembocar en el síndrome metabólico. Este consiste en un conjunto de afecciones que aumentan el riesgo de enfermedades cardíacas, accidentes cerebrovasculares y diabetes tipo 2 (Saklayen, 2018). Una de las alteraciones que se dan durante la obesidad es la disfunción mitocondrial, que juega un papel clave en el deterioro del metabolismo energético celular, el aumento del estrés oxidativo y favorece la inflamación (De Mello et al., 2018; Xia et al., 2024). A su vez, la acumulación de tejido adiposo blanco visceral se ha relacionado con un aumento en la producción de citoquinas (adipoquinas) proinflamatorias, lo que contribuye a un estado de inflamación crónica en el tejido adiposo. Esto incrementa el riesgo cardiovascular, la resistencia a la insulina, la dislipidemia y la hipertensión (Després & Lemieux, 2006; González-Muniesa et al., 2017; Saltiel & Olefsky, 2017). El fenotipo proinflamatorio persistente durante la obesidad puede afectar a distintos órganos, como el hígado, el páncreas, el músculo o el cerebro (Saltiel & Olefsky, 2017).

Además de la acumulación de tejido adiposo y su fenotipo proinflamatorio, la obesidad se ha relacionado con una hiperactividad del sistema nervioso simpático (SNS), encargado de mantener el equilibrio energético. Esta hiperactividad del SNS puede agravar las distintas afecciones que componen el síndrome metabólico (Tentolouris et al., 2006). Asimismo, se ha demostrado que la obesidad puede alterar el metabolismo del hierro, pudiendo dar lugar a la anemia ferropénica (González-Domínguez et al., 2020).

Por otra parte, el tejido adiposo marrón (*Brown Adipose Tissue*, BAT) es un tipo de tejido graso cuya función principal es la termogénesis independiente de temblor, mediado por la proteína mitocondrial UCP1. En organismos obesos la actividad del BAT se ve reducida, lo que disminuye la temperatura corporal y afecta negativamente al metabolismo de la glucosa. Esto puede favorecer la acumulación lipídica, agravando así el síndrome metabólico (R. Singh et al., 2021; Vijgen et al., 2011).

1.4.3 Relación de la obesidad con el envejecimiento y otras patologías

La obesidad y el envejecimiento comparten características fisiológicas y patológicas. Se ha descrito que ambos procesos están íntimamente relacionados (**Figura 10**), potenciándose mutuamente. La reducción de la tasa metabólica y el sedentarismo asociado al proceso natural de envejecimiento favorecen el desequilibrio calórico, propiciando la acumulación del tejido adiposo. Asimismo, la pérdida de la masa muscular (sarcopenia) que tiene lugar durante el envejecimiento favorece el desarrollo de la obesidad (Colleluori & Villareal, 2021; Mirzai et al., 2024). Por otra parte, la obesidad puede potenciar el proceso de envejecimiento epigenético, al comprometer la integridad genómica, la función mitocondrial, favoreciendo la inflamación sistémica e incluso promoviendo el acortamiento telomérico (Ahima, 2009; Salvestrini et al., 2019; Tam et al., 2020).

La obesidad favorece y agrava diversas patologías relacionadas con el envejecimiento, como por ejemplo la osteoartritis (Bliddal et al., 2014). Por otro lado el ambiente proinflamatorio propio de los tejidos envejecidos puede a su vez empeorar las comorbilidades asociadas a la obesidad (Salvestrini et al., 2019; Santos & Sinha, 2021; Tam et al., 2020). Además, ambas condiciones están relacionadas con una inflamación crónica de grado bajo, lo que favorece la aparición de distintas alteraciones metabólicas. La obesidad también tiene en común con el envejecimiento la acumulación de células senescentes, además de un componente genético y epigenético muy importante, afectando a la integridad del ADN y promoviendo cambios en su patrón de metilación, lo que contribuye a su vez al proceso de envejecimiento (Ahima, 2009; Tam et al., 2020).

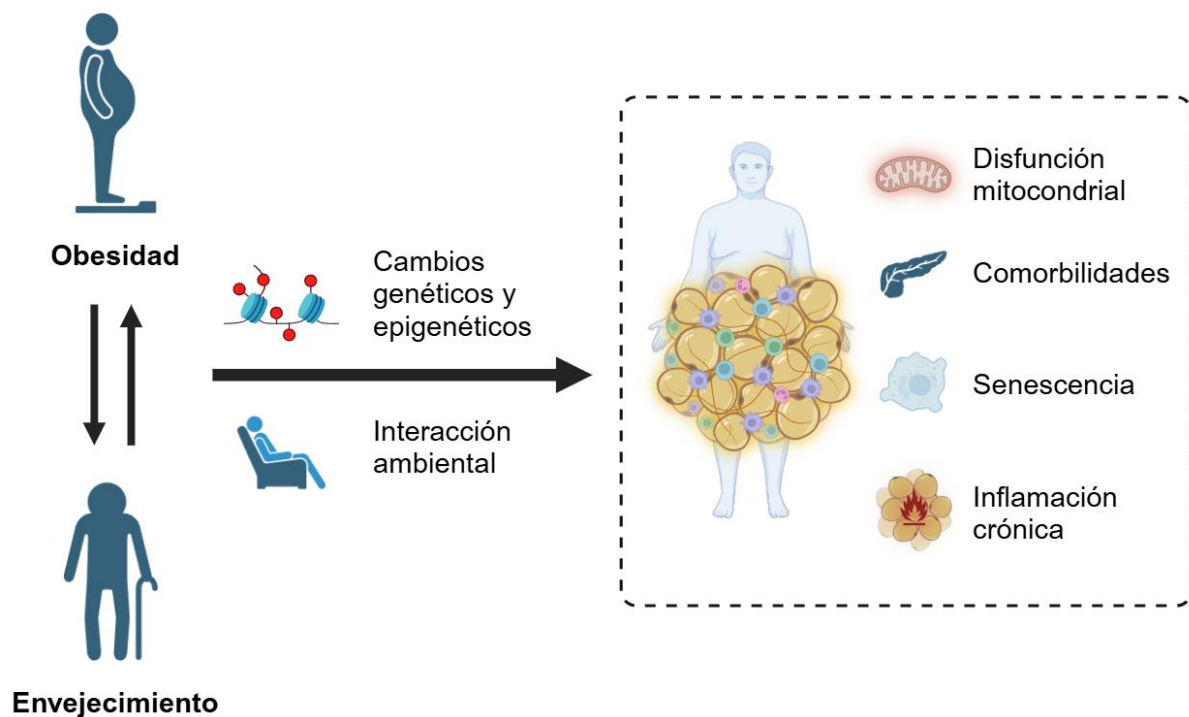


Figura 10. Relación entre la obesidad y el envejecimiento. Ambos procesos están relacionados, compartiendo características comunes como la disfunción mitocondrial, distintas comorbilidades, la acumulación de células senescentes y un proceso de inflamación crónica. Figura generada con *Biorender*.

Por otra parte, además de la diabetes tipo 2, enfermedades cardíacas y accidentes cerebrovasculares, la obesidad también se relaciona con una amplia variedad de patologías que afectan a distintos sistemas del organismo. Entre ellas, se ha identificado una asociación con múltiples tipos de cáncer, incluyendo el de mama, colon, endometrio, riñón y páncreas (Pati et al., 2023). Asimismo, la acumulación excesiva de grasa en el hígado promueve la esteatosis hepática no alcohólica, que puede evolucionar hacia fibrosis, cirrosis e incluso derivar en un tumor hepático (Y. He et al., 2023).

1.4.4 Conexión entre la reprogramación y la obesidad

Como ya se ha descrito, la obesidad tiene una importante base epigenética. Los cambios epigenéticos persistentes durante el desarrollo de la obesidad pueden conducir a una memoria epigenética “obesogénica”, dando lugar a alteraciones en la función y el metabolismo de los adipocitos, lo que favorece la recuperación acelerada del tejido adiposo tras una pérdida de peso (Hinte et al., 2024).

Dada la importancia del epigenoma en el contexto de la obesidad, y ya que las modificaciones epigenéticas son reversibles, la alteración de las marcas epigenéticas relacionadas con la obesidad se presentan como una oportunidad terapéutica para tratar esta patología (Z. Cheng et al., 2018). De hecho, ya se han probado distintas clases de fármacos epigenéticos, como inhibidores de HDAC y p300, activadores de SIRT1 y moléculas anti-miARN, demostrando un potencial terapéutico importante sobre la obesidad y las comorbilidades asociadas a esta patología, como la diabetes tipo 2 (Zatterale et al., 2022).

La reprogramación parcial mediada por OSKM también supone la eliminación de distintas marcas epigenéticas que, en organismos envejecidos, permite la recuperación de un fenotipo más joven (Ocampo et al., 2016). Por ello, dado que la remodelación epigenética de animales obesos ha resultado en la mejoría de comorbilidades asociadas a este proceso patológico, la reprogramación parcial representa una estrategia prometedora para mejorar la salud de animales obesos.

En resumen, la reprogramación es un proceso biológico que induce la pérdida de identidad celular y, al mismo tiempo, revierte la edad epigenética. La reprogramación parcial ha surgido como una estrategia terapéutica prometedora, ya que es capaz de promover el rejuvenecimiento celular sin inducir la pérdida de identidad, alargando la esperanza de vida y abordando diversos procesos patológicos asociados al envejecimiento en modelos de ratón (Paine et al., 2024). Considerando que el envejecimiento se acompaña de la acumulación de células senescentes, y que es posible revertir la edad biológica de los tejidos, este mismo proceso podría modular el fenotipo senescente. De igual forma, dado que los tejidos envejecidos tienen una mayor predisposición al desarrollo tumoral (López-Otín et al., 2023) y a la obesidad (Pérez et al., 2016; Trim et al., 2018), existe la posibilidad de que la reprogramación parcial contribuya a reducir la incidencia de estos procesos malignos y alteraciones metabólicas asociadas al envejecimiento.

2 HIPÓTESIS

El envejecimiento es un proceso natural que se caracteriza por la acumulación de células senescentes y que está relacionado con la pérdida gradual de funcionalidad de los tejidos y órganos, lo que deriva en la aparición de numerosas patologías relacionadas con la edad, entre las que se incluyen el cáncer y la obesidad. La posibilidad de que el envejecimiento sea un proceso plástico, plantea la hipótesis de que podamos intervenir retrasando e incluso revertiendo algunos aspectos patológicos de este proceso (Mahmoudi & Brunet, 2012).

Por otra parte, la reprogramación parcial mediada por OSKM, se ha definido como un factor rejuvenecedor genético, epigenético y metabólico (Chondronasiou, Gill, et al., 2022; Mitchell et al., 2024). Sin embargo, no se ha estudiado en profundidad cómo la reprogramación parcial afecta al fenotipo senescente, a la progresión tumoral o a la obesidad. Para responder a estas cuestiones, hemos partido de las siguientes hipótesis:

- i. La reprogramación parcial, dado que mejora distintos parámetros de las células envejecidas, podría afectar al fenotipo senescente. El fenotipo secretor de las células senescentes es clave en la actividad patogénica de la senescencia y por ello sería importante determinar el efecto de la reprogramación parcial sobre el SASP.
- ii. Los tejidos envejecidos favorecen el desarrollo tumoral. Dado que la reprogramación parcial mediada por OSKM rejuvenece los tejidos, los animales que hayan sido parcialmente reprogramados podrían presentar una menor predisposición a la progresión tumoral.
- iii. Dada la contribución que la epigenética tiene en la obesidad, la reprogramación parcial podría afectar a esta patología, mejorando distintos parámetros metabólicos y la composición corporal de animales obesos.

3 OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis fue evaluar el impacto de la reprogramación parcial mediada por OSKM en la senescencia celular, la progresión tumoral y la obesidad. Específicamente, se plantearon los siguientes objetivos:

- i. Analizar el efecto de la reprogramación parcial en células senescentes.
 - a. Estudiar cómo la reprogramación parcial modula el fenotipo senescente, enfocándose particularmente en el SASP.
 - b. Evaluar la capacidad de la reprogramación parcial para recuperar la función mitocondrial.
 - c. Estudiar alternativas químicas a OSKM modulando el fenotipo senescente.
- ii. Analizar la progresión tumoral en organismos envejecidos parcialmente reprogramados.
 - a. Estudiar la progresión tumoral en pulmón.
 - b. Estudiar la progresión tumoral en mama.
- iii. Analizar el efecto de la reprogramación parcial sobre la obesidad.
 - a. Evaluar las alteraciones fenotípicas.
 - b. Analizar los cambios bioquímicos y metabólicos.

4 METODOLOGÍA

4.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los procedimientos experimentales llevados a cabo en esta tesis con modelos animales, concretamente con ratones, cuentan con la aprobación previa del Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela (USC) y respetan las leyes de protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos que se establecen en el Real Decreto 53/2013 y la Directiva 2010/63/UE. Los experimentos se realizaron bajo la autorización 15010/2022/020 y fueron supervisados por Manuel Collado Rodríguez, capacitado para las funciones B, C y D. Los procedimientos experimentales fueron realizados por mí, capacitado para las funciones B y C.

4.1.1 Condiciones de estabulación

Los animales con los que se realizaron los experimentos se encontraban estabulados en salas específicamente libres de patógenos (SPF) en el CEBEGA (Centro de Biomedicina Experimental de la USC), con número de registro REGA ES150780292901. En estas instalaciones se aseguraban unas condiciones controladas de fotoperiodo (12 horas luz / 12 horas oscuridad) y temperatura (20-24 °C).

4.1.2 Ratón i4F

El modelo de ratón transgénico reprogramable i4F-A (Abad et al., 2013), con fondo genético C57BL/6J, presenta un casete policistrónico en el locus *Neto2* que codifica para los 4 factores OSKM, bajo el control de un promotor inducible TetO (TetO-Pou5f1-Sox2-Klf4-Myc). Este modelo presenta otra modificación en el locus *Rosa26*, donde se ha insertado el transactivador reverso dependiente de tetraciclinas (*reverse tetracycline-controlled transactivator*, rtTA). En presencia de una tetraciclina, como la doxiciclina, rtTA puede unirse a TetO, promoviendo así la expresión de OSKM en los distintos tejidos y órganos del ratón (**Figura 2**). Entre *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc* se encuentran los péptidos de autoescisión P2A, T2A y E2A respectivamente, que inducen un salto del ribosoma durante la traducción de las 4 proteínas. La colonia de animales i4F-A se mantuvo en homocigosis.

4.1.3 Ratón OSKM-only

El modelo de ratón de OSKM-only se generó cruzando ratones i4F-A (rtTA/OSKM, en homocigosis) con un ratón que portaba únicamente OSKM (en homocigosis). Estos ratones fueron cedidos por el grupo de Daniel del Toro, de la Universidad de Barcelona. La primera generación filial (homocigota para OSKM y heterocigota para rtTA) se cruzó con ratones C57BL/6J WT, dando lugar a hermanos de camada con dos genotipos distintos: heterocigotos para rtTA/OSKM o heterocigotos para OSKM (sin rtTA). De esta forma, en presencia de doxiciclina, solo uno de los dos grupos presentaría la expresión de OSKM.

4.1.4 Genotipado

El genotipado de los ratones se realizó a partir de un trozo de aproximadamente 1-2 mm de la punta de la cola (tejido no sobrante de identificación). De este fragmento de cola, se extrajo el ADN genómico utilizando 200 μ L de una preparación de Chelex-100 al 10% (Sigma-Aldrich) suplementada con 20 μ L de proteinasa K (Thermo Scientific). Se incubó con esta solución a 60 °C en agitación suave durante la noche (*overnight*, ON). Posteriormente, se inactivó la proteinasa K incubando las muestras a 95 °C durante 15 minutos y se centrifugaron las muestras a 8000 g durante 1 minuto, para poder descartar los restos de tejido no digeridos y el Chelex. Con el sobrenadante, donde se encuentra el ADN, se realizó una PCR para amplificar los alelos de interés: *wild type* (WT) y transgénico (Tg).

Para las PCR de genotipado se usó el kit *NZYTaq DNA polymerase* (NzyTech), dNTPs (Sigma-Aldrich) y los oligonucleótidos (*Integrated DNA Technologies, IDT*) que se detallan a continuación (**Tabla 1**):

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos usados en las PCR de genotipado.

Nombre	Secuencia 5' → 3'
<i>Neto2</i> común	GCG TCA GGC AAT TTA TAC TCT GG
<i>Neto2</i> WT	TTG GTG TTG GAA CAC AGT CC
<i>Neto2</i> Tg	GCA CCA TCC AAA GGT CAG TG
<i>Rosa26</i> común	AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT
<i>Rosa26</i> WT	GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC
<i>Rosa26</i> Tg	GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG

Las cantidades de los componentes fueron: *Taq Polymerase Buffer* 1X, 0,75 mM dNTPs, 2 mM $MgCl_2$, 2 U de *Taq Polymerase* y 0,2 μ M de cada oligonucleótido. Las PCR se realizaron en un termociclador *MultiGeneTM OptiMax* (Labnet), y los programas utilizados fueron los recogidos en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Descripción de los ciclos utilizados para las PCR de genotipado.

			x 30 ciclos				
<i>Neto2</i>	Temperatura	95 °C	95 °C	62 °C	72 °C	72 °C	4 °C
	Tiempo	2'	15''	15''	30''	5'	∞
<i>Rosa26</i>	Temperatura	95 °C	95 °C	59 °C	72 °C	72 °C	4 °C
	Tiempo	45''	45''	45''	1'	5'	∞

Para estudiar el peso molecular del ADN amplificado, el resultado de la PCR se verificó mediante electroforesis en gel de 1,5% agarosa *Low EEO* (Sigma-Aldrich), al que se le añadió 1x *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen), en TAE (40 mM Tris, 20 mM acetato y 1 mM EDTA). Dadas las diferencias de peso molecular de las bandas amplificadas, se podía determinar si los ratones eran homocigotos WT, homocigotos Tg o heterocigotos. El gel se reveló usando un *Chemidoc MP Imaging System* (Bio-Rad).

4.2 PROTOCOLOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

4.2.1 Administración de doxiciclina en agua de bebida

La administración sistémica *in vivo* de doxiciclina hiclato (Fagron Ibérica) se realizó diluyendo este compuesto directamente en el agua de bebida, suplementada con 7,5% de sacarosa (Sigma-Aldrich). Con los ratones i4F y OSKM-*only* se utilizaron dos pautas de tratamiento distintas de doxiciclina: 0,2 mg/mL durante 2,5 semanas para llevar a cabo un proceso completo de reprogramación, o 1 mg/mL en ciclos de 2 días de tratamiento acompañados de 5 días de descanso, para promover un proceso incompleto de reprogramación, o reprogramación parcial.

4.2.2 Inducción de obesidad

Para inducir la obesidad en ratones OSKM-*only* se utilizó una dieta muy alta en grasa (*very high fat diet*, vHFD) (Research Diets), con un contenido de un 60% de grasa y un valor energético de 5,21 kcal/g. Tras 3 meses con esta dieta *ad libitum*, los ratones presentaban obesidad.

4.2.3 Fotos térmicas

Para evaluar la termogénesis en los ratones, se tomaron fotografías con una cámara térmica (FLIR). Para ello, dado que la región de interés era el tejido adiposo marrón (*brown adipose tissue*, BAT) y se localiza en la región interescapular del ratón, se les rasuró el pelo de esta área 24 horas antes de realizar estas fotos. En el momento de la toma de las fotografías, se tuvo especial cuidado de no estresar al animal, realizando las fotos cuando el ratón estuviera estirado. Esta medición se realizó 1 vez por semana, en un ambiente aislado del ruido. Se sacaron 3 fotos por animal.

4.2.4 Evaluación de temperatura

Para evaluar la temperatura general de los animales, se tomó por vía rectal utilizando una sonda anal conectada a un termómetro digital (Physitemp). La sonda se introducía 2 cm en el recto del animal y se registraba el valor cuando alcanzaba una medida estable.

4.2.5 Resonancia electromagnética

Se utilizó la técnica de resonancia electromagnética para cuantificar la composición corporal de los ratones, con especial interés en el porcentaje de masa magra y el porcentaje de masa grasa de cada animal. Las mediciones se realizaron con un *Whole Body Composition Analyzer* (EchoMRI 500).

4.2.6 Recolección de sangre periférica

Para recolectar sangre periférica, se practicó una pequeña incisión en la punta de la cola de los ratones con unas tijeras. Se recolectaron 0,2 mL de sangre con un capilar, y se depositó en un tubo de recolección sanguínea con EDTA (Sarstedt), para la obtención de plasma.

4.2.6.1 Medición de glucosa en sangre periférica

Para medir la glucosa en sangre periférica, se puso a los animales en ayunas durante 8 horas. Se practicó de igual manera una pequeña incisión en la punta de la cola, lo que permitió

recolectar una pequeña gota de sangre. Esta se recogió directamente con una tira de medición de glucosa *Accu-check* (Roche) y se midió con un medidor de glucosa *Accu-check* (Roche).

4.2.6.2 Medición de colesterol en sangre periférica

Para la determinación cuantitativa de colesterol en sangre periférica, se utilizó la prueba enzimática de *Spinreact*. Este kit da lugar a una reacción colorimétrica directamente proporcional al contenido de colesterol en sangre. Las mediciones se realizaron por duplicado utilizando un espectrofotómetro de placas a una longitud de onda de 505 nm.

4.2.7 ITT y GTT

Se emplearon los test de tolerancia a la insulina (*insulin tolerance test*, ITT) y de tolerancia a la glucosa (*glucose tolerance test*, GTT), para evaluar la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de la glucosa. La ITT evalúa cómo responde el cuerpo a la insulina administrada, mientras que la GTT mide la capacidad de procesar una carga de glucosa. Para realizar la ITT, después de 8 horas en ayunas, se inyectaron 0,75 U/kg de insulina y se midieron los niveles de glucosa a los 15, 30 y 60 minutos. En el caso de la GTT, después de 8 horas en ayunas, se administraron 2 g/kg de D-glucosa, tras lo que se midieron los niveles de glucosa en sangre a los 15, 30, 60 y 120 minutos. En ambas pruebas se midió la glucosa en sangre previa a la inyección, para tomarlo como los niveles basales de referencia.

4.2.8 Preparación e inyección de medios condicionados

Para la preparación de medio condicionado (CM) para experimentos *in vivo* se utilizaron 5×10^5 células, incubándolas 24 horas en medio serodeprivado. Pasado este tiempo, el medio se filtró ($0,45 \mu\text{M}$) y se realizó el intercambio de soluciones utilizando el kit *PD MidiTrap™ G-10* (*GE Life Sciences*). Posteriormente, tras congelar las muestras durante 24 horas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, se liofilizaron ON con un liofilizador *LyoQuest 55* (Telstar). En el momento de la inyección, las muestras liofilizadas se resuspendieron en $100 \mu\text{L}$ de PBS y se inyectaron intraperitonealmente a los ratones usando una aguja de 25G. Se realizaron 3 pinchazos alternos de CM liofilizado: día 1, día 3 y día 5, sumando así una inoculación total de CM proveniente de $1,5 \times 10^6$ de células por ratón.

4.2.9 Inyección de células

4.2.9.1 L1475

La inyección de las células de cáncer de pulmón L1475 se realizó en vena lateral de la cola de machos i4F de 2 años. Para facilitar la canulación de la vena, se estimuló la vasodilatación con lámparas infrarrojas. A continuación, los ratones se colocaron en un *restrainer* y se inyectaron 2×10^5 células en un volumen de $100 \mu\text{L}$ de solución salina tamponada con fosfato (*Phosphate-buffered saline*, PBS) (Sigma-Aldrich), usando una aguja de 27 G.

4.2.9.2 B6BC-Luc

Las células de cáncer de mama B6BC-Luc se inyectaron subcutáneamente en la mama de ratonas i4F de 2 años. Para ello, las ratonas se anestesiaron con isofluorano (Esteve), se rasuró la zona abdominal baja, y se realizó una inyección subcutánea en la cuarta mama derecha, con una aguja de 27 G. Se inyectaron un total de 2×10^5 células por animal y se les hizo un seguimiento bisemanal del crecimiento tumoral usando el IVIS y un calibre digital (*Fine*

Science Tools, FST). Para determinar el volumen tumoral, se usó la fórmula $Volumen = (\pi / 6) \times largo \times ancho^2$.

4.2.10 Seguimiento de crecimiento tumoral por IVIS

El crecimiento tumoral de las B6BC-Luc se monitorizó utilizando el IVIS (*Spectrum In Vivo Imaging System*, PerkinElmer), realizando un seguimiento bisemanal de la bioluminiscencia tumoral. Para ello, se inyectaba intraperitonealmente en cada ratón una solución de D-Luciferina (PerkinElmer) en PBS, a razón de 0,15 g/kg (D-Luciferina por kg de ratón). El tiempo de exposición varió entre 5 segundos y 1 minuto, según la intensidad de la bioluminiscencia, para asegurar la exposición óptima. Las imágenes de bioluminiscencia se tomaron y cuantificaron posteriormente usando el software *Living Image Software V4.5.2* (PerkinElmer).

4.2.11 Curva de supervivencia

Se realizó un estudio de supervivencia en ratones i4F a los que se les habían inyectado CM liofilizados y tratados con doxiciclina en agua de bebida 0,2 mg/mL durante 2,5 semanas, para estudiar qué CM inducía en mayor medida el proceso de reprogramación. La reprogramación celular *in vivo* conlleva la formación de teratomas en distintos órganos y a la muerte del animal. Por tanto, los CM que favorezcan el proceso de reprogramación provocarán una muerte del animal más temprana. Los tejidos afectados por la formación de teratomas se recogieron y fotografiaron.

4.2.12 Eutanasia y recolección de tejidos

Los animales se sacrificaron utilizando una cámara de CO₂ y se usó la dislocación cervical como método de confirmación. La recolección de órganos se realizó *post mortem* y se conservaron en 10% formalina (Panreac AppliChem) cuando se destinaban para el análisis histológico, o se congelaron a -80 °C cuando los tejidos se destinaban para extracción de ARN o de proteína.

4.2.12.1 Extracción células de médula ósea

Para realizar la extracción de células de médula ósea, se extrajeron la tibia y el fémur de la pierna derecha de cada ratón. Se retiró todo el tejido muscular adherido a los huesos y se realizó un pequeño corte en la parte superior e inferior de cada hueso. Ambos huesos se colocaron en un tubo eppendorf de 0,5 mL con un pequeño agujero en el fondo junto con 200 µL de PBS 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich), dentro de otro tubo eppendorf de 1,5 mL. Se centrifugó a 8000 g durante 1 minuto a 4 °C, pasando así la médula ósea diluida en PBS-EDTA al eppendorf inferior. Esta mezcla se centrifugó a 300 g durante 5 minutos a 4 °C y se trató el *pellet* con 500 µL de una solución de lisis de eritrocitos (Invitrogen). Se incubó 3 minutos en hielo, se centrifugó a 300 g durante 5 minutos a 4 °C y se resuspendió el *pellet* en otros 900 µL de PBS-EDTA. Se centrifugó una última vez a 300 g durante 5 minutos a 4 °C y el *pellet* se congeló a -80 °C en medio de congelación.

4.3 CULTIVOS CELULARES

4.3.1 Condiciones de cultivos

Todos los cultivos celulares se manipularon en un ambiente estéril y, salvo que se indique lo contrario, se mantuvieron en un incubador (Thermo Scientific) a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂. Se comprobó de manera rutinaria por PCR que ninguno de los cultivos presentara infección por micoplasma. Los medios de cultivo utilizados variaron según la línea celular, tal y como se detalla a continuación:

- Medio de cultivo estándar: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) alto en glucosa (4500 mg/L) (Corning) suplementado con 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*, Corning), 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich) y 1% penicilina/estreptomicina (10,000 U de penicilina/10 mg de estreptomicina) (Sigma-Aldrich).
- Medio de reprogramación: DMEM alto en glucosa (4500 mg/L), suplementado con 15% KSR (*KnockOut Serum Replacement*, Gibco), 2 mM L-glutamina, 1% penicilina/estreptomicina, 1% aminoácidos no esenciales (Gibco), 0,2% 2-mercaptoetanol (Gibco) y 0,2% LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*, Gibco).
- Medio de B6BC: DMEM/F12 (Gibco), suplementado con 10% FBS, 1% penicilina/estreptomicina, 2 USP/mL heparina (Sigma-Aldrich), 10 µg/mL apo-transferrina (Sigma-Aldrich), 5 µg/mL insulina (Sigma-Aldrich), 5 ng/mL EGF (*Epidermal Growth Factor*, Sigma-Aldrich), 0,3 µM hidrocortisona (Sigma-Aldrich) y 5 nM β-estradiol (Sigma-Aldrich).
- Medio de cultivo de hepatocitos: DMEM/F12, 10% FBS, 1% penicilina/estreptomicina, 2 mM L-glutamina, 1% anfotericina B (Thermo Scientific), 1 µM dexametasona (Sigma-Aldrich) y 1 µM insulina.
- Medio de congelación: FBS suplementado con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich).

4.3.2 Cultivos primarios

4.3.2.1 MEFs WT y MEFs i4F

Los fibroblastos embrionarios de ratón (*Mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) se obtuvieron de ratonas C57BL/6 WT e i4F-A tras 13,5 días de gestación. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajo el útero de cada animal, donde se encontraban los embriones. Estos embriones fueron sacrificados por choque térmico y mantenidos en PBS 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) a 4 °C. Posteriormente, se separaron y descartaron la cabeza y la masa visceral. El resto del embrión, lavado en PBS, se disgregó con ayuda de bisturís y posteriormente se incubó a 37 °C con 1,5 mL de tripsina-EDTA (Sigma) durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se pipeteó el homogenizado con una micropipeta de 1 mL, favoreciendo así la disgregación, y se incubó otros 10 minutos en las mismas condiciones. Una vez finalizado este proceso, se resuspendieron en medio de cultivo estándar y se sembraron en placas de cultivo de 100 mm de diámetro (Corning). Se dejaron crecer hasta llegar al 100% de confluencia y se resembraron en placas de 150 mm. Una vez alcanzada de nuevo la confluencia, las células se congelaron en alícuotas de 4 x 10⁶ células en medio de congelación a -80 °C y pasadas 24 horas, se trasladaron al nitrógeno líquido.

4.3.2.2 Hepatocitos

Los hepatocitos de ratón se extrajeron del hígado de ratones OSKM-*only* de ambos genotipos a una edad aproximada de 3 meses. Los animales se sedaron con una combinación de 100 mg/kg ketamina (Laboratorio Richter Pharma) y 10 mg/kg xilacina (Laboratorios Karizoo) en suero fisiológico, administrada por vía intraperitoneal. Posteriormente, se realizó una incisión abdominal en la línea alba, exponiendo la cavidad abdominal sin dañar el hígado ni cortar ninguna vena. Cuidadosamente, se canuló la vena porta y se perfundió a 5 mL/minuto durante 2 minutos con una solución HANKS 1X (0,14 M NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄·7H₂O, 3 mM NaH₂PO₄·2H₂O y 0,4 mM KH₂PO₄ en H₂O) suplementada con 12 mM HEPES (Gibco), 0,6 mM EGTA (Sigma-Aldrich), 0,23% BSA y 1% heparina, a un pH 7,4. Esta solución fue gasificada previamente con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) durante 20 minutos. Luego, se suturó la vena inferior infrahepática y la vena cava superior (entre el diafragma y el corazón) y se perfundió durante 2 minutos a 2,5 mL/minuto con una solución HANKS 1X suplementada con 0,05% colagenasa IV (Gibco), previamente calentada a 37 °C para facilitar la digestión del hígado *in vivo*. Finalmente, se separó el hígado, se cortó la vesícula biliar y se disgregó el tejido con pinzas, tras lo que se realizó la digestión *in vitro* con solución HANKS 1X suplementada con 0,05% colagenasa IV y 2 mM CaCl₂·2H₂O (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos a 37 °C en agitación. Se filtraron las células a 70 μm para eliminar restos celulares y se lavaron 3 veces con PBS frío, centrifugando los hepatocitos a 100 g durante 5 minutos. Los hepatocitos se sembraron en placas previamente tratadas con 20 μg/cm² colágeno (Sigma-Aldrich).

4.3.3 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en esta tesis fueron:

- B6BC: línea celular de cáncer de mama, cedida por el Dr. Guido Kroemer. Estas células fueron derivadas de un ratón C57BL/6 J OlaHsd (ENVIGO) y expresan receptor de estrógenos (ER+) y receptor de progesterona (PR+). Tras inyectar 2 x10⁵ células por ratón, estas células generan tumores en la mama en menos de 5 días. Estas células se cultivaron siempre en medio de B6BC.
- L1475: línea celular de cáncer de pulmón, cedida por la Dr. Carla P. Martins (AstraZeneca, Cambridge, UK). Estas células fueron derivadas de un modelo de ratón que expresa Kras oncogénico y carece de p53 (Turrell et al., 2017). Estas células se cultivaron siempre en medio de cultivo estándar.
- HEK 293T (*Human Embryonic Kidney 293T*): línea celular derivadas de células humanas embrionarias de riñón (ATCC), modificadas para expresar el antígeno T del virus SV40, lo que aumenta la facilidad de transfección. Estas células se cultivaron siempre en medio de cultivo estándar.
- RAW 264.7: línea celular de macrófagos establecida a partir de un tumor en un ratón inducido con el virus de la leucemia murina de Abelson (ATCC). Estas células se cultivaron siempre en medio de cultivo estándar.
- C3H10T1/2: línea celular derivada de fibroblastos embrionarios de ratón. Es una línea mesenquimal multipotente utilizada por su fácil diferenciación hacia adipocitos. Estas células se cultivaron siempre en medio de cultivo estándar suplementado con 5 μg/mL insulina.

4.3.4 Estudio de proliferación celular

4.3.4.1 Crecimiento de la población celular

La proliferación celular se evaluó mediante el conteo del número de células sembradas en la placa, observando su aumento en distintos puntos temporales. Sabiendo este dato, y dada la fórmula $n = (\log X_f - \log X_i) / \log 2$, donde n es el número de duplicaciones de la población, X_f es el número celular final y X_i es el número celular inicial (Hayflick, 1973), podemos determinar el número de divisiones celulares. Para realizar el recuento de las células, estas se tripsinizaron durante 10 minutos a 37 °C, tras lo que se resuspendieron en medio de cultivo. La determinación de la concentración celular se realizó usando un contador automático de células LUNA-II (Logos Biosystems).

4.3.4.2 Marcadores de proliferación

Para estudiar la proliferación del ciclo celular se usó el kit Click-iT Plus EdU Alexa Fluor-647 (Invitrogen) en combinación con un marcaje inmunofluorescente contra Ki67, un marcador de división celular. Para ello, las células se sembraron subconfluentes en *chambers slides* (LabTek) 12 horas antes de empezar el protocolo. Pasado este tiempo, se trataron con 10 µM de EdU durante 4 horas, se fijaron con paraformaldehído (PFA) (*Electron Microscopy Sciences*, EMS) al 3,7% en PBS, se realizaron 3 lavados con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 (Sigma) al 0,5% en PBS. Después de otros 3 lavados con PBS, se procedió con la detección de EdU, usando las cantidades descritas por la casa comercial de cada uno de los componentes de este kit. Pasados 30 minutos a RT, se lavaron las células 3 veces con PBS y se procedió con la tinción de ácidos nucleicos y con el marcaje de Ki67 durante 1 hora a RT. Para ello, se usó 1 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen) y una dilución 1:250 en 3% BSA (*bovine serum albumin*) (Sigma-Aldrich) en PBS de un anticuerpo monoclonal contra Ki67 (SP6, Invitrogen), respectivamente. Por último, las muestras se incubaron con una solución 1:1000 de anticuerpo secundario de conejo Alexa-Fluor 488 (Thermo Fisher) en BSA 3% en PBS durante 45 minutos a RT. Pasado este tiempo, se montaron los cubreobjetos con medio de montaje *ProLong* (Invitrogen) y se conservaron a -20 °C. Posteriormente, se sacaron fotos en el microscopio confocal Leica sp8 y se cuantificaron con el *software* ImageJ.

4.3.5 Condicionado de medios

Para la recolección de medios condicionados (CM), las células de las condiciones de estudio (células productoras) se sembraron a la densidad deseada. Transcurridas 12 horas, se renovó el medio de cultivo (estándar) y se dejó condicionar durante 48 horas. Tras este tiempo, se recogieron los medios de cultivo y se centrifugaron en tubos Falcon (Fisherbrand) a 500 g durante 10 min, para eliminar los restos celulares y cuerpos apoptóticos en suspensión. Después, los CM se recogieron y se guardaron a 4 °C hasta el momento de su uso.

4.3.5.1 Análisis de factores secretados

Para evaluar los factores secretados en los medios condicionados, se utilizó un perfilador proteómico (*Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array*, R&D Systems) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Las membranas del kit se revelaron con el *Chemidoc MP Imaging System*. Posteriormente, los resultados fueron analizados midiendo la intensidad de los píxeles con una macro de ImageJ desarrollada por Gilles Carpentier para este fin (*Protein Array Analyzer*).

4.3.6 Tratamientos celulares

4.3.6.1 Medios condicionados

Los tratamientos con los distintos medios condicionados se hicieron en 2 ciclos de 3 días. 12 horas después de haber plaqueado las células que serían tratadas (células dianas) con los medios condicionados, se les cambió el medio de cultivo por el CM suplementado con FBS al 10%. Pasados 3 días, las células se tripsinizaron, se sembraron a la concentración deseada y se añadió nuevamente el CM suplementado con 10% FBS. 3 días después, el tratamiento con CM se daba por terminado y se procedía a hacer los análisis pertinentes con estas células.

4.3.6.2 Radiación X

Para inducir senescencia, se utilizó la radiación X, un estímulo físico capaz de dañar el ADN al inducir roturas de doble cadena. Para ello se utilizó un acelerador lineal CLINAC 2300 IX del Servicio de Radiología del Hospital Clínico de Santiago de Compostela (CHUS).

Las células se sembraron en placas de cultivo de 100 mm de diámetro (Corning) 12 horas antes de la irradiación, que se llevó a cabo en grupos de 4 placas (**Figura 11**). Se aplicó una dosis constante de 10 Gray (Gy) a una tasa de 5,2 Gy/min. El tratamiento se dividió en 2 campos: la mitad de la dosis se administró a 0° y la otra mitad a 180°, para asegurar una distribución homogénea de la radiación. Pasadas 2 horas tras la irradiación, se renovó el medio de cultivo de las células irradiadas.

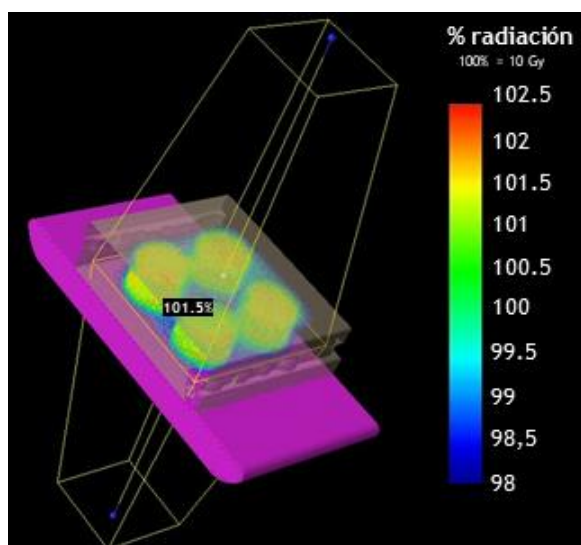


Figura 11. Distribución espacial de la dosis suministrada. Imagen generada por el planificador de dosimetría a partir de imágenes tomadas por tomografía axial computarizada (TAC) del Servicio de Radiología del CHUS.

4.3.6.3 Doxyciclina

El tratamiento con doxyciclina hiclato (Fagron Ibérica) usado en células fue de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, renovado cada 2 días. Este tratamiento se utiliza como activador del transactivador dependiente de tetraciclinas (rtTA), para activar la expresión de genes bajo un promotor TetO, como es el caso de los genes *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc* en los MEFs derivados del modelo de ratón transgénico i4F, o los MEFs WT que hayan sido transducidos con FUW-M2rtTA y TetO-FUW-OSKM.

4.3.6.4 2c

El tratamiento con 2c hace referencia al uso combinado de 2 compuestos: RepSox (MedChemExpress) y TCP (*trans-2-phenylcyclopropylamine hydrochloride*) (Acros Organics). Las células se trataron con ambos compuestos a 10 μ M durante 6 días, renovando el tratamiento cada 2 días.

4.3.6.5 Ácido oleico y BSA

Para evaluar la acumulación de ácidos grasos en varios tipos celulares se trataron con 1 mM de ácido oleico (Sigma-Aldrich) y 0,5 mM de BSA libre de ácidos grasos (Capricorn). Las células se incubaron con estos tratamientos durante 12 o 24 horas como máximo, dada la toxicidad del ácido oleico. Se usó siempre un control tratado únicamente con BSA libre de ácidos grasos, para poder evaluar la presencia de lípidos previa al tratamiento. A continuación, para evaluar la acumulación de triglicéridos, las células se fijaron con 10% formalina durante 30 minutos y se incubaron con *Oil Red O* (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos. Luego las células se tiñeron con hematoxilina (Panreac AppliChem) durante 1 minuto y se fotografiaron en campo claro con un microscopio óptico (Leica).

4.3.7 Cultivo en *transwell*

Para el ensayo de migración de macrófagos (RAW 264.7) se realizó un cultivo en una membrana porosa o *transwell* (Corning) de 8 μ m. Cada *transwell* se colocó en un pocillo de p24 (Corning), donde previamente se habían sembrado 5×10^4 células cuyo efecto sobre la migración de los macrófagos se deseaba evaluar. A continuación, se sembraron 2×10^4 células RAW 264.7 en el *transwell*, suspendidas en medio de cultivo con 0,05% FBS. Esto generaría un gradiente de FBS para estimular la migración de los macrófagos hacia la parte inferior del *transwell*, zona que estaba en contacto con el medio de cultivo estándar (10% FBS) de las células en estudio. Pasadas 48 horas, el experimento se daba por terminado. Entonces, los *transwell* se retiraron, se lavaron con PBS y se fijaron con PFA al 3,7% durante 2 min a RT. Tras lavar con PBS, los *transwell* se incubaron con metanol (Supelco) 100% durante 20 min a RT para permeabilizar las células. Posteriormente, se incubaron con cristal violeta (Sigma-Aldrich) al 0,05% en agua destilada durante 10 minutos a RT y se lavaron con PBS. Luego se limpió delicada pero rigurosamente la parte interior de cada *transwell*, ya que solo interesaban las células que habían migrado hacia la parte inferior del mismo. Tras dejar secar las membranas, se tomaron fotos de las células migradas con un microscopio óptico (Leica). Luego, el cristal violeta se eluyó con ácido acético (Sigma-Aldrich) al 33% durante 5 minutos en agitación a RT y se cuantificó midiendo la absorbancia a 570 nm usando un espectrofotómetro de placas *Epoch2* (BioTek).

4.3.8 Diferenciación de adipocitos

La línea C3H10T1/2 se diferenció a adipocitos añadiendo el cóctel de diferenciación al medio de cultivo estándar: 1 μ M dexametasona (Sigma-Aldrich), 0,5 mM isobutilmetilxantina (Sigma-Aldrich), 1 μ M rosiglitazona (Sigma-Aldrich) y 5 μ g/mL insulina (Actrapid). 48 horas después del inicio del tratamiento, se reemplazó el medio por medio de cultivo estándar suplementado con 5 μ g/mL insulina. Después de 4 días, se realizaron los tratamientos pertinentes a los adipocitos.

4.4 ANÁLISIS MITOCONDRIAL

4.4.1 Masa mitocondrial

Para el estudio de la masa mitocondrial las células se tiñeron con *MitoTracker* (M7514, Invitrogen) a 50 nM en HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) (Gibco) en condiciones de cultivo durante 30 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas con HBSS, se tripsinizaron, se centrifugaron a 1400 g durante 5 minutos y finalmente se resuspendieron en HBSS 0,01% BSA. Se incluyeron los controles pertinentes de cada tinción para poder corregir el fondo y la tinción inespecífica. Se analizaron 5×10^4 células de cada muestra con el equipo *CytoFLEX* (Beckman Coulter), midiendo la emisión de fluorescencia a 516 nm. Los resultados fueron procesados y analizados con el software FlowJo.

4.4.2 Potencial de membrana

Para el estudio del potencial de membrana mitocondrial, las células se trataron con TMRM (*Tetramethylrhodamine*) (I34361, Invitrogen) a 100 nM en HBSS (Gibco) en condiciones de cultivo durante 30 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas con HBSS, se tripsinizaron, se centrifugaron a 1400 g durante 5 minutos y se resuspendieron en HBSS 0,01% BSA. Se incluyeron los controles pertinentes de cada tinción para poder corregir el fondo y la tinción inespecífica. Se analizaron 5×10^4 células de cada muestra con el equipo *CytoFLEX* (Beckman Coulter), midiendo la emisión de fluorescencia a 574 nm. Los resultados fueron procesados y analizados con el software FlowJo.

4.4.3 Acumulación de ROS

Para el estudio de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) se utilizó el indicador de superóxido MitoSOX (M36007, Invitrogen), ya que la oxidación de este reactivo por superóxidos mitocondriales produce una fluorescencia roja. Las células se trataron con 5 μ M de MitoSOX en condiciones de cultivo durante 30 minutos, se lavaron con HBSS, se tripsinizaron, se centrifugaron a 1400 g durante 5 minutos y se resuspendieron en HBSS 0,01% BSA. Se incluyeron los controles pertinentes de cada tinción para poder corregir el fondo y la tinción inespecífica. Se analizaron 5×10^4 células de cada muestra con el equipo *CytoFLEX* (Beckman Coulter), midiendo la emisión de fluorescencia a 610 nm. Los resultados fueron procesados y analizados con el software FlowJo.

4.4.4 Consumo de oxígeno

Para los experimentos de consumo de oxígeno se utilizó medio *Seahorse* (M0268, Sigma), libre de bicarbonato. Este medio se ajustó a un pH 7,4 y se suplementó con 4,5 g/L glucosa (Sigma), 1 mM piruvato (Gibco) y 3,9 mM L-glutamina (Gibco). Se prepararon las soluciones de los fármacos necesarios para el ensayo: 1 μ M oligomicina (Sigma-Aldrich), 1,5 μ M FCCP (Sigma-Aldrich) y 1 μ M rotenona (Sigma-Aldrich) + 1 μ M antimicina A (Sigma-Aldrich), equilibrándolas en medio *Seahorse* durante 1 hora previa a su uso. Las células se acondicionaron al nuevo medio añadiendo medio *Seahorse* sobre el medio previo, que posteriormente se reemplazó totalmente por medio *Seahorse*. Las células se equilibraron durante una hora en un incubador sin CO₂. Posteriormente, se cargaron los fármacos y se procedió a realizar el ensayo de estrés mitocondrial en el *Seahorse XFe96* (Agilent). Finalmente, se extrajo la proteína de cada uno de los pocillos de la placa, para poder normalizar el consumo de oxígeno al contenido proteico. Los resultados se analizaron con el software *WAVE* (Agilent).

4.4.5 Acidificación extracelular

Durante la medición de consumo de oxígeno, el *Seahorse XFe96* también mide la tasa de acidificación extracelular (*Extracellular acidification rate*, ECAR). Esta tasa refleja principalmente la glucólisis, ya que a través de la producción de ácido láctico y la exportación de protones se acidifica el medio extracelular. Los resultados se analizaron con el *software WAVE* (Agilent).

4.4.6 Cuantificación de ATP mitocondrial

Los niveles de ATP mitocondrial se determinaron utilizando el método de luciferina/luciferasa (McKenzie et al., 2007), mediante el kit *CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay* (Promega). Para el ensayo se sembraron 5×10^4 células/pocillo en placas p96 (Corning) y se mantuvieron en condiciones de cultivo durante las 14 horas previas al ensayo. Pasado este tiempo, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 2 horas en una solución compuesta por 156 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 3 mM KCl (Sigma-Aldrich), 2 mM MgSO₄ (Sigma-Aldrich), 1,25 mM KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich), 2 mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich) y 20 mM HEPES (Gibco), en condiciones de cultivo. Para la cuantificación de ATP mitocondrial, se utilizaron 5mM 2-desoxi-D-glucosa (Sigma-Aldrich) y 1 mM piruvato. Posteriormente, la placa se dejó a temperatura ambiente 15 minutos, se retiraron 90 μ L de cada pocillo y se añadió 100 μ L del reactivo del kit. El contenido de cada pocillo se mezcló durante 2 minutos en un agitador orbital, para favorecer la lisis celular, y se dejó reposar durante 10 minutos para estabilizar la señal lumínica. Finalmente, el contenido de los pocillos se transfirió a una placa blanca (Thermo Scientific) y se midió la luminescencia con un luminómetro (Berthold Technologies).

4.4.7 Extracción de proteínas (post-*Seahorse*/ATP)

Una vez terminados los experimentos de consumo de oxígeno, acidificación extracelular y cuantificación de ATP, se procedió a realizar la extracción de las proteínas de las células para poder normalizar los resultados de los experimentos ya mencionados. Para ello, se retiró el medio de cultivo y se añadió una solución de lisado celular: 0,1% Triton X-100 (Thermo Scientific), 50 mM Tris-HCl pH 7,4 (Sigma-Aldrich), 150 mM NaCl y 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich). Las células se incubaron a 4 °C durante al menos 30 minutos tras lo que se conservaron a -20 °C hasta el momento de la cuantificación de la proteína. Dado que las células empleadas para medir el ATP mitocondrial ya se lisaron en el experimento, se sembró una placa adicional con las mismas condiciones experimentales, para poder medir la cantidad de proteína. Posteriormente, esto permitió normalizar los niveles de ATP al contenido proteico.

4.5 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BETA GALACTOSIDASA ASOCIADA A SENESCENCIA (SA-BETA-GAL)

4.5.1 Detección histoquímica de SA-beta-Gal

La detección histoquímica de la actividad de la enzima beta-galactosidasa asociada a senescencia (*Senescence-Associated-beta-Galactosidase*, SA- β -Gal) en células se realizó usando el sustrato cromogénico X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido). Para ello, las células sembradas el día anterior se lavaron con PBS, se fijaron con PFA 2% y glutaraldehído (Fisher) al 0,2% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 8 horas en oscuridad a 37 °C con la solución de tinción, compuesta por: 40 mM de tampón ácido cítrico (Sigma-Aldrich) / fosfato sódico (Sigma-Aldrich) pH 5,6, 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 5 mM K₃Fe[CN]₆ (Sigma-

Aldrich), 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ (Sigma-Aldrich), 2 mM $MgCl_2$ (Acros Organics) y 1 mg/mL X-Gal (Thermo Scientific). Tras la tinción se lavaron con PBS y se tomaron fotografías a 10X con un microscopio óptico (Leica). La cuantificación de las imágenes se realizó con el *software* ImageJ y se calculó el porcentaje de células positivas a partir de fotos representativas.

4.5.2 Detección por citometría de flujo de SA-beta-Gal

Para la detección de la actividad SA- β -Gal por citometría de flujo se utilizó el kit *CellEvent™ Senescence Green Flow Cytometry Assay Kit* (C10840, Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. En todas las tinciones se añadieron los controles pertinentes para poder corregir el fondo y la tinción inespecífica. Se analizaron 1×10^4 células de cada muestra, utilizando el equipo *CytoFLEX* (Beckman Coulter), midiendo la emisión de fluorescencia a 514 nm. Los resultados fueron procesados y analizados con el *software* FlowJo.

4.6 VECTORES PLASMÍDICOS

4.6.1 Cultivo bacteriano

Se usaron bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) de la cepa Stb13 para extraer y amplificar los vectores plasmídicos de interés. Las bacterias se crecieron sobre una placa de medio Luria-Bertani (LB) compuesto por triptona 1% (Becton Dickinson, BD), NaCl 0,5% y extracto de levadura 0,5% (BD), y suplementado con 1,5% agar (Sigma-Aldrich) y 100 μ g/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich). Dado que todos los plásmidos utilizados en esta tesis contenían un gen de resistencia a ampicilina, el uso de este antibiótico permitió seleccionar a aquellas bacterias que portasen el plásmido. Tras 24 horas, se seleccionó una unidad formadora de colonias, que se transfirió a un matraz de Erlenmeyer con medio LB líquido y se incubó a 37°C en agitación ON. Todo el cultivo bacteriano se realizó en un ambiente estéril.

4.6.2 Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados en esta tesis, todos de tercera generación, se recogen en la **Tabla 3**:

Tabla 3. Lista de plásmidos empleados.

Nombre	Descripción	Referencia
pLP1	Plásmido empaquetador lentiviral. Contiene proteínas estructurales y de replicación necesarias para producir un lentivirus.	ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen)
pLP2	Plásmido empaquetador lentiviral. Contiene proteínas estructurales y de replicación necesarias para producir un lentivirus.	ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen)
pLP/VSVG	Plásmido empaquetador lentiviral. Contiene proteínas estructurales y de replicación necesarias para producir un lentivirus.	ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen)
Tet-O-FUW-OSKM	Plásmido lentiviral para la expresión inducible de Oct4, Sox2, Klf4 y Myc (OSKM) de ratón.	Addgene #20321 (Carey et al., 2009)
FUW-M2rtTA	Plásmido lentiviral que expresa el transactivador dependiente de tetraciclina (rtTA).	Addgene #20342 (Hockemeyer et al., 2008)
FUGW	Plásmido lentiviral con que promueve la expresión de EGFP.	Addgene #14883 (Lois et al., 2002)
pLentipuro3/TO/V5-GW/EGFP-Firefly Luciferase	Plásmido lentiviral de tercera generación para la expresión de la proteína EGFP y la luciferasa de luciérnaga en células de mamíferos.	Addgene #119816 (Lorenzatti Hiles et al., 2019)

4.6.3 Extracción del ADN plasmídico

Para obtener los plásmidos de interés de las bacterias previamente seleccionadas y amplificadas, se utilizó el kit de extracción *NucleoBond Xtra Midi* (Macherey-Nagel), partiendo de 200 mL de suspensión bacteriana y siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN plasmídico, una vez extraído, se cuantificó usando el *Nanodrop One* (Thermo Scientific).

4.7 TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL

Para introducir y promover la expresión de los plásmidos ya descritos, se realizó una transducción lentiviral con cada uno de ellos junto con los plásmidos empaquetadores.

4.7.1 Transfección

La línea seleccionada para realizar la transfección y así generar partículas lentivirales con cada plásmido de interés fue la línea HEK 293T, dada su facilidad de transfección. Se preparó una solución con los 3 plásmidos empaquetadores (1,25 µg de cada uno) junto con el plásmido de interés (1,25 µg del plásmido), suplementada con 30 µg de polietilenimina (PEI) (Polysciences) en DMEM. Esta solución se mezcló con vortex, se incubó a RT durante 15 minutos y se añadió gota a gota sobre 5×10^6 células HEK 293T, sembradas el día anterior en placas p100 y mantenidas con medio de cultivo estándar. Pasadas 8 horas, las células se lavaron con PBS y se renovó el medio de cultivo.

4.7.2 Transducción

Pasadas 24 horas tras el lavado con PBS, se recogió el medio de cultivo de las HEK 293T transfectadas, que contenía las partículas lentivirales en suspensión. Este medio se filtró por 0,45 µm de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Jet Biofil), para eliminar restos celulares en suspensión, y se suplementó con 8 µg/mL de bromuro de hexadimetrina (Sigma-Aldrich). Las células diana se trataron durante 12 horas con la suspensión lentiviral. Este proceso se repitió 2 veces más, haciendo así un total de 3 rondas de infección. Terminadas las rondas, las células diana se lavaron con PBS y se renovó el medio de cultivo.

4.8 REPROGRAMACIÓN CELULAR

La reprogramación celular se llevó a cabo mediante la sobreexpresión de los factores de reprogramación *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *Myc* (OSKM). Para ello, se usaron MEFs del modelo de ratón i4F-A (MEFs i4F) sembrados 5×10^4 células por pocillo de placas de 6 pocillos (Corning), previamente tratadas con gelatina (Sigma-Aldrich) al 0,1% durante 20 minutos. Una vez adheridas las células, el medio de cultivos estándar se cambió por medio de reprogramación y se inició el tratamiento con doxiciclina hclato, renovando el tratamiento cada 2 días durante 14 días. Con la doxiciclina se consigue promover la expresión de OSKM, lo que induce la reprogramación de los MEFs y la formación de células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Estas iPSC crecen formando colonias redondeadas, con bordes refringentes bien definidos.

4.8.1 Reprogramación con medios condicionados

Para estudiar la capacidad de los medios condicionados de promover la reprogramación celular, se trataron MEFs i4F (células diana) con estos CM y se inició el proceso de reprogramación. A diferencia de otros ensayos de CM, la generación de CM se realizó con medio de reprogramación sobre las células productoras. Estos CM se suplementaron con 15% KSR y se

añadió doxiciclina a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se generó suficiente CM para tratar a las células diana durante 14 días, cambiando el medio cada 2 días.

4.8.2 Tinción fosfatasa alcalina

Para identificar la presencia de colonias de iPSC se realizó una tinción fosfatasa alcalina, dado que estas células, al igual que las células madre embrionarias, presentan unos niveles muy elevados de esta enzima. Para ello, se fijaron las células con PFA 3,7% en PBS durante 15 minutos y luego se tiñeron con el kit *Alkaline Phosphatase Blue Membrane Substrate Solution* (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos en oscuridad a RT. La tinción con este kit permite la identificación clara de las colonias de reprogramación al tñirlas de color violeta. Las placas se digitalizaron usando el escáner fotográfico *Epson Perfection V550 Photo* (Epson) y las cuantificaciones se realizaron con el *software* ImageJ.

4.9 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO

4.9.1 Extracción de ARNm

Para realizar un análisis transcriptómico, se estudió el ARN mensajero (ARNm). La metodología de extracción de ARNm dependió del tipo de muestra. Una vez extraído el ARNm, se cuantificó y verificó su calidad usando el *NanoDrop One* (Thermo Scientific).

4.9.1.1 Extracción de ARNm de células

En el caso de la extracción de ARNm a partir de células, se utilizó el kit *NucleoSpin RNA Plus* (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.9.1.2 Extracción de ARNm de tejidos

Para extraer el ARNm a partir de tejidos, estos se disgregaron usando una bola de acero inoxidable en tubo Eppendorf de 2 mL con fondo redondo, 500 μL de *TRIzol* (Invitrogen) y empleando un *TissueLyser II* (Qiagen), durante 4 minutos a 24 hercios (Hz). Tras incubación en hielo 5 minutos, el lisado se centrifugó durante 10 minutos a 16000g para eliminar restos celulares. Al sobrenadante se le añadieron 100 μL de cloroformo (Sigma-Aldrich), se mezclaron con vortex y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugaron 15 minutos a 16000 g y se recogió la fase acuosa (rosatransparente), donde se encontraba el ARNm. Se incubó con isopropanol (Sigma-Aldrich) en relación 1:1 durante 30 minutos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pasado este tiempo, se centrifugó 10 minutos a 16000 g, se decantó el sobrenadante y se añadieron 500 μL de etanol (Sigma-Aldrich) al 75%. Tras lavar el *pellet* con el etanol, se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente durante 20 minutos. Pasado este tiempo, el ARN se resuspendió en agua.

4.9.2 Transcripción inversa del ARN

Tras extraer el ARNm, se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc) empleando el kit de transcripción inversa de ADNc de gran capacidad (Applied Biosystems) y el termociclador *MultiGene™ OptiMax* (Labnet). Tanto la concentración de los reactivos como el programa de termociclador usado, fue el recomendado por el fabricante.

4.9.3 PCR cuantitativa

Para cuantificar la expresión relativa de distintos genes de interés se utilizó la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) en un termociclador *QuantStudio 3* (ThermoFisher). Se prepararon las muestras añadiendo en una placa de 96 pocillos para qPCR (Axygen) 33 ng de ADNc, una mezcla de los oligonucleótidos para el gen de interés de 0,25 μ M y 5 μ L *NZYSpeedy qPCR Green Master Mix ROX*. El programa que se usó para realizar la qPCR es el que se detalla en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Descripción de los ciclos utilizados para la PCR cuantitativa.

		Amplificación (40 ciclos)					
Temperatura	95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	95 °C	55 °C	95 °C
Tiempo	3'	30''	30''	1'	1'	30''	30''

Todos los oligonucleótidos (IDT) que se usaron en este trabajo se recogen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos usados en las PCR de genotipado.

Nombre	Secuencia 5' → 3'
<i>Wdr55</i>	Fw: GGG ACG TGG ACG GAG ATG TG Rv: GAG AAG ACA ACA GCC CGG CA
<i>Tg-Sox2/Klf4</i>	Fw: ACT GCC CCT GTC GCA CAT Rv: CAT GTC AGA CTC GCC AGG TG
<i>Cdkn1a</i>	Fw: GTG GGT CTG ACT CCA GCC C Rv: CCT TCT CGT GAG ACG CTT AC
<i>Cdkn2a</i>	Fw: CGT ACC CCG ATT CAG GTG AT Rv: ATT TAT TCA GTT CCC AGT CCA AGC
<i>Trp53</i>	Fw: TGA AAC GCC GAC CTA TCC TTA Rv: GGC ACA AAC ACG AAC CTC AAA
<i>Il6</i>	Fw: GCT ACC AAA CTG GAT ATA ATC AGG A Rv: CCA GGT AGC TAT GGT ACT CCA GAA
<i>Ccl2</i>	Fw: CAT CCA CGT GTT GGC TCA Rv: GAT CAT CTT GCT GGT GAA TGA GT
<i>Timp1</i>	Fw: CGG AAA TTT GCA CAT CAG TG Rv: GAC CTG ATC CGT CCA CAA AC
<i>Cxcl1</i>	Fw: CTG GGA TTC ACC TCA AGA ACA TC Rv: CAG GGT CAA GGC AAG CCT C
<i>Cxcl2</i>	Fw: CCA ACC ACC AGG CTA CAG G Rv: GCG TCA CAC TCA AGC TCT G
<i>Areg</i>	Fw: CAT CGG CAT CGT TAT CAC AG Rv: TGC ACA GTC CCA TTT TCT TG

Las reacciones de cada muestra y cada gen estudiado se realizaron por triplicado, analizando la expresión media de estos genes de manera relativa al gen de referencia *Wdr55*. El *software* de análisis utilizado fue el *Design and Analysis software 2.8 for QuantStudio*.

4.9.4 Secuenciación de ARN

Para realizar un estudio transcriptómico más completo se secuenció el ARNm, partiendo tanto de ARNm de células como de tejidos. En ambos casos, se comprobó la calidad del ARNm usando el kit *RNA screen tape assay* (Agilent) en el *TapeStation 4200* (Agilent). Las muestras con un $RIN \geq 8$ y $ratio\ 28S/18S \geq 1$ fueron consideradas aptas para la secuenciación.

4.9.4.1 Preparación de la biblioteca y secuenciación

Una vez pasada la prueba, las distintas muestras de ARNm se secuenciaron en la empresa BGI (*Beijing Genomics Institute*) mediante la plataforma de secuenciación DNBseq, generando lecturas de extremos emparejados de 100 pb.

4.9.4.2 Procesamiento de datos y control de calidad

Las lecturas de secuenciación sin procesar fueron evaluadas por el control de calidad de BGI utilizando *SOAPnuke* (Y. Chen et al., 2018), filtrando las lecturas con los siguientes parámetros: "-n 0.001 -l 20 -q 0.4 --adaMR 0.25 --polyX 50 --minReadLen 100". Las lecturas filtradas se alinearon contra el genoma de referencia GRCm39.111 *Mus musculus*, usando *STAR* (versión 2.5.2b) (Dobin et al., 2013). El archivo fasta y GTF de anotaciones se obtuvieron de la base de datos ENSEMBL.

4.9.4.3 Cuantificación y análisis de expresión diferencial

La expresión génica se cuantificó utilizando *featureCounts* (versión 2.0.1) (Liao et al., 2014). El análisis de expresión diferencial se realizó utilizando el paquete DESeq2 (versión 1.46.0) en R (versión 4.4.1) con la significancia estadística definida en p-valor ajustado $< 0,05$ y un log_2 (*fold-change*) > 1 .

4.9.4.4 Análisis enriquecimiento

Para identificar las vías biológicas significativamente alteradas entre las condiciones experimentales, se realizaron análisis de enriquecimiento. En estos análisis, todos los genes (recuentos transformados mediante VSD) se sometieron a GSEA (versión 4.3.2), utilizando 1000 permutaciones y múltiples conjuntos de genes de referencia de MSigDB, o mediante el paquete DEGREport (*degPatterns*).

4.10 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

4.10.1 Extracción de proteínas

4.10.1.1 Extracción de proteínas de extracto celular

Para la extracción de proteínas partiendo de extracto celular se utilizó la solución RIPA (radioinmunoprecipitación), compuesta por 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1% dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma-Aldrich), 1% Triton X-100, 5 mM EDTA pH 8,0, 1% desoxicolato de sodio. Esta solución se suplementaba antes de cada uso con los siguientes inhibidores: 1 mM ortovanadato sódico (Sigma-Aldrich), 1 mM fenilmetilsulfonilfluoruro

(Thermo Fisher Scientific), 1 mM ditioneitol (Sigma-Aldrich), 4 mM fluoruro de sodio (Sigma-Aldrich) y 1X del cóctel de inhibidores de proteasas (P83340, Sigma-Aldrich). El extracto celular, resuspendido en esta solución, se incubó durante 20 minutos en hielo. Pasado este tiempo, se resuspendió con una micropipeta y se centrifugó a 16000 g durante 15 minutos a 4°C. Luego se recogió el sobrenadante y se procedió con la cuantificación de proteínas.

4.10.1.2 Extracción de proteínas de tejidos

Para extraer la proteína de los diversos tejidos se utilizó la solución *BLYS* (50 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM ortovanadato sódico, 50 mM fluoruro de sodio, 10 mM fosfato de sodio, 0,3 M sacarosa, 1X inhibidores de proteasas (Roche) y 1 mM inhibidor de fosfatasa). Se añadían 500 µL de esta solución sobre aproximadamente 200 µg del tejido de interés, en un tubo Eppendorf de 2 mL con el fondo redondo que contenía una bola de acero inoxidable. Posteriormente, se homogenizó el tejido con el *TissueLyser*, a 25 Hz durante 5 minutos. Luego el contenido del tubo se centrifugaba a 16000 g durante 20 minutos a 4 °C y se transfería la fase acuosa (rosa-transparente) a un nuevo tubo. De nuevo, se centrifugaba a 16000 g durante 10 minutos a 4 °C, y se recogía el sobrenadante en un tubo nuevo, listo para proceder con la cuantificación de proteínas.

4.10.2 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó basándonos en el método de Bradford (Bradford, 1976), con el kit *DC Protein Assay* (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas extraídas de las distintas muestras de interés se cuantificaron en paralelo con una serie de soluciones estándar de BSA preparadas a una concentración conocida (1 – 12 µg/µL), para poder usar las absorbancias de estas como recta patrón y así extrapolar las concentraciones de las proteínas de las muestras cuantificadas. La absorbancia se midió a 750 nm empleando un espectrofotómetro de placas Epoch2 (BioTek).

4.10.3 Western blot

El análisis de la expresión proteica se llevó a cabo mediante la técnica *Western blot*. Para ello, se prepararon 30 µg de proteínas de cada muestra a las que se le añadió un tampón de carga: 54,7 mM Tris, 4,7% glicerol, 5,78 mM SDS, 28 µM azul de bromofenol y 15,7 mM β-mercaptoetanol. Las muestras se desnaturalizaron en un *thermoblock* (Eppendorf) durante 2 minutos a 95 °C, tras lo que se cargaron en un gel de poliácridamida 4-12% *Bolt* (Invitrogen) en el sistema de electroforesis *Mini-Gel Tank* (Invitrogen), sumergido en la solución de electroforesis *Bolt MES SDS* (Invitrogen). Se aplicó un voltaje constante de 120 V durante 60 minutos para realizar la electroforesis. Junto con las muestras se cargó el *PageRuler Plus* (Thermo Fisher Scientific), que se separa en 9 bandas de distinto peso molecular que sirven como referencia.

Terminada la electroforesis, las proteínas de las muestras separadas en el gel de poliácridamida se transfieren a una membrana de PVDF (Cytiva) de 0,45 µm, previamente activada durante 2 minutos con metanol. El sistema que se utilizó para la transferencia húmeda fue *Mini-Gel Tank*, al que se aplicó un voltaje constante de 30 V durante 1 hora. Para ello se utilizó el tampón de transferencia: 0,25 M Tris, 2 M glicina (Fisher) y 20% metanol. Una vez realizada la transferencia, las membranas se bloquearon con BSA 5% en TTBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) durante 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo,

las membranas se incubaron ON a 4 °C con los anticuerpos primarios diluidos a una concentración determinada en BSA 5% en TTBS (**Tabla 6**). Luego, las membranas se lavaban con TTBS y se incubaban con los anticuerpos secundarios (**Tabla 7**), diluidos en BSA 5% en TTBS. Los anticuerpos secundarios, que llevan acoplada la enzima HRP (*horseradish peroxidase*), se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Pasado este tiempo las membranas se vuelven a lavar con TTBS y se incubaron durante 3 minutos con el sustrato quioluminiscente *SupersignalTM West Pico PLUS enhanced chemiluminescent (ECL) substrate* (Thermo Scientific). Finalmente, se revelaron las membranas usando el *Chemidoc MP Imaging System*.

Tabla 6. Anticuerpos primarios utilizados en el Western blot.

Nombre	Dilución	Origen	Casa comercial	Referencia
Vinculina (7F9)	1:2000	Ratón	Santa Cruz	sc-73614
Lamin B1	1:1000	Conejo	Abcam	ab16048
pSMAD2 (Ser465/467)	1:1000	Conejo	Cell Signaling	138D4
SMAD2 (D43B4)	1:1000	Conejo	Cell Signaling	5339
Oct-3/4 (C-10)	1:1000	Ratón	Santa Cruz	sc-5279
p21 (F-5)	1:500	Ratón	Santa Cruz	sc-6246
p16 (M-156)	1:500	Conejo	Santa Cruz	sc-1207
Di-Methyl-Histone H3 (Lys4)	1:1000	Conejo	Cell Signaling	9725
Acc (C83B10)	1:1000	Conejo	Cell Signaling	3676
pAcc (Ser79)	1:1000	Conejo	Cell Signaling	11818
p-mTor (Ser2448)	1:500	Conejo	Cell Signaling	2971
mTor (7C10)	1:1000	Conejo	Cell Signaling	2983
pAkt (Ser473)	1:500	Conejo	Cell Signaling	9271
Akt (11E7)	1:1000	Conejo	Cell Signaling	4685
Scd1 (C12H5)	1:1000	Conejo	Cell Signaling	2794
Gck	1:1000	Ratón	Santa Cruz	sc-17819
Gapdh	1:1000	Ratón	Santa Cruz	sc-32233

Tabla 7. Anticuerpos secundarios utilizados en el Western blot.

Nombre	Dilución	Casa comercial	Referencia
HRP-Anti-Ratón	1:10000	Santa Cruz	sc-516102
HRP-Anti-Conejo	1:10000	Santa Cruz	sc-2357

4.11 INMUNOFLUORESCENCIA

Para estudiar el daño en el ADN causado por medios condicionados, se utilizó el anticuerpo contra el marcador de daño γ H2Ax (Ser 139) (9718, Cell Signaling). Las células que habían sido tratadas con medios condicionados se sembraron subconfluentes en *Chambers slides* 12 horas antes de empezar el protocolo, se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 3,7% en PBS, se realizaron 3 lavados con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,5% en PBS. Después de otros 3 lavados con PBS, se incubaron durante 1 hora a RT con el anticuerpo primario contra γ H2Ax en una dilución 1:500 en 3% BSA en PBS. Posteriormente, se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario de conejo conjugado con Alexa-Fluor 488 en BSA 3% en PBS durante 45 minutos a RT. Luego, las células se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Invitrogen) a 0,1 μ g/mL durante 10 minutos, y finalmente se cubren con medio de montaje *ProLong* y un cubreobjetos. Los portaobjetos se conservaron en oscuridad a -20 °C hasta el momento de realizar las fotos en el microscopio confocal.

4.12 ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO

4.12.1 Preparación y procesamiento de tejidos

Los tejidos que se querían estudiar a nivel histológico e inmunohistoquímico se fijaron con 10% formalina (Panreac AppliChem) en H₂O_d justo inmediatamente después de la extracción, durante 16 horas en agitación moderada a temperatura ambiente. Posteriormente, los tejidos pasaron a etanol 70% a 4°C hasta el momento de su deshidratación e inclusión en parafina, que fueron llevados a cabo por el Servicio de Histopatología de CNIO con el procesador de tejidos *Leica ASP6025*. Este procesador fue pasando secuencialmente los tejidos a distintas soluciones alcohólicas de graduación creciente (de 70° hasta 100°), terminando en xilol (Sigma-Aldrich). Luego, las muestras incluidas en parafina se cortaron con un microtomo de rotación *Leica RM2255*, seccionadas a 3 μ m de grosor a distintas profundidades del tejido. Una vez los cortes ya estaban en el portaobjetos, se desparafinaron y se rehidrataron pasando por alcoholes de graduación decreciente hasta llegar al H₂O_d para poder realizar las tinciones pertinentes. Estas tinciones también fueron llevadas a cabo por el Servicio de Histopatología de CNIO.

4.12.2 Tinción Hematoxilina-Eosina

Para poder analizar los tejidos histológicamente, se realizó la tinción hematoxilina-eosina (H/E). La hematoxilina (Panreac AppliChem) tiñe de violeta intenso los núcleos, la cromatina, los ribosomas y otras estructuras celulares, mientras que la eosina (Millipore) tiñe de rosa claro el citoplasma, colágeno, tejido conjuntivo y otras estructuras de sostén celulares.

4.12.3 Tinción inmunohistoquímica

Se realizaron las tinciones inmunohistoquímicas de los cortes de manera automatizada usando la plataforma *Dako-Autostainer Plus* (Agilent). Los distintos anticuerpos utilizados en los análisis inmunohistoquímicos se recogen en la **Tabla 8**. La reacción inmunohistoquímica se realizó con el sustrato cromogénico 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y se realizó una contratinción de los núcleos con hematoxilina. Una vez terminada la tinción, las muestras fueron de nuevo deshidratadas y preservadas con medio de montaje para su estudio por microscopía.

Tabla 8. Anticuerpos primarios utilizados para análisis inmunohistoquímico.

Nombre	Origen	Casa comercial	Referencia
Ucp1	Conejo	Abcam	ab10983
Cd45 (D3F8Q)	Conejo	Cell Signaling	70257
F4/80	Conejo	Bethyl	A700-209
Cd11c (EPR21826)	Conejo	Abcam	ab219799
Nk1.1 (E6Y9G)	Conejo	Cell Signaling	39197
Cd3e (2GV6)	Conejo	Roche	790-4341
Cd4 (D7D2Z)	Conejo	Cell Signaling	25229
Cd8a (94A)	Rata	CNIO	AM (OTO94A)
FoxP3 (221D)	Ratón	CNIO	AM (221D)
Granzima B (E5V2L)	Conejo	Cell Signaling	44153

4.12.4 Microscopía

Se revisó la morfología celular de forma rutinaria usando un microscopio óptico Leica, permitiendo tomar imágenes a distintos aumentos. Para estudios de fluorescencia se usó el microscopio confocal Leica SP8 y el *software* LAS X (Leica) para procesar las imágenes. Las fotos tomadas se cuantificaron usando el *software* ImageJ.

4.12.5 Análisis estadístico

A menos que se indique lo contrario, se utilizó la prueba t de Student de dos colas para comparar dos grupos. En el caso de tener más de 2 grupos, se utilizó ANOVA con el test *post hoc* de Tukey. Los niveles de significancia se representan de la siguiente manera: *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; n.s. = no significativo ($p \geq 0,05$). Si no se especifica de otro modo, los datos se representan en las gráficas como media \pm desviación estándar (SD).

La normalidad de la distribución de los datos se verificó mediante el test Shapiro-Wilk, y la detección de valores atípicos se realizó utilizando el test ROUT (Q=1%). Los valores atípicos detectados fueron excluidos del análisis estadístico.

5 RESULTADOS

La reprogramación celular parcial mediada por la expresión temporal de los factores OSKM (Takahashi & Yamanaka, 2016) supone una estrategia prometedora en diversos contextos biológicos. No obstante, apenas se han realizado estudios detallados sobre el impacto de la reprogramación parcial en el marco de la senescencia, la progresión tumoral o la obesidad. Por esta razón, investigamos el efecto de la reprogramación parcial en distintos contextos, valorando su capacidad para modificar el fenotipo senescente, limitar el desarrollo tumoral y mejorar el fenotipo relacionado con la obesidad.

5.1 EFECTO DE LA REPROGRAMACIÓN PARCIAL SOBRE EL FENOTIPO SENESCENTE

La senescencia celular es un proceso que se caracteriza por la parada estable del ciclo celular, asociado a distintos cambios metabólicos y fenotípicos que favorecen el envejecimiento (S. He & Sharpless, 2017). Además, este estado es considerado una barrera intrínseca al proceso de reprogramación celular. Estudios previos demostraron cómo los factores de reprogramación mejoraron distintas características de células de organismos envejecidos (Sarkar et al., 2020). A pesar de esto, el efecto de la reprogramación parcial sobre células senescentes aún no se ha estudiado en profundidad. Por este motivo, decidimos evaluar el posible efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre el fenotipo senescente.

5.1.1 Inducción de senescencia por irradiación

Con el objetivo de estudiar el efecto de OSKM en el fenotipo senescente utilizamos la exposición a rayos X, un sistema de inducción de senescencia físico. Esta radiación electromagnética ionizante de alta energía promueve el daño en el ADN, principalmente en forma de rupturas de doble cadena (Zou et al., 2012; Panganiban & Day, 2013; M. O. Bradley & Kohn, 1979). Este estímulo desencadena una respuesta al daño en el ADN (DDR) y, cuando el daño no puede ser reparado adecuadamente, se desencadena la senescencia celular (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006). Por ello, tratamos fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) con rayos X, usando una dosis de 10 Gy. Pasados 7 días tras la irradiación, se comprobó el fenotipo senescente de dichos MEFs (**Figura 12**). Como se puede observar, los MEFs irradiados presentan un aumento significativo de la tinción SA- β -Gal, tal y como muestra la tinción cromogénica con X-Gal (**Figura 12A**) y la citometría de flujo con el sustrato fluorescente C₁₂FDG (**Figura 12B**). Además, se ha podido observar un aumento significativo en el tamaño de las células irradiadas (**Figura 12C**) y en el tamaño nuclear (**Figura 12D**). También se comprobó el aumento de la expresión de genes que se consideran marcadores de senescencia como *Cdkn2a*, *Trp53* o *Cdkn1a*, y la expresión de genes que codifican para distintos factores del SASP, como *Timp1*, *Cxcl1* o *Cxcl2* (**Figura 12E**). Por último, corroboramos que las células no proliferasen tras la irradiación. Para ello, estudiamos el crecimiento de la población celular en distintos puntos temporales tras la irradiación (**Figura 12F**) y analizamos por inmunofluorescencia la incorporación de EdU y la presencia de la proteína Ki76, ambos considerados marcadores de proliferación (**Figura 12G**).

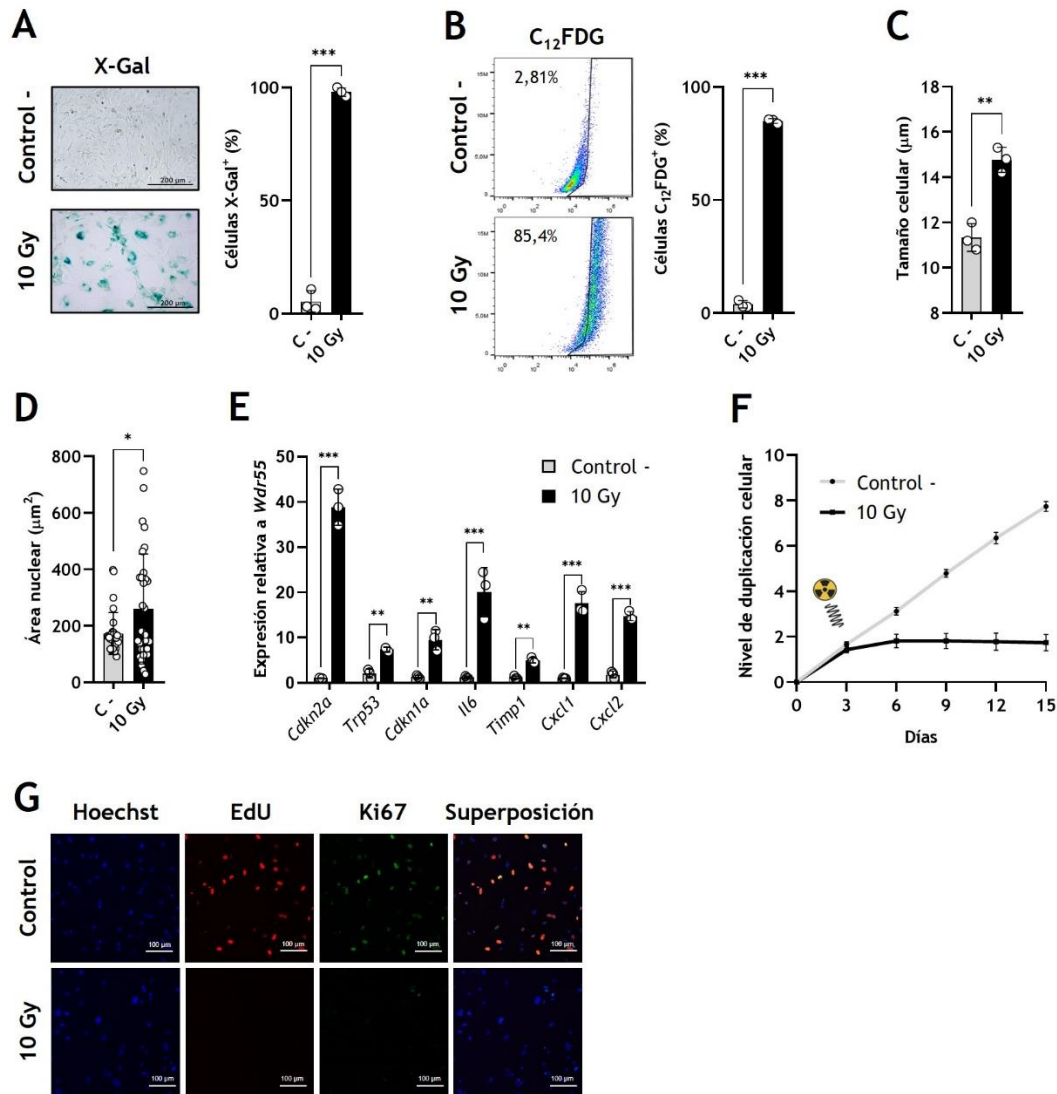


Figura 12. Inducción de senescencia celular mediante radiación X. (A) Tinción X-Gal de MEFs WT sin tratar y tratados con 10 Gy, con la cuantificación de células positivas para X-Gal. (B) Análisis por citometría de flujo de las células C₁₂FDG positivas con su cuantificación. Las citometrías se representan en un gráfico donde el eje Y se corresponde con el SCC y el eje X con el canal FL1-A. (C) Cuantificación del tamaño celular, en µm. (D) Cuantificación del área nuclear, en µm². (E) Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de expresión de ARNm de los genes: *Cdkn2a*, *Trp53*, *Cdkn1a*, *Il6*, *Timp1*, *Cxcl1* y *Cxcl2*. La expresión de estos genes se relativizó a la expresión del gen constitutivo *Wdr55*. (F) Estudio de la proliferación celular tras la irradiación. Se representan el número de duplicaciones de las poblaciones celulares. (G) Inmunofluorescencia para detectar la incorporación de EdU y presencia de Ki67. Se usó Hoechst como marcaje nuclear. La significancia estadística se analizó mediante el test t de student de dos colas. (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001, (ns) no significativo. (n=3)

Estos resultados demuestran que la irradiación de MEFs con una dosis de 10 Gy es suficiente para promover el estado senescente en estas células, provocando la parada del ciclo celular y promoviendo la expresión de múltiples marcadores de senescencia.

5.1.2 El estado senescente no se revierte con la expresión de OSKM ni con el tratamiento con 2c

Para comprobar si la expresión de OSKM o el tratamiento con RepSox + TCP (2c) son capaces de revertir el estado senescente, promovemos en MEFs irradiados la expresión de los factores de reprogramación o los tratamos con 2c. En el caso de OSKM, introducimos estos factores genéticos por transducción lentiviral junto con el transactivador rtTA, que en presencia de doxiciclina activará la expresión de OSKM. Administramos este fármaco a una dosis de 5 $\mu\text{g/mL}$ durante 6 días consecutivos y comprobamos la expresión de los factores de reprogramación, analizando la transcripción de una región específica del vector policistrónico (Tg-Sox2/Klf4), lo que demuestra que efectivamente se está transcribiendo OSKM (**Figura 13A**). Además, se corroboró la expresión de OSKM a nivel proteico, verificando la expresión de Oct4 como marcador de la expresión del casete policistrónico (**Figura 13B**).

También se comprobó el efecto del tratamiento de RepSox y TCP en los MEFs senescentes (SEN 2c). En primer lugar, para confirmar la efectividad de RepSox, se analizó la inhibición del receptor tipo 1 de TGF β (TGF β -RI o Alk5). Para ello, se estudió la fosforilación de Smad2 (p-Smad2), ya que Alk5 fosforila a esta proteína. Dada la ausencia de p-Smad2 (**Figura 13B**) en los MEFs SEN 2c, se confirma el efecto esperado de RepSox. En segundo lugar, para comprobar el efecto de TCP, un inhibidor de la desmetilasa de histonas específico de lisina (LSD1), se midieron los niveles de H3K4me2, ya que se ha descrito que LSD1 elimina los grupos metilo de la lisina 4 de la histona H3 (Barth et al., 2019). Al observar el incremento de los niveles de H3K4me2 en los MEFs senescentes tratados con 2c (**Figura 13B**), se corrobora el efecto de TCP.

Una vez finalizados los tratamientos, se evaluaron distintos marcadores de senescencia. En primer lugar, se comprobó si las células habían perdido la actividad SA- β -Gal. Para ello, se realizó una tinción con el sustrato cromogénico X-gal y una citometría de flujo con el sustrato fluorescente C₁₂FDG (**Figura 13C** y **Figura 13D**). Con ambas técnicas se comprobó que no hay una reducción de la actividad SA- β -Gal en los MEFs senescentes tratados, al no presentar diferencias significativas con respecto al control senescente. También se comprobó si se había recuperado la proliferación celular tras la expresión de OSKM o el tratamiento con 2c. Para ello, se analizó por inmunofluorescencia la incorporación de EdU y la presencia de proteína Ki67 (**Figura 13E**). Ninguna célula senescente, ya fuera control o tratada, mostró marcaje positivo para estos marcadores de proliferación. Finalmente, el análisis celular mostró que no había incremento en las poblaciones celulares de ninguna de las condiciones irradiadas, ni durante los 6 días del tratamiento, ni los 6 días posteriores (**Figura 13F**).

Estos datos demuestran que ni la expresión de OSKM ni el tratamiento con 2c son capaces de revertir la senescencia desencadenada por la irradiación con rayos X, al menos en lo que respecta al cese de la proliferación o a la actividad SA- β -Gal.

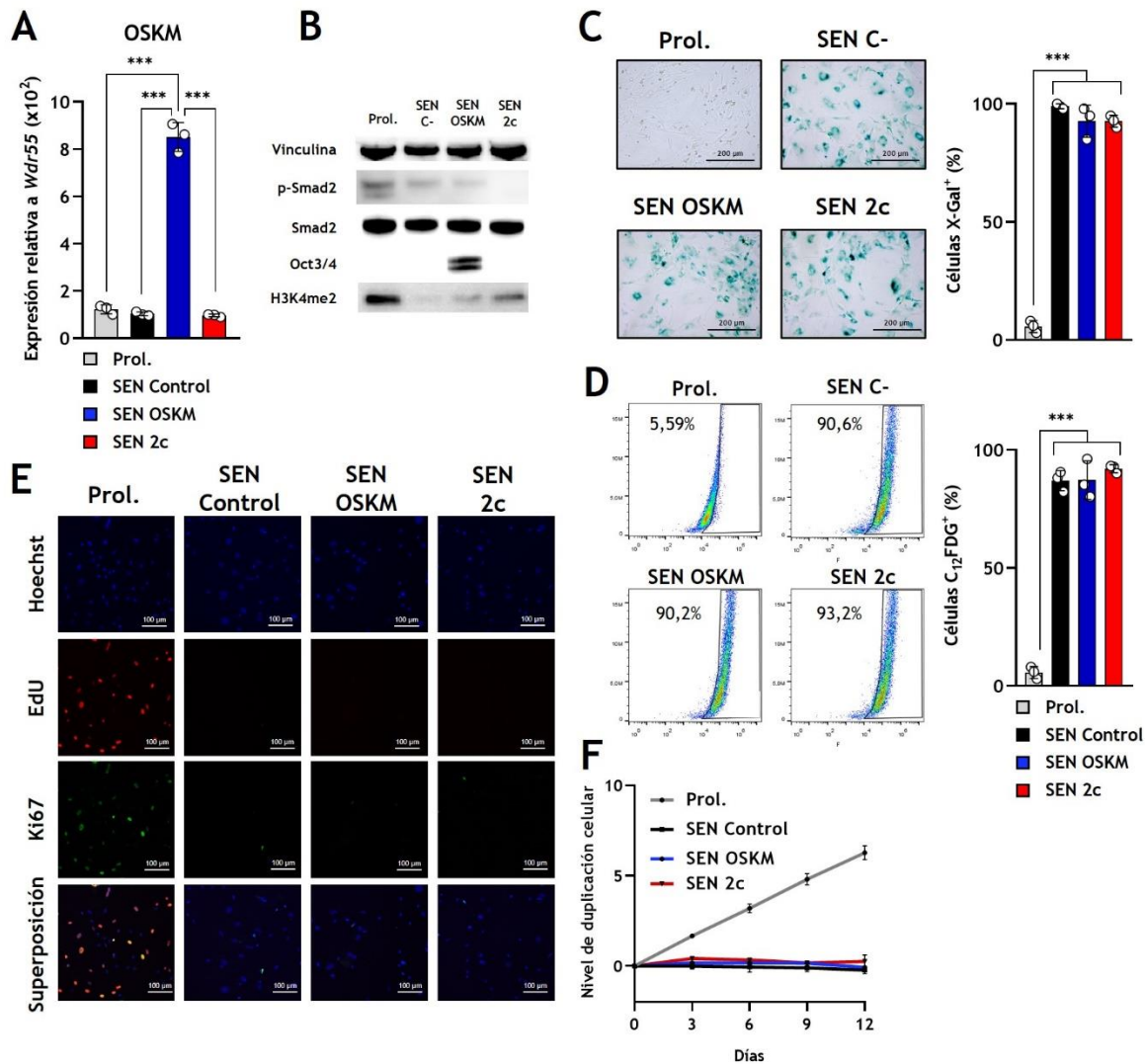


Figura 13. Las células irradiadas siguen siendo senescentes tras expresar OSKM o ser tratadas con 2c. (A) Análisis de los niveles de ARNm mediante qRT-PCR de *Tg-Sox2/Klf4*, relativo al gen constitutivo *Wdr55*. (B) Análisis de los niveles proteicos mediante *Western blot* de p-Smad2, Smad2, Oct3/4 y H3K4me2, con Vinculina como control de carga. (C) Tinción X-Gal de las distintas junto con la cuantificación de células positivas. (D) Análisis por citometría de flujo de las células C₁₂FDG positivas y su cuantificación. Las citometrías se representan en un gráfico donde el eje Y se corresponde con el SCC y el eje X con el canal FL1-A. (E) Inmunofluorescencia para detectar la incorporación de EdU y presencia de Ki67. Se usó Hoechst como marcaje nuclear. (F) Estudio de la proliferación celular, representando el número de duplicaciones celulares. La significancia estadística se analizó mediante el test ANOVA con el test *post hoc* de Tukey. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (ns) no significativo. (n=3)

5.1.3 Cambios transcripcionales detectados tras los tratamientos

Sin embargo, a pesar de no conseguir revertir totalmente el estado senescente tras la expresión de OSKM ni con 2c, quisimos estudiar si se estaba alterando de alguna forma el patrón de expresión de las células senescentes con ambos tratamientos. Para ello, analizamos el transcriptoma por ARN-seq (**Figura 3**) para así poder comparar las distintas firmas de expresión génica en estas condiciones. Para realizar los análisis de ARN-seq se contó con la colaboración del grupo de la Dra. Han Li del *Institut Pasteur*, en París.

Mediante un análisis de componentes principales (PCA) se pudo observar una reversión parcial del perfil transcriptómico de las células senescentes tras OSKM y 2c (**Figura 14A**). Además, analizamos una firma de expresión génica relacionada con la senescencia (*SAUL_SEN_MAYO*) que permite identificar transcripcionalmente las células senescentes de distintos tejidos (Saul et al., 2022). Este conjunto de genes se mostraba positivamente enriquecido durante la senescencia, mientras que tras la expresión de OSKM las células senescentes reducían la expresión de este conjunto de genes (**Figura 14B**). Sin embargo, en este caso el tratamiento con 2c no fue capaz de reproducir el efecto de OSKM. Al analizar una firma génica relacionada con la proliferación (*G1_S_TRANSITION*), observamos cómo durante la senescencia este conjunto de genes se ve negativamente enriquecido. Sin embargo, tras la expresión de OSKM y el tratamiento con 2c, se puede observar un enriquecimiento positivo en esta firma génica (**Figura 14C**) que, a pesar de no estar acompañada de la proliferación celular, demuestra un cambio en el transcriptoma de las células senescentes.

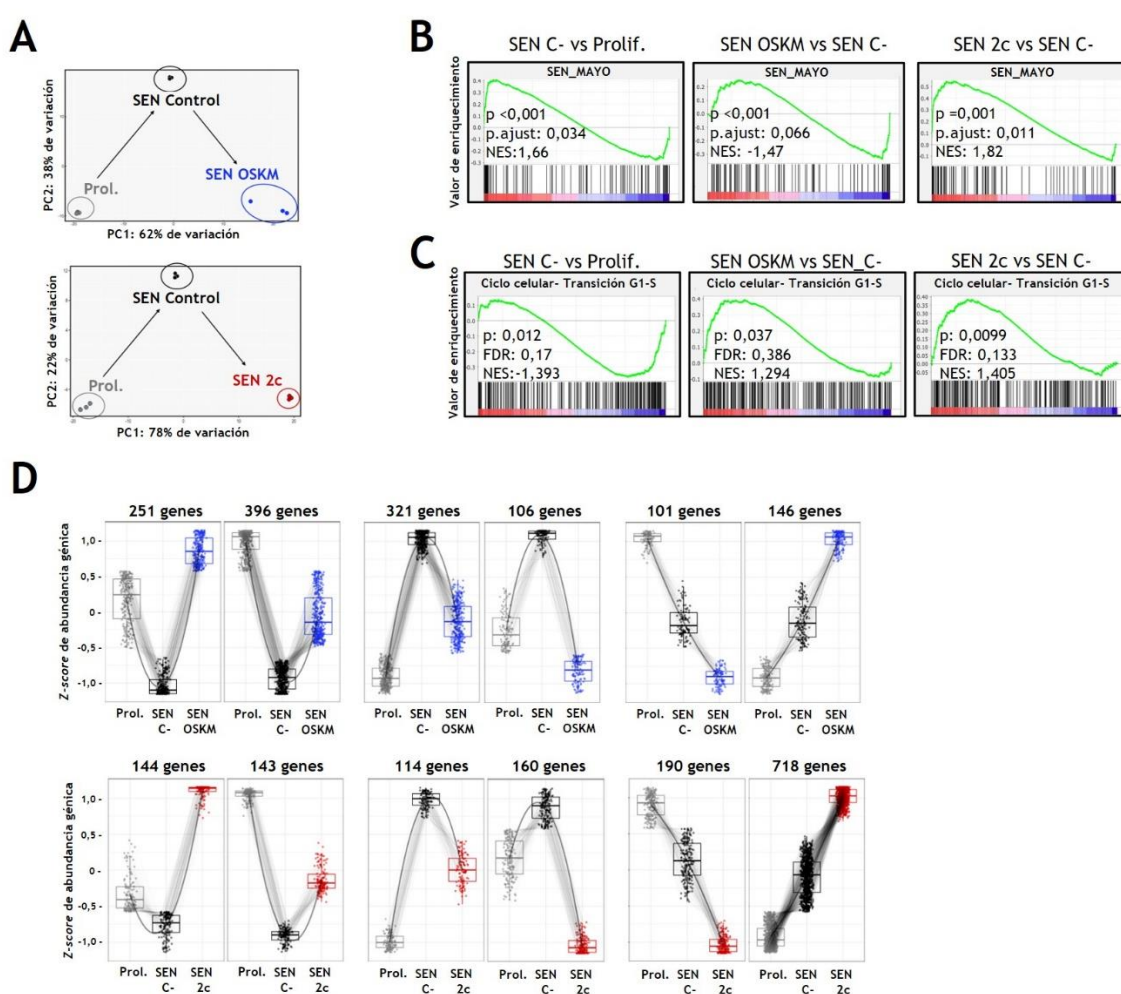


Figura 14. Análisis transcripcional mediante ARN-seq. (A) Análisis de componentes principales (PCA) transcriptómicos. (B) Análisis de enriquecimiento de genes de la firma *SAUL_SEN_MAYO*. (C) Análisis de enriquecimiento de genes de la firma *G1_S_TRANSITION*. (D) Gráficos del patrón de expresión de los genes con mayor variación entre los grupos analizados. El análisis de expresión diferencial se realizó utilizando el paquete DESeq2 (versión 1.46.0) en R (versión 4.4.1), con significancia estadística definida por un valor p ajustado < 0.05 y un umbral de \log_2 fold-change > 1. (n=3)

Tras analizar la tendencia de los genes con una mayor variación (**Figura 14D**), se observa cómo tanto en las muestras SEN OSKM como SEN 2c se recupera parcial o totalmente el patrón de expresión propio de las células proliferativas. Sin embargo, los dos últimos grupos de genes analizados para ambos tratamientos muestran genes que no se restauran, sino que van en la tendencia opuesta al de las células proliferativas. Esto demuestra que la reversión del transcriptoma senescente es solo parcial, y no total, tras los tratamientos con OSKM y 2c.

5.1.4 Efecto senomórfico de OSKM y 2c

A continuación, estudiamos más en detalle distintos marcadores de senescencia (**Figura 15**). Al analizar la expresión de genes que aumentan durante la senescencia, como *Cdkn2a* y *Cdkn1a*, o genes que codifican para factores del SASP, como *Il6*, *Ccl2* y *Timp1*, observamos una reducción significativa tras la expresión de OSKM o el tratamiento con 2c (**Figura 15A**). También se puede observar cómo se reduce significativamente el tamaño celular (**Figura 15B**) y el área nuclear (**Figura 15C**) con la expresión de OSKM y con 2c. Asimismo, el análisis por *Western blot* de las proteínas p21 y p16, ambas aumentadas durante la senescencia, mostró una reducción importante tras ambos tratamientos (**Figura 15D**). Sin embargo, en el caso de Lamin B1, una proteína estructural de la lámina nuclear que disminuye en las células senescentes, no hemos podido detectar la recuperación de su expresión ni con OSKM ni con 2c (**Figura 15D**).

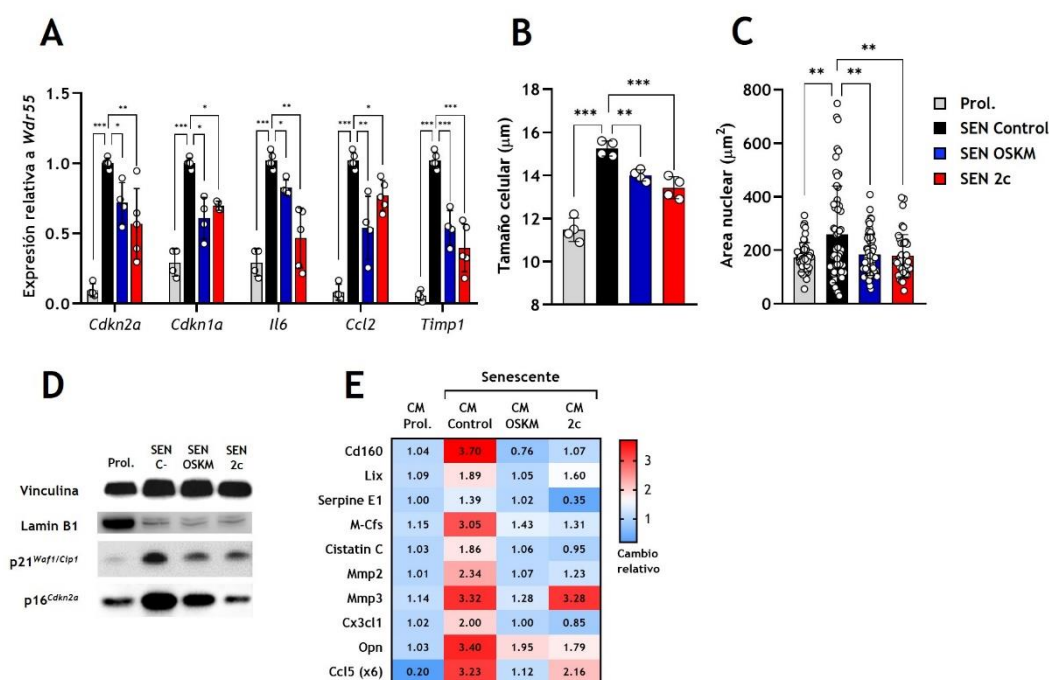


Figura 15. Efecto senomórfico de OSKM y 2c. (A) Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de expresión de ARNm de los genes: *Cdkn2a*, *Cdkn1a*, *Il6*, *Ccl2* y *Timp1*. La expresión de estos genes se relativizó a la expresión del gen constitutivo *Wdr55*. (B) Cuantificación del tamaño celular, en μm . (C) Cuantificación del área nuclear, en μm^2 . (D) Análisis de los niveles proteicos mediante *Western blot* de Lamin B1, p21 y p16, con Vinculina como control de carga. (E) Análisis de la secreción de factores solubles del SASP mediante *Cytokine array*. La significancia estadística se analizó mediante el test ANOVA con el test *post hoc* de Tukey. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (ns) no significativo. A-D (n=3), E (n=1).

Dado que fuimos capaces de detectar una reducción en la expresión de genes relacionados con el SASP (**Figura 15A**), quisimos estudiar el secretoma de estas células. Para ello, se recogió el medio de las distintas condiciones (*conditioned medium*, CM) tras 48 horas de condicionamiento.

Luego, al analizar los factores secretados en los CM usando un *Cytokine array*, detectamos un aumento en la secreción de factores solubles del SASP en el CM de las células senescentes, niveles que se ven reducidos tras la expresión de OSKM o el tratamiento con 2c (**Figura 15E** y **Figura S1**).

Estos resultados parecen indicar un posible efecto senomórfico por parte de OSKM y 2c, reduciendo significativamente distintos parámetros asociados con la senescencia celular.

5.1.5 La expresión de OSKM y el tratamiento con 2c reducen la senescencia paracrina

Dada la menor presencia de factores solubles del SASP tras los tratamientos, decidimos estudiar la capacidad de estos CM para promover la senescencia paracrina. Para ello, tratamos MEFs WT proliferativos con los medios condicionados generados, en 2 rondas consecutivas de 3 días de tratamiento. Una vez terminado el tratamiento con CM, estudiamos la inducción de senescencia en estas células diana (senescencia paracrina) promovida por los distintos CM (**Figura 16**).

En primer lugar, al analizar los niveles de SA- β -Gal de las células diana mediante citometría de flujo con el marcador fluorescente C₁₂FDG, se puede observar cómo hay un incremento significativo en los niveles de este marcador tras el tratamiento con los CM de células senescentes control en comparación con las tratadas con CM de células proliferativas (**Figura 16A**), como era de esperar. Sin embargo, tras expresar OSKM y tras el tratamiento con 2c, los CM de estas células senescentes tienen una capacidad significativamente reducida para promover la senescencia paracrina (**Figura 16A**). También podemos observar cómo hay un aumento en el tamaño celular en las células tratadas con CM senescente control, mientras que las tratadas con CM senescente OSKM y 2c, promueven significativamente menos el incremento del tamaño celular (**Figura 16B**). Al analizar la proliferación celular de las distintas poblaciones tratadas con CM, pudimos observar cómo aquellas tratadas con CM senescente control habían crecido significativamente menos que las tratadas con CM proliferativo, mientras que las tratadas con CM senescente OSKM o 2c proliferaron más que las tratadas con CM senescente control (**Figura 16C**). Asimismo, comprobamos el aumento en la expresión de genes relacionados con la senescencia, como *Cdkn2a* o *Cdkn1a* y genes del SASP como *Il6*, *Ccl* y *Areg* (**Figura 16D**), y observamos que esos aumentos se previenen parcialmente tras los tratamientos. Por último, decidimos estudiar la presencia de daño en el ADN de las células diana. Para ello, utilizamos el marcador de daño γ H2AX, que reveló un aumento significativo en el daño del ADN de las células tratadas con CM de células senescentes control, mientras que este aumento se prevenía cuando se añadían CM de células senescentes OSKM o 2c (**Figura 16E**).

De manera general, estos resultados muestran que las células senescentes son capaces de promover la senescencia paracrina, aumentando la actividad SA- β -Gal, el tamaño celular y el daño en el ADN, mientras que se reduce la proliferación celular. Sin embargo, tras expresar OSKM o tratar con 2c, las células senescentes disminuyen significativamente la capacidad de inducir senescencia paracrina.

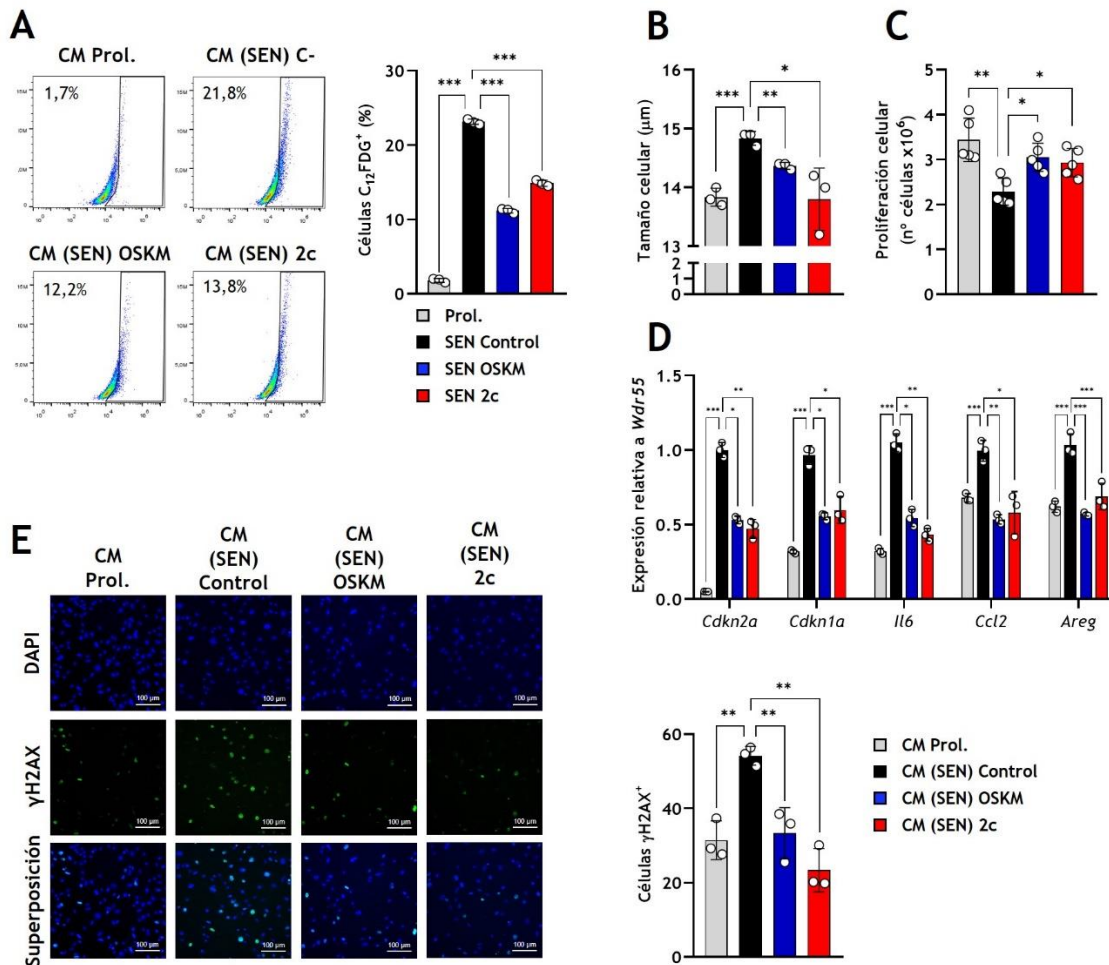


Figura 16. Disminución de la senescencia paracrina tras OSKM y 2c. (A) Análisis por citometría de flujo de las células C₁₂FDG positivas y su cuantificación tras el tratamiento con medios condicionados. Las citometrías se representan en un gráfico donde el eje Y se corresponde con el SCC y el eje X con el canal FL1-A. (B) Cuantificación del tamaño celular, en µm. (C) Proliferación celular, representando el número de células finales al terminar el tratamiento con medios condicionados. (D) Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de expresión de ARNm de los genes: *Cdkn2a*, *Cdkn1a*, *Il6*, *Ccl2* y *Areg*. La expresión de estos genes se relativizó a la expresión del gen constitutivo *Wdr55*. (E) Inmunofluorescencia contra γH2AX tras el tratamiento. La significancia estadística se analizó mediante el test ANOVA con el test *post hoc* de Tukey. (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001, (ns) no significativo. (n=3)

5.1.6 OSKM y 2c disminuyen la capacidad de migración de macrófagos

Para seguir estudiando el impacto funcional de la reducción en la secreción de factores proinflamatorios del SASP, evaluamos la capacidad de estos MEFs senescentes para promover la quimioatracción de células del sistema inmunitario. Para ello, cultivamos en *transwell* la línea de macrófagos RAW 264.7 en la parte superior mientras que los MEFs de nuestras condiciones de estudio se sembraron en la parte inferior. Además, se estableció un gradiente de FBS para favorecer la migración de estos macrófagos hacia la parte inferior del *transwell* (**Figura 17A**).

Tal y como se puede apreciar, los MEFs senescentes promovieron la migración de macrófagos significativamente más que los MEFs proliferativos. Sin embargo, los MEFs que expresaban OSKM o habían sido tratados con 2c, mostraron una capacidad de atracción de macrófagos significativamente menor (**Figura 17B**).

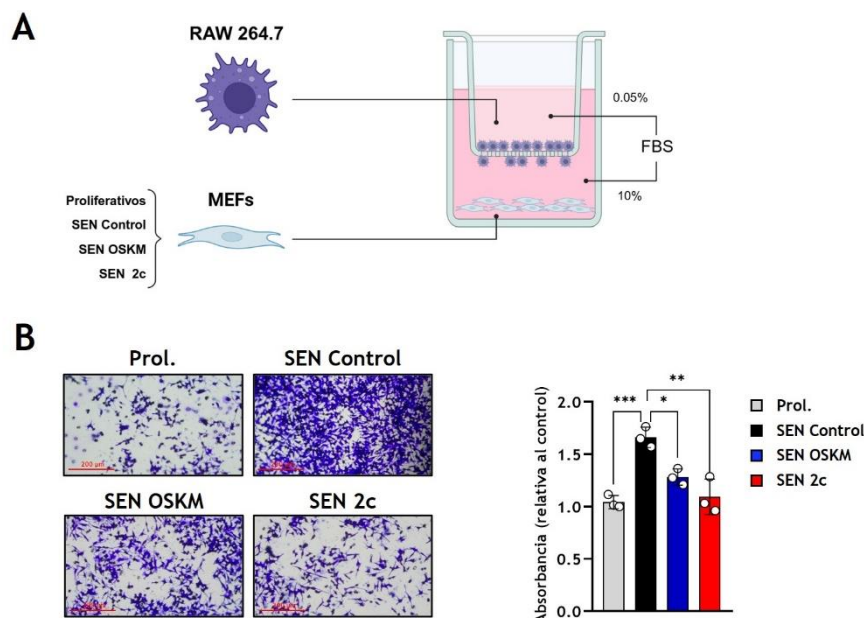


Figura 17. Efecto de OSKM y 2c sobre la atracción de macrófagos. (A) Representación gráfica del ensayo de migración de macrófagos. (B) Imágenes representativas de la migración de macrófagos a través del *transwell*, junto su cuantificación. La significancia estadística se analizó mediante el test ANOVA con el test *post hoc* de Tukey. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (ns) no significativo. (n=3)

Esto demuestra que la reducción de la secreción de factores del SASP inducida por la expresión de OSKM o el tratamiento con 2c en células senescentes, disminuye la quimioatracción de macrófagos.

5.1.7 OSKM y 2c reducen el efecto potenciador de la reprogramación de las células senescentes *in vitro*

Los factores del SASP secretados por las células senescentes contribuyen positivamente al proceso de reprogramación celular (Mosteiro et al., 2016; Von Joest et al., 2022). Dado que los tratamientos que estamos estudiando reducen la secreción de algunos de estos factores del SASP, quisimos estudiar si también afectan al proceso de reprogramación.

Para ello, generamos CM de las distintas condiciones experimentales, usando medio de reprogramación. Luego, se suplementan estos CM con doxiciclina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 15% KSR para tratar MEFs i4F durante 14 días, durante los que se completará el proceso de reprogramación (**Figura 18A**). Tal y como se puede observar, el CM de MEFs senescentes propició el proceso de reprogramación, aumentando el número de colonias (**Figura 18B**). Sin embargo, tras expresar OSKM o ser tratados con 2c, el CM generado por estos MEFs senescentes perdió la capacidad de potenciar la reprogramación celular, al no presentar diferencias significativas con respecto al control proliferativo (**Figura 18B**).

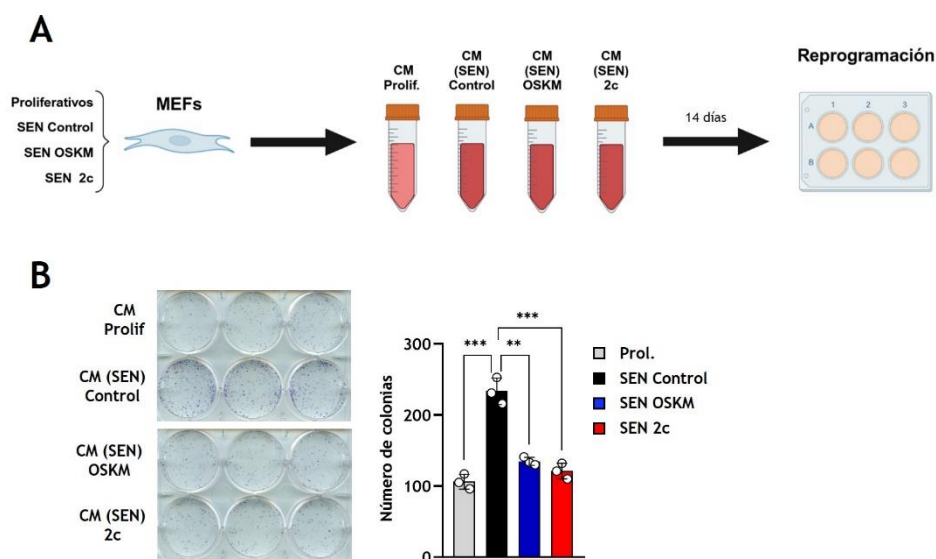
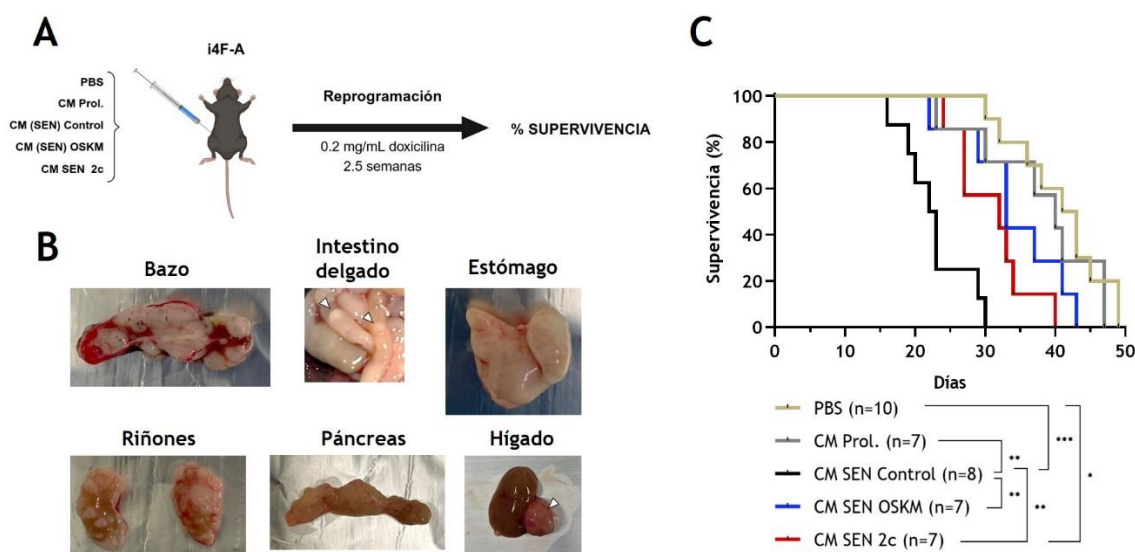


Figura 18. Reducción del efecto potenciador de la reprogramación tras OSKM o 2c. (A) Representación gráfica del experimento del ensayo de eficiencia de reprogramación. (B) Tinción fosfatasa alcalina de MEFs i4F tras el proceso de reprogramación en presencia de los medios condicionados de estudio, junto con la cuantificación de la eficiencia de reprogramación. La significancia estadística se analizó mediante el test ANOVA con el test *post hoc* de Tukey. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (ns) no significativo. (n=3)

5.1.8 OSKM y 2c reducen el efecto potenciador de la reprogramación de las células senescentes *in vivo*

Teniendo en cuenta el efecto de los factores proinflamatorios del SASP sobre el proceso de reprogramación, y que estos factores disminuyen con la expresión de OSKM o el tratamiento con 2c, decidimos estudiar el proceso de reprogramación en un contexto *in vivo*. Para ello, recolectamos los medios condicionados de nuestras condiciones de estudio, realizamos un intercambio de solución tampón y liofilizamos los CM. Luego, los resuspendimos en PBS y se inyectaron intraperitonealmente a ratones macho i4F-A. Estos ratones se tratan con doxiciclina (0,2 mg/mL en agua de bebida) durante 2,5 semanas, contando desde la primera inyección de CM. Finalizado este tiempo, se retira la doxiciclina y analizamos el tiempo que los animales sobreviven tras la pauta completa de reprogramación (**Figura 19A**). Este tratamiento en el modelo de ratón i4F-A induce la formación de masas tumorales (teratomas) en distintos tejidos (**Figura 19B**), debido a la generación de células pluripotentes *in vivo*, tras un proceso de expansión y diferenciación desorganizada (Abad et al., 2013). El CM de células senescentes control potenció la reprogramación y los ratones tratados con estos CM murieron significativamente más rápido que el resto de los grupos, que habían sido tratados con CM de células senescentes OSKM o 2c (**Figuras 19C**). Cabe destacar que los órganos afectados por teratomas en ambos grupos fueron los mismos. Sin embargo, la mayor velocidad de formación de teratomas en el grupo CM SEN Control resultó en una muerte más acelerada de estos ratones.

Los resultados obtenidos demuestran que la reducción de la secreción de factores proinflamatorios de las células senescentes tras la expresión de OSKM o el tratamiento con 2c, llevan a la pérdida del efecto potenciador de la reprogramación de las células senescentes, tanto *in vitro* como *in vivo*.



5.1.9 La expresión de OSKM y el tratamiento con 2c restauran parcialmente la alteración mitocondrial típica de la senescencia

Las células senescentes muestran una disfunción mitocondrial caracterizada por un descenso en el potencial de membrana, que trata de compensarse aumentando la masa mitocondrial. Esto, junto con una reducción en la mitofagia, conlleva la acumulación de mitocondrias disfuncionales en las células senescentes y, consecuentemente, a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) (Miwa et al., 2022).

Nuestros resultados corroboran el aumento de la masa mitocondrial en las células senescentes y, que tras la expresión de OSKM o el tratamiento con 2c, esta masa se ve significativamente reducida (**Figura 20A**). Sin embargo, no vemos diferencias significativas en cuanto al potencial de membrana tras los tratamientos en comparación con el control senescente (**Figura 20A**). Esto podría explicarse porque, aunque las mitocondrias individuales de las células senescentes tengan un menor potencial de membrana, el aumento en la masa mitocondrial en estas células compensa esta disminución general, manteniendo una fluorescencia total sin diferencias significativas. Para poder comparar adecuadamente el potencial de membrana, corregimos las distintas masas mitocondriales relativizando los datos de potencial de membrana (TMRM) a los de la masa mitocondrial (Mitotracker), obteniendo así una medida relativa del potencial, comparable entre condiciones. Como podemos observar, este ratio TMRM/Mitotracker revela una reducción significativa de potencial de membrana durante la senescencia, que se ve significativamente restaurado tras la expresión de OSKM o el tratamiento con 2c (**Figura 20B**).

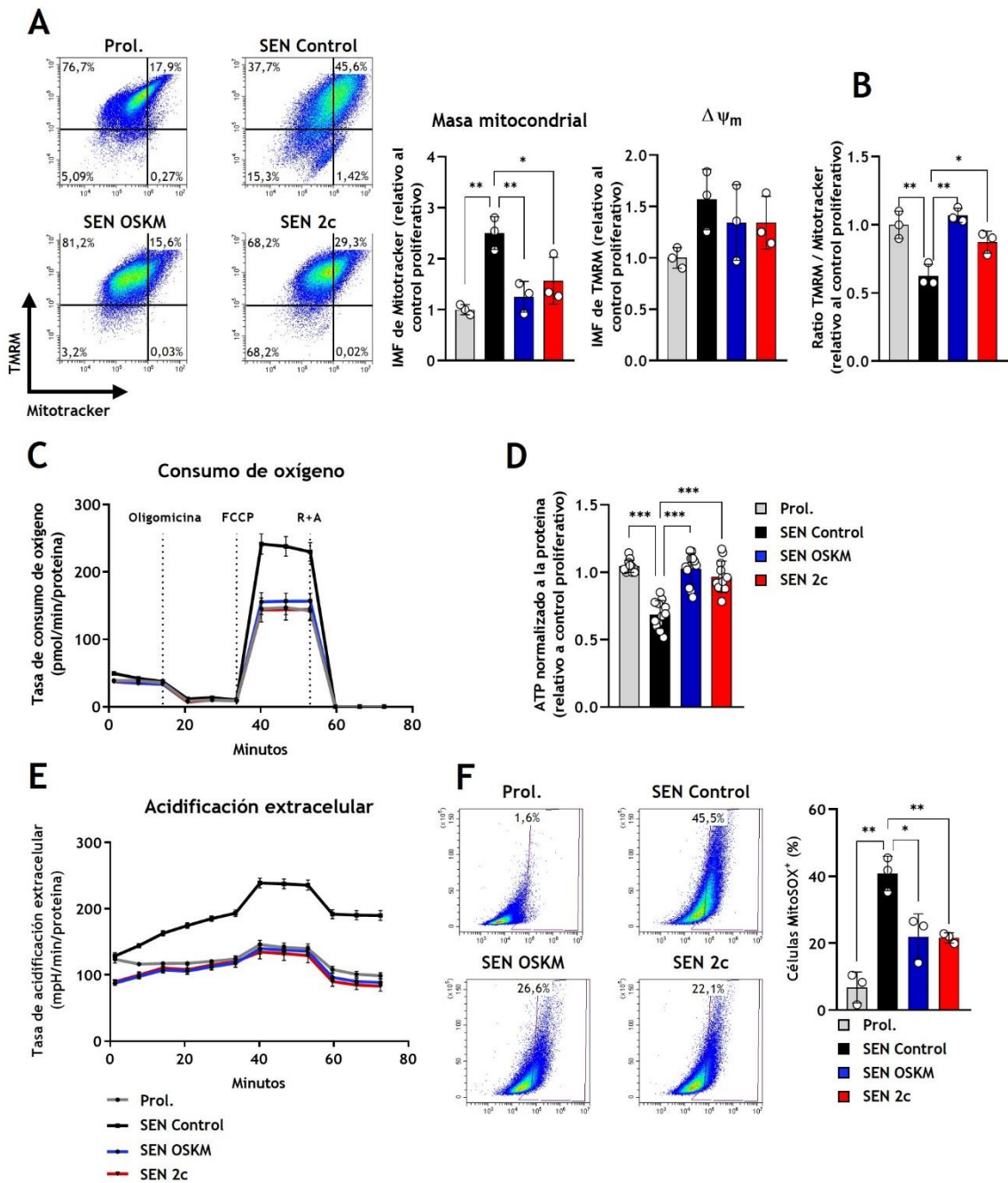


Figura 20. Efecto de OSKM y 2c sobre la disfunción mitocondrial. (A) Análisis por citometría de flujo de los niveles de TMRM y Mitotracker, junto con sus respectivas cuantificaciones de intensidad media de fluorescencia (IMF). Las citometrías se representan en un gráfico donde el eje Y se corresponde con el canal Y585-A y el eje X con el canal B525-A. (B) Ratio de TMRM : Mitotracker. (C) Tasa de consumo de oxígeno en estado basal y tras el tratamiento con Oligomicina, FCCP y Rotenona + Antimicina A. Se representa el consumo de oxígeno en pmol/min relativo al contenido proteico. (D) Medida de ATP mitocondrial y ATP total, normalizados al contenido proteico y relativos al control proliferativo. (E) Tasa de acidificación extracelular tras el tratamiento con Oligomicina, FCCP y Rotenona + Antimicina A. Se representa la variación de pH medido en mpH/min relativo al contenido proteico. (F) Análisis por citometría de flujo de las células MitoSOX⁺ y su cuantificación. Las citometrías se representan en un gráfico donde el eje Y se corresponde con el SCC y el eje X con el canal V610-A. La significancia estadística se analizó mediante el test ANOVA con el test *post hoc* de Tukey. (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001, (ns) no significativo. (n=3)

A continuación, analizamos el consumo de oxígeno en estas condiciones, pudiendo solo observar diferencias en el consumo de oxígeno máximo en las células senescentes control tras desacoplar la cadena de transporte electrónica con FCCP (**Figura 20C**). Luego, al analizar la cantidad de ATP mitocondrial, se puede observar cómo este disminuye en las células senescentes y que tras la expresión de OSKM y tratamiento con 2c, los niveles de ATP se recuperan (**Figura 20D**). Seguidamente, decidimos evaluar la tasa de acidificación extracelular, un parámetro directamente relacionado con la glucólisis (**Figura 20E**). Los datos muestran un claro incremento de la acidificación del medio extracelular que implica un aumento en la glucólisis durante la senescencia, lo que se revierte tras la expresión de OSKM o el tratamiento con 2c.

Todos estos resultados apuntan hacia la acumulación de mitocondrias disfuncionales en las células senescentes y una mejoría en el metabolismo mitocondrial tras ambos tratamientos. Dado que la disfunción mitocondrial se relaciona directamente con el aumento en la producción de ROS (Rizwan et al., 2020), decidimos estudiar su acumulación en nuestras condiciones. Como se puede observar en la **Figura 20F**, se produce un aumento significativo en la acumulación de ROS mitocondrial en las células senescentes control, como era de esperar, mientras que sus niveles se restauran parcialmente tras la expresión de OSKM o el tratamiento con 2c.

Estos resultados demuestran la disfunción mitocondrial de las células senescentes y su recuperación, al menos parcialmente, tras la expresión de OSKM y el tratamiento con 2c.

5.2 EFECTO DE LA REPROGRAMACIÓN PARCIAL SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL EN ORGANISMOS ENVEJECIDOS

Se ha descrito que el envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo del desarrollo tumoral, ya que el ambiente proinflamatorio típico de los tejidos envejecidos favorece y agrava el desarrollo tumoral (Hanahan & Weinberg, 2000; Muñoz-Espín & Serrano, 2014). Dado que la reprogramación parcial de animales envejecidos promueve el rejuvenecimiento de los mismos (Ocampo et al., 2016), decidimos evaluar si la remodelación de los tejidos y órganos de ratones envejecidos mediante la reprogramación parcial podría afectar a la implantación y a la progresión tumoral.

Con el fin de comprobar esta hipótesis, utilizamos ratones reprogramables i4F-A de 2 años. Para promover la expresión de OSKM, los animales fueron tratados de manera cíclica con doxiciclina a una concentración de 1 mg/mL en el agua de bebida: 2 días con tratamiento (2D+) seguidos de 5 días sin tratamiento (5D-), repitiendo este ciclo 4 semanas (viejos + doxy). Una vez finalizado el tratamiento, a los machos se les inyectó en vena de cola la línea de adenocarcinoma pulmonar L1475, y a las hembras se les inyectó en mama la línea de carcinoma de mama B6BC (**Figura 21**) modificadas para expresar el gen de la luciferasa (B6BC-Luc). Los resultados se compararon con un grupo de ratones i4F-A jóvenes (3 meses) y otro grupo de ratones i4F-A envejecidos en los que no se expresó OSKM en ningún momento.

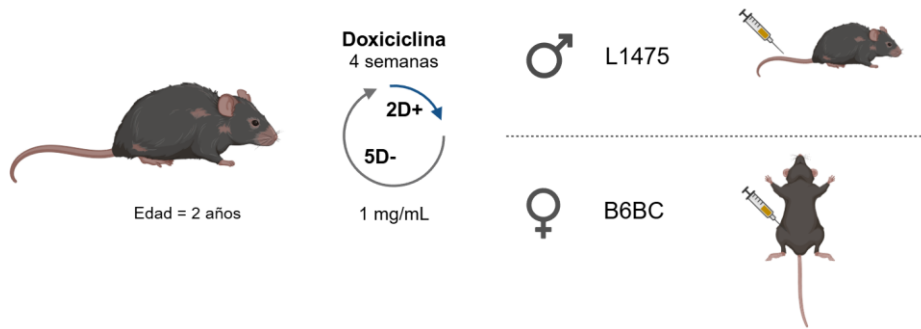


Figura 21. Representación esquemática del experimento de desarrollo tumoral en ratones viejos tras la reprogramación parcial.

5.2.1 La reprogramación parcial disminuye el crecimiento tumoral en pulmones

Antes de evaluar si la reprogramación parcial tiene un efecto en la implantación y crecimiento tumoral en pulmones, verificamos la expresión adecuada de OSKM en el pulmón de ratones i4F-A de 2 años. Observamos una activación significativa de OSKM justo después del tratamiento con doxiciclina (2D+), mientras que, tras la retirada del tratamiento (5D-), el transgén se silencia (**Figura 22A**). De esta manera, se previene la formación de teratomas asociados a una expresión prolongada de los factores de reprogramación.

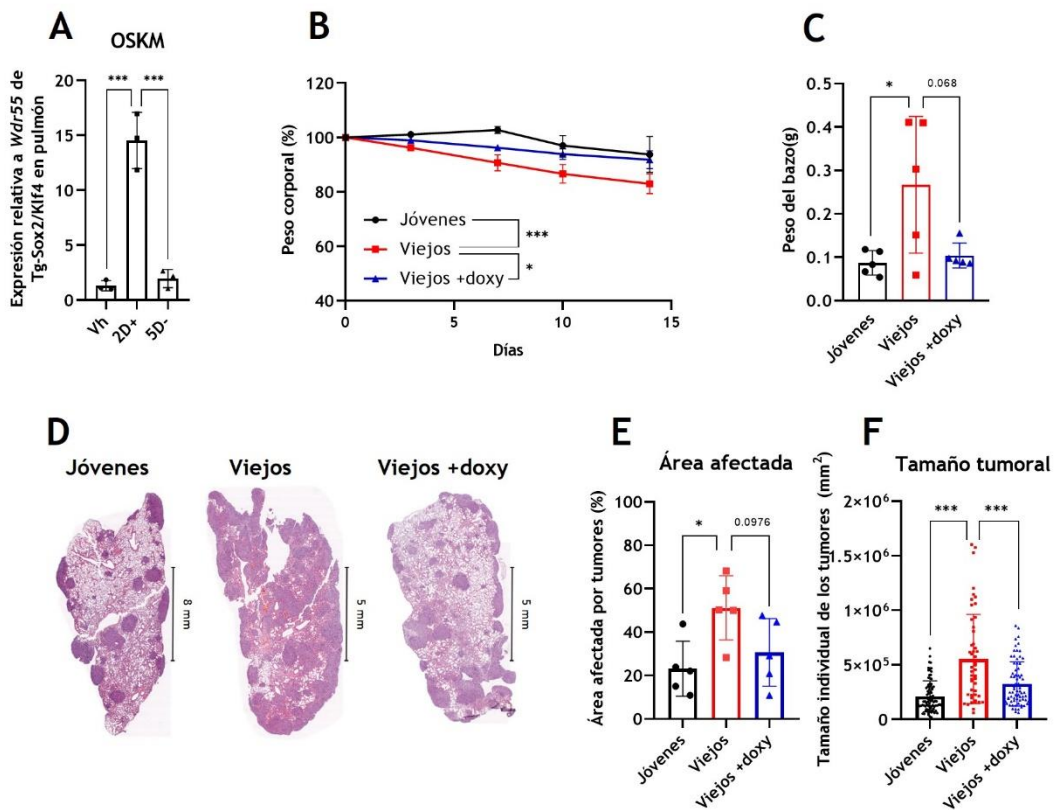


Figura 22. Reducción de progresión tumoral en el pulmón tras la reprogramación parcial. (A) Análisis de los niveles de ARNm en tejido pulmonar mediante qRT-PCR de Tg-Sox2/Klf4, relativo al gen constitutivo *Wdr55* (n=3). (B) Representación de la variación del peso corporal durante el experimento. (C) Medida del peso del bazo. (D) Imágenes representativas de secciones de pulmones teñidos con H/E con desarrollo tumoral. (E) Cuantificaciones del área pulmonar afectada por tumores (promedio de todas las secciones de pulmón de cada ratón). (F) Tamaño individual de los tumores en μm^2 . La significancia estadística se analizó mediante el test ANOVA con el test *post hoc* de Tukey. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (ns) no significativo. B-F (n=5).

Posteriormente, tras la inyección de las L1475, analizamos la variación del peso de los ratones a lo largo de los 14 días del experimento. Tal y como se muestra, los ratones sometidos a reprogramación parcial perdieron menos peso en comparación con los ratones envejecidos control (**Figura 22B**), lo que junto con un menor tamaño del bazo (**Figura 22C**) sugiere una menor afectación asociada a la progresión tumoral. El análisis histológico (**Figura 22D**) reveló que los pulmones de todos los ratones del estudio habían desarrollado tumores. Sin embargo, el área afectada por el desarrollo tumoral, así como el tamaño individual de los tumores, es significativamente mayor en los ratones viejos que en los jóvenes, mientras que los ratones viejos parcialmente reprogramados tienen un menor desarrollo tumoral (**Figura 22E y 22F**).

Podemos concluir que en los ratones envejecidos la implantación y progresión de los tumores ocurre de una manera más acelerada. Al mismo tiempo, el proceso de reprogramación parcial reduce el crecimiento tumoral en el tejido pulmonar de ratones envejecidos, haciéndolo similar al observado en ratones jóvenes.

5.2.2 La reprogramación parcial reduce el crecimiento tumoral en la glándula mamaria

Antes de estudiar si la reprogramación parcial afecta a la progresión tumoral en la glándula mamaria, comprobamos que OSKM se expresase en la mama de ratones i4F-A de 2 años. Observamos que el tratamiento con doxiciclina indujo una activación significativa de OSKM (2D+), mientras que su retirada provocó nuevamente el silenciamiento del transgén (5D-) (**Figura 23A**). En este caso, al no estar afectando a un tejido tan vital como el pulmón, los animales no perdieron peso debido al desarrollo tumoral. Observamos un aumento de peso en los ratones jóvenes, mientras que en el caso de los ratones de 2 años el peso se mantiene (**Figura 23B**).

Al analizar el crecimiento tumoral en estos ratones, podemos ver cómo el volumen de los tumores de la mama de los ratones viejos es mayor que el de los ratones jóvenes, mientras que los ratones viejos reprogramados parcialmente (viejos + doxy) presentan un crecimiento tumoral mucho menor que los viejos control (**Figura 23C**). Realizamos también un seguimiento de la progresión tumoral mediante el análisis de la expresión de luciferasa con el IVIS (**Figura 23D**). De manera análoga a lo observado con las medidas de volumen, encontramos una mayor progresión tumoral en la glándula mamaria de ratones envejecidos que en jóvenes y que en viejos reprogramados parcialmente (**Figura 23E**). Además, tras el sacrificio de los ratones, la diferencia del tamaño tumoral se comprobó una última vez con el tumor ya extraído (**Figura 23F**), mostrando resultados similares a los de los anteriores análisis.

Estos resultados muestran cómo en los ratones envejecidos los tumores se implantan y desarrollan más rápidamente en el tejido mamario, lo que sugiere que la edad avanzada presenta un microambiente más favorable para la progresión tumoral. Estas condiciones favorables al crecimiento tumoral se revierten con la reprogramación parcial, lo que se traduce en la disminución del crecimiento tumoral en la glándula mamaria.

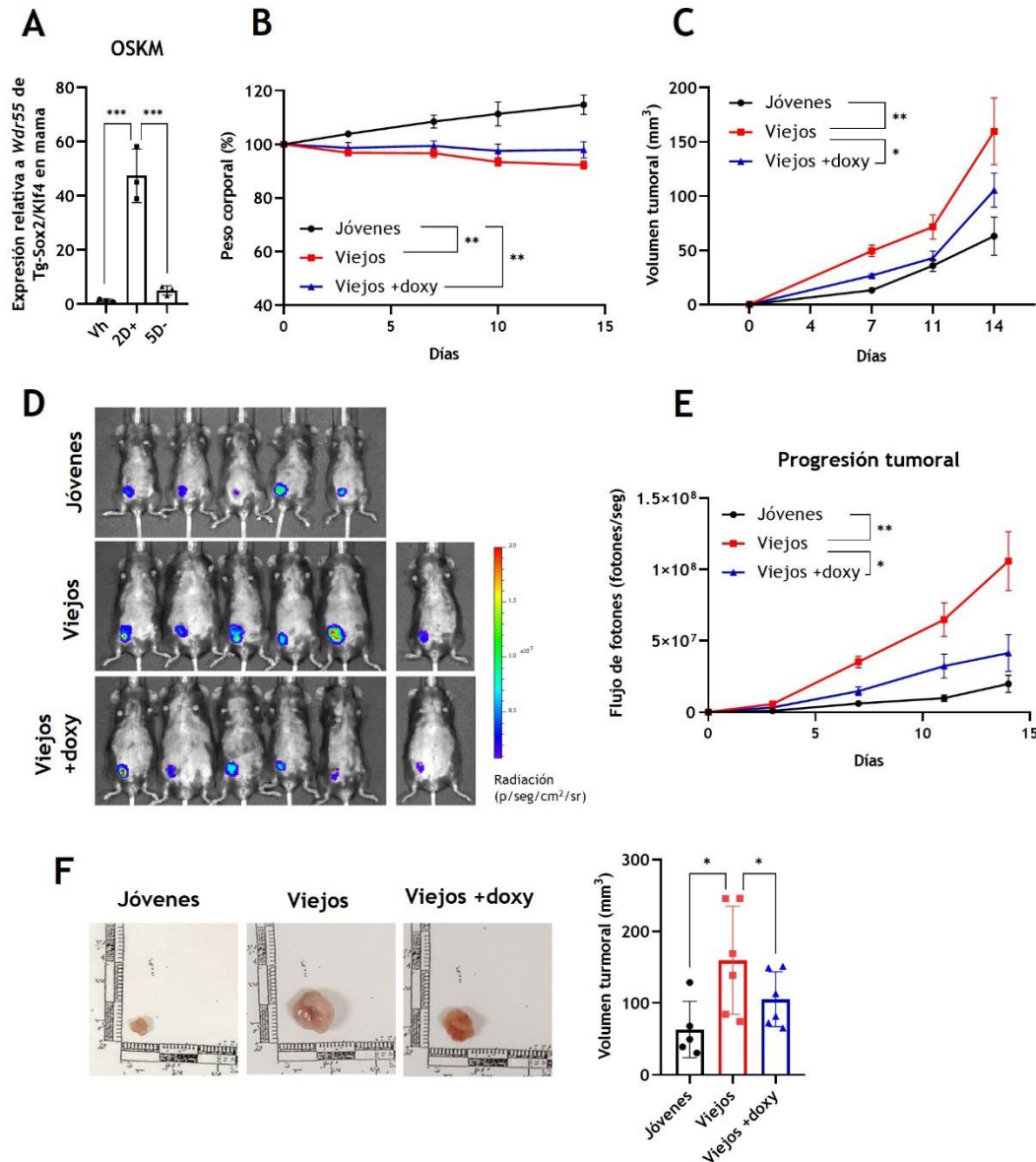


Figura 23. Reducción de progresión tumoral en la mama tras la reprogramación parcial. (A) Análisis de los niveles de ARNm en la glándula mamaria mediante qRT-PCR de *Tg-Sox2/Klf4*, relativo al gen constitutivo *Wdr55* (n=3). (B) Representación de la variación del peso corporal durante el experimento. (C) Progresión del volumen tumoral con el tiempo. (D) Imagen tomada con IVIS de todos los ratones de este experimento, en el último punto temporal, justo antes del sacrificio. (E) Cuantificación del volumen de fotones emitidos por los tumores. Escala de color: Min= $8,00e^5$, Max= $2,00e^7$. (F) Imágenes representativas de los tumores presentes en la mama y la cuantificación del volumen tumoral *ex vivo*. La significancia estadística se analizó mediante el test ANOVA con el test *post hoc* de Tukey. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (ns) no significativo. B-F (n=6).

5.2.3 La reprogramación parcial no revierte la inmunosenescencia

La inmunosenescencia es un proceso de disfunción del sistema inmunológico que ocurre con el envejecimiento y está estrechamente relacionada con el desarrollo tumoral (Lian et al., 2020). Por ello, nos preguntamos si el proceso de reprogramación parcial podría ser capaz de revertir la inmunosenescencia de los ratones envejecidos, reactivando el correcto funcionamiento del sistema inmunitario y así restringir el desarrollo tumoral. Para estudiar la infiltración de células del sistema inmunitario en los tumores evaluamos distintos marcadores de estas subpoblaciones (Cd11c, Nk1.1 y F4/80). El análisis por inmunohistoquímica no mostró una diferencia significativa entre los ratones viejos y viejos+doxy (**Figura 24**). También estudiamos otros marcadores de infiltración del sistema inmunitario en el tumor (Cd3e, Cd4, Cd8a, FoxP3 y Granzima B), que fueron evaluados por el patólogo y catedrático de histología Tomás García-Caballero, quien confirmó que no había diferencias significativas entre ambos grupos de ratones envejecidos. Posteriormente, en colaboración con el grupo de la Dra. María Mittelbrunn, analizamos las distintas poblaciones del sistema inmunitario presentes en la médula ósea de estos ratones (**Figura S2**). Sin embargo, no observamos grandes diferencias entre ratones viejos control y viejos parcialmente reprogramados.

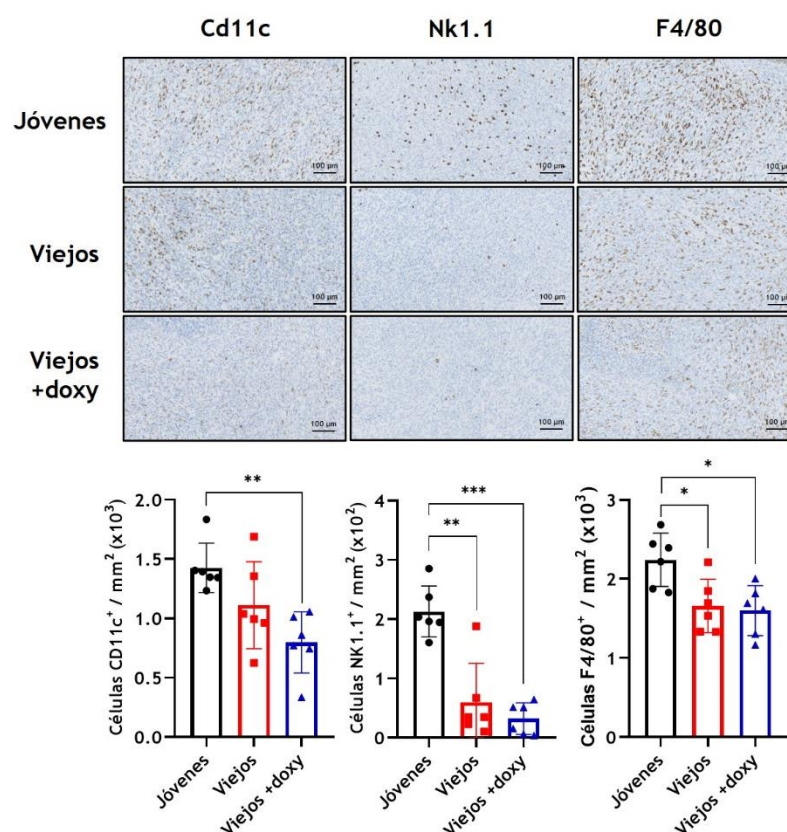


Figura 24. Análisis inmunohistoquímico de tumores de mama. Imágenes representativas de secciones tumorales analizadas mediante inmunohistoquímica para Cd11c, Nk1.1 y F4/80. La significancia estadística se analizó mediante el test ANOVA con el test *post hoc* de Tukey. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (ns) no significativo. (n=6)

5.3 EFECTO DE LA REPROGRAMACIÓN PARCIAL SOBRE LA OBESIDAD

Dado el efecto de la reprogramación parcial sobre la senescencia y progresión tumoral, también investigamos su posible impacto en la obesidad. El fenotipo obeso, caracterizado por un aumento en los depósitos de grasa visceral, es uno de los principales factores desencadenantes del síndrome metabólico, contribuyendo a la inflamación crónica y disfunción metabólica (Ellulu et al., 2017). La obesidad tiene un importante componente ambiental, como la dieta, pero también presenta una sólida base epigenética. Esta contribución epigenética podría suponer una potencial ventana terapéutica, ya que a través de la modificación de las marcas epigenéticas asociadas a la obesidad se podría alterar esta patología (Ling & Rönn, 2019).

Para estudiar el efecto de la reprogramación parcial en ratones obesos, hemos utilizado machos del modelo de ratón OSKM-*only*. Con este modelo y los cruces adecuados hemos generado ratones hermanos de camada que no expresan los factores de reprogramación a pesar del tratamiento con doxiciclina dado que portan el casete policistrónico OSKM, pero no el transactivador rtTA (a estos ratones nos referiremos como WT), y otros que sí expresan OSKM al tener ambas construcciones insertadas en su genoma (los denominaremos i4F). Tras 3 meses de dieta con un contenido graso del 60% (*very high fat diet*, vHFD) *ad libitum*, estos ratones se consideraron obesos. Una vez establecido el fenotipo obeso, tratamos con doxiciclina de manera cíclica para inducir la reprogramación parcial, por un total de 7 ciclos (**Figura 25A**). Como control, utilizamos animales de ambos genotipos, pero alimentados con una dieta estándar, por lo que no desarrollaron obesidad. A estos ratones les dimos el mismo tratamiento y realizamos las mismas pruebas que los grupos obesos, y no mostraron cambios significativos en ninguna de las pruebas realizadas (**Figura S3**). El análisis transcriptómico por ARN-seq de estos experimentos se realizó en colaboración con el grupo de la Dra. Elsa Logarinho del i3S de Oporto.

Antes de poder estudiar el efecto de la reprogramación parcial en estos ratones, comprobamos la expresión de OSKM en distintos tejidos de este modelo de ratón transgénico. Tal y como se muestra en la **Figura 25B**, en hígado, intestino y páncreas se detectó una expresión significativa de OSKM tras el pulso de doxiciclina (2D+), que fue silenciada tras 5 días sin el tratamiento (5D-). Es importante mencionar que, durante los 7 ciclos de doxiciclina, no se detectó una pérdida significativa de peso corporal (**Figura 25C**) y la ingesta de comida se mantuvo constante (**Figura 25D**), lo que nos indica que los animales no se vieron afectados negativamente por la expresión cíclica de los factores de reprogramación.

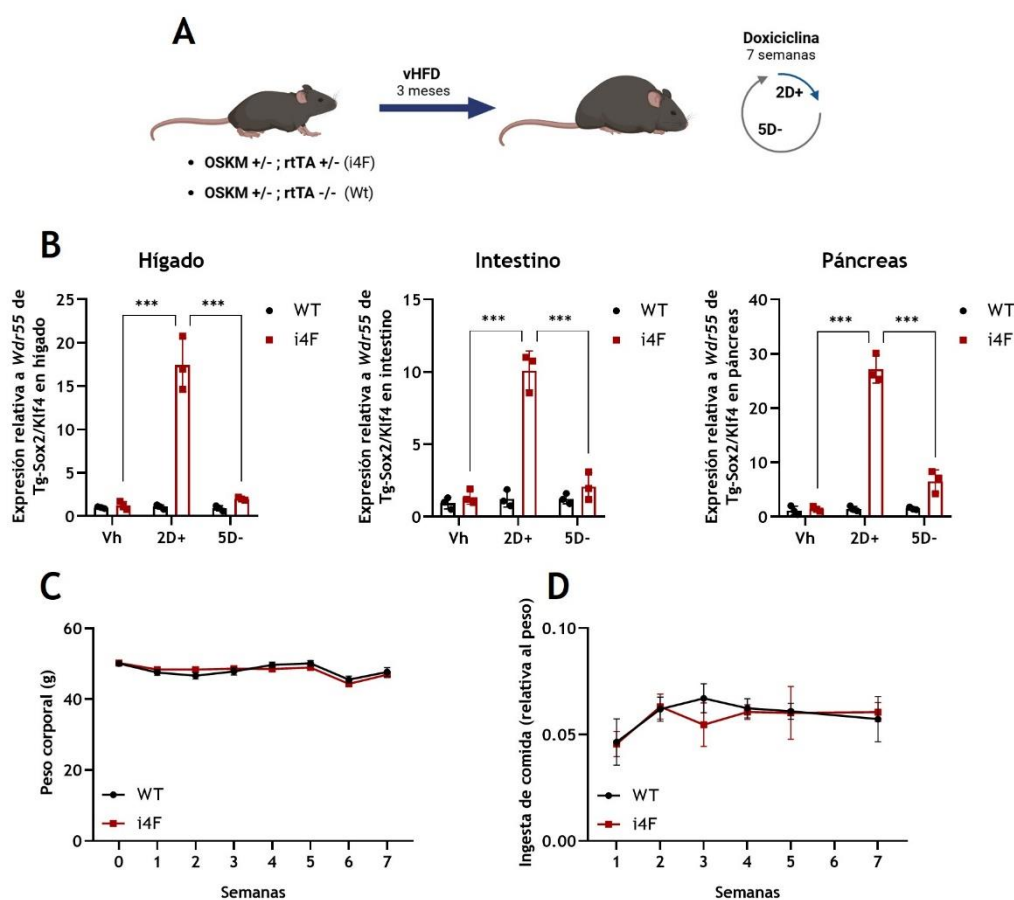


Figura 25. Reprogramación parcial de animales obesos. (A) Representación esquemática del experimento realizado con animales obesos. (B) Análisis de los niveles de ARNm de Tg-Sox2/Klf4 mediante qRT-PCR, en el hígado, intestino y páncreas (de izquierda a derecha), de ambos genotipos antes, durante y después del tratamiento con doxiciclina. La expresión se representa relativa al gen constitutivo *Wdr55* (n=3). (C) Representación de la variación del peso corporal durante el experimento (n=15). (D) Ingesta de comida durante el experimento, relativa al peso (n=15). La significancia estadística se analizó mediante el test ANOVA con el test *post hoc* de Tukey. (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001, (ns) no significativo.

5.3.1 Efecto de la reprogramación parcial sobre el perfil glucémico de ratones obesos

Tras la reprogramación parcial, se detectó en los ratones obesos i4F un nivel de glucosa en sangre periférica significativamente menor que en el grupo WT (**Figura 26A**). Los menores niveles de glucosa en sangre se asocian con una disminución en la cascada de señalización de la insulina (**Figura 26B**), como lo demuestra el análisis transcriptómico de hígado, lo que revela una regulación negativa de los genes de esta vía. Sin embargo, en la prueba de tolerancia a la insulina (ITT), no se observaron diferencias significativas (**Figura 26C**), lo que sugiere una mejora en la homeostasis glucémica pero sin alterar la respuesta a la insulina en los tejidos. No obstante, los ratones que expresaron OSKM de manera cíclica presentaron una menor área bajo la curva en la prueba de tolerancia a la glucosa (GTT), lo que indica una mayor capacidad para retirar la glucosa del torrente sanguíneo en los animales parcialmente reprogramados (**Figura 26D**).

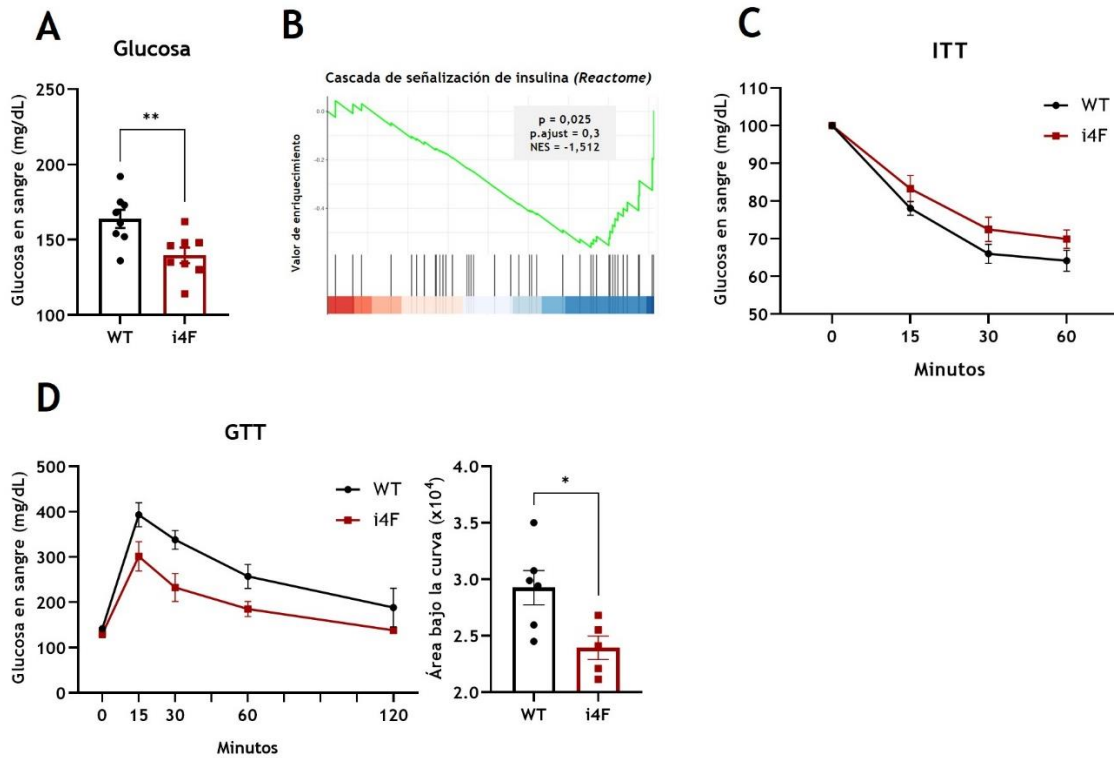


Figura 26. Perfil glucémico de ratones obesos tras la reprogramación parcial. (A) Medición de glucosa en sangre periférica de ratones obesos en ayunas (n=8). (B) GSEA de la cascada de señalización de la insulina. Se representa la expresión de este conjunto de genes de los ratones i4F frente a los WT. La base de datos usada fue *Reactome* (n=4). (C) Representación de la variación de los niveles de glucosa durante el test de tolerancia a la insulina (ITT) (n=15). (D) Representación de la variación de los niveles de glucosa durante el test de tolerancia a la glucosa (GTT), junto la cuantificación del AUC de cada ratón (n=6). La significancia estadística se analizó mediante el test t de student de dos colas. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (ns) no significativo. Los datos se representan como media \pm error estándar de la media (SEM).

Estos resultados indican una mejora en el perfil glucémico de los ratones obesos tras la reprogramación parcial, lo que sugiere una alteración en el fenotipo obeso de los ratones i4F, recuperando parcialmente la homeostasis de la glucosa.

5.3.2 La reprogramación parcial mejora la composición corporal y el perfil lipídico en ratones obesos

Al analizar la composición corporal de los ratones mediante resonancia electromagnética, observamos cómo los ratones obesos i4F presentaron una disminución significativa en el porcentaje de masa grasa (**Figura 27A**), acompañada de un aumento en el porcentaje de masa magra (**Figura 27B**). Posteriormente, el análisis transcriptómico de grasa blanca epididimal mediante ARN-seq mostró una clara tendencia hacia un aumento en la actividad del metabolismo lipídico. Aunque el análisis de enriquecimiento por GSEA del metabolismo de ácidos grasos no alcanzó la significancia estadística, el valor de enriquecimiento normalizado (*normalized enrichment score*, NES) reveló un aumento en el metabolismo lipídico (**Figura 27C**). Este resultado es consistente con la reducción observada histológicamente en el tamaño de los adipocitos de la grasa blanca subcutánea (WAT SC) y de la grasa blanca epididimal (WAT EP) (**Figura 27D** y **Figura 27E**). Por otra parte, los ratones i4F mostraron una reducción significativa de los niveles de colesterol tras 3 ciclos de reprogramación, aunque estos cambios perdieron significancia estadística a partir de ese momento y mostraron solo una tendencia a la baja (**Figura 27F**).

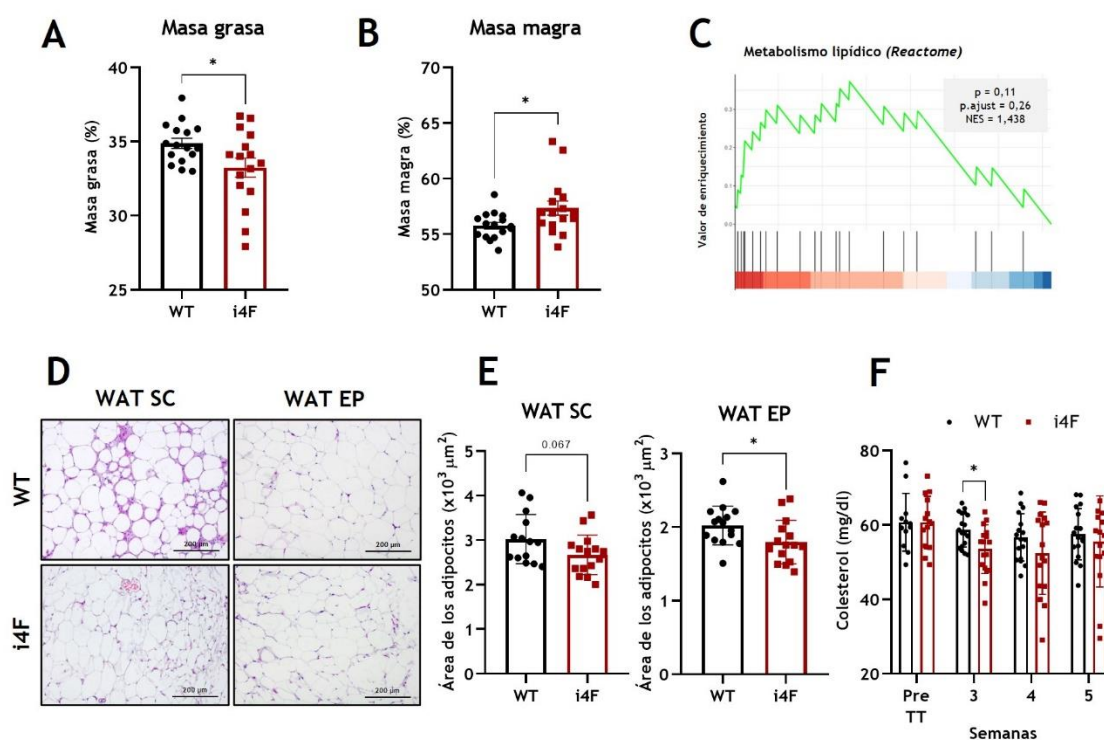


Figura 27. Perfil lipídico de ratones obesos tras la reprogramación parcial. (A) Representación del porcentaje de masa grasa respecto al peso corporal total (n=15). (B) Representación del porcentaje de masa magra respecto al peso corporal total (n=15). (C) GSEA del metabolismo lipídico. Se representa la expresión de este conjunto de genes de los ratones i4F frente a los WT. La base de datos usada fue *Reactome* (n=4). (D) Imágenes representativas de secciones de WAT SC y WAT EP, teñidas con H/E. (E) Cuantificación del área de los adipocitos de las secciones de WAT SC y WAT EP. Se representa el promedio del área de los adipocitos de cada sección y un total de 3 secciones por ratón (n=5). (F) Medición de los niveles de colesterol presentes en sangre periférica (n=15). La significancia estadística se analizó mediante el test t de student de dos colas. (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001, (ns) no significativo. Los datos se representan como media ± SEM.

En resumen, estos resultados muestran que la reprogramación parcial induce una mejora en la composición corporal y perfil lipídico de animales obesos, al reducir el volumen de los adipocitos del tejido adiposo blanco subcutáneo y epididimal, lo que reduce el porcentaje de masa grasa.

5.3.3 Efecto de la expresión de OSKM en la acumulación lipídica en adipocitos *in vitro*

Quisimos comprobar si podíamos reproducir en adipocitos *in vitro* el efecto observado de la expresión de OSKM sobre la acumulación lipídica. Para ello, utilizamos la línea celular C3H10, que diferenciamos en adipocitos. Una vez finalizado el proceso de diferenciación transducimos lentiviralmente con rtTA+OSKM o rtTA+GFP como control (**Figura S4**), tras lo que tratamos con ácido oleico durante 48 horas para promover la acumulación de ácidos grasos. Finalizado el tratamiento, se añadió doxiciclina (1 µg/mL) para inducir la expresión de OSKM. Como se puede observar, tras 4, 7 y 10 días de expresión de los factores de reprogramación se produce una reducción significativa en la acumulación de ácidos grasos en adipocitos *in vitro* (**Figura 28**), reproduciendo lo observado *in vivo* en el tejido adiposo blanco y epididimal.

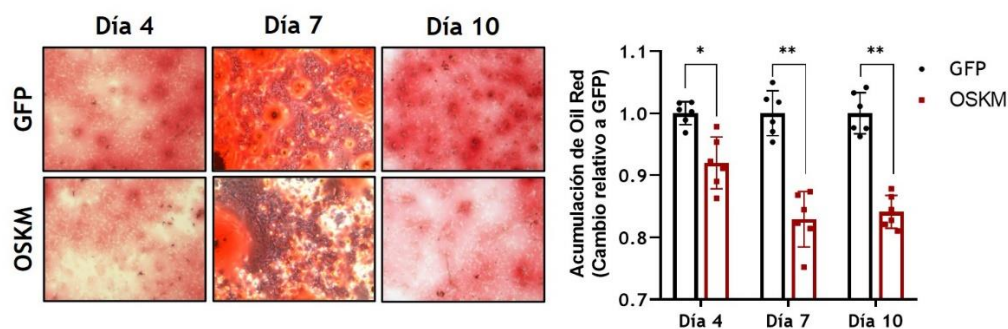


Figura 28. Acumulación lipídica de adipocitos *in vitro*. Imágenes representativas de los adipocitos teñidos con *Oil Red O* tras 4, 7 y 10 días de expresión de OSKM, junto con su cuantificación. La significancia estadística se analizó mediante el test t de student de dos colas. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (ns) no significativo. (n=3)

5.3.4 Disminución de la activación inmunitaria y de la inflamación tras la reprogramación parcial

Dados los efectos metabólicos e histológicos observados, también comprobamos el impacto de la expresión cíclica de OSKM sobre la respuesta inmunitaria e inflamatoria en el tejido adiposo de ratones obesos. Para ello, analizamos mediante inmunohistoquímica la infiltración de células del sistema inmunitario en el tejido graso subcutáneo y epididimal. De manera general, evaluamos la infiltración inmunitaria usando el marcador Cd45 (**Figura 29A**) y, más específicamente, la presencia de macrófagos, usando el marcador F4/80 (**Figura 29B**). Ambos análisis mostraron una menor infiltración de células del sistema inmunitario en el tejido adiposo blanco (subcutáneo y epididimal) de los ratones obesos tras la reprogramación parcial. Posteriormente, el análisis transcriptómico del tejido graso mediante ARN-seq corroboró una menor activación del sistema inmunitario, la reducción de la migración leucocitaria y una disminución de la respuesta inflamatoria en este tejido (**Figura 29C**) de animales i4F, lo que respalda nuestros resultados inmunohistoquímicos.

En resumen, estos resultados indican que la expresión cíclica de OSKM reduce significativamente la infiltración de células del sistema inmunitario en el tejido adiposo blanco, lo que se correlaciona con una menor activación del sistema inmunitario y una respuesta inflamatoria reducida, lo que sugiere una modulación del microambiente inflamatorio en los ratones obesos.

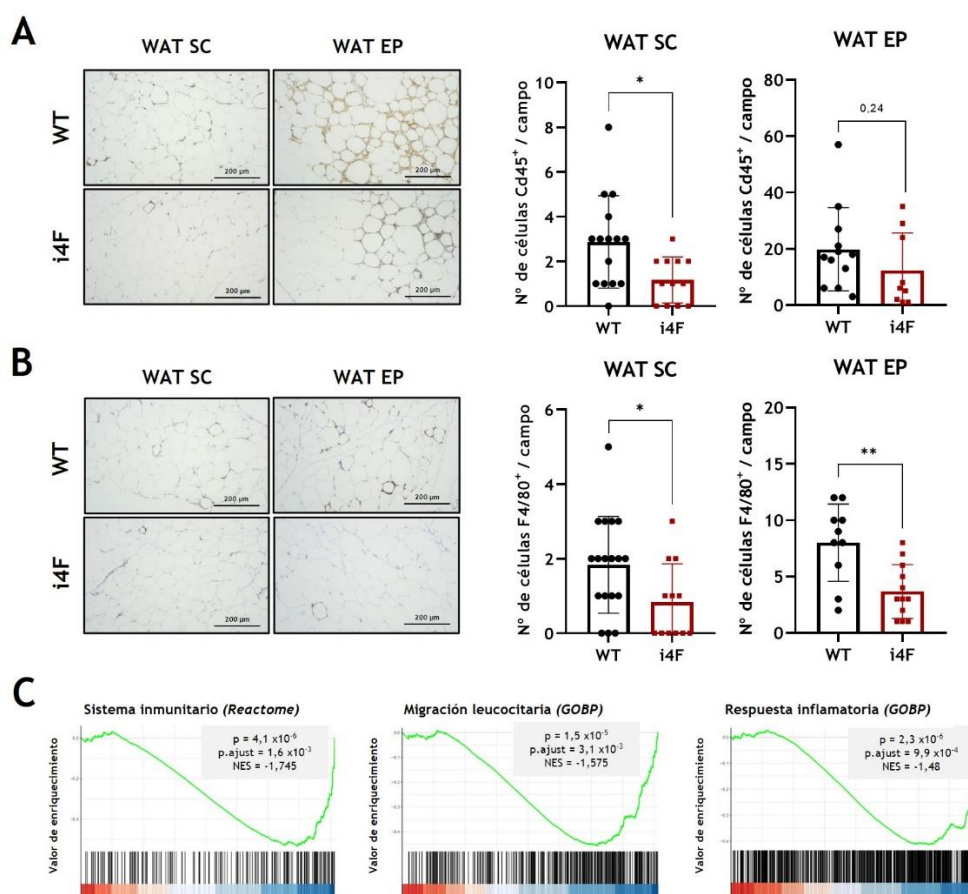


Figura 29. Infiltración del sistema inmunitario en tejido graso. (A) Imágenes representativas de secciones de WAT SC y WAT EP teñidas mediante inmunohistoquímica contra células Cd45 positivas, junto con su cuantificación. (B) Imágenes representativas de secciones de WAT SC y WAT EP teñidas mediante inmunohistoquímica contra células F4/80 positivas, junto con su cuantificación. (C) GSEA del conjunto de genes relacionados con el sistema inmunitario, la migración leucocitaria y respuesta inflamatoria, de los ratones i4F frente a los WT. Las bases de datos usadas fueron *Reactome* y *GOBP*. La significancia estadística se analizó mediante el test t de student de dos colas. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (ns) no significativo. Los datos se representan como media \pm SEM. (n=5)

5.3.5 Efecto de la reprogramación parcial sobre la termogénesis

Para estudiar la termogénesis, utilizamos una cámara térmica para medir la temperatura en la región interescapular de los ratones, donde se localiza principalmente la grasa parda (tejido especializado en la termogénesis). Como se puede apreciar, los ratones i4F presentaron una mayor actividad termogénica que el control WT (**Figura 30A**). Esto se correlaciona con el aumento en la temperatura general del ratón, analizada por sonda rectal, que se observa en los i4F (**Figura 30B**). Para corroborar el aumento en la termogénesis estudiamos mediante inmunohistoquímica la grasa parda de estos ratones. En este tejido evaluamos la expresión de la proteína marcadora de termogénesis *Ucp1*, que es consistente con el claro aumento de la termogénesis en ratones obesos que expresaron OSKM (**Figura 30C**). Esto se correlaciona con la reducción observada en el tamaño de los adipocitos de la grasa parda de los ratones parcialmente reprogramados (**Figura 30D**), dado que durante la termogénesis los ácidos grasos almacenados en estos adipocitos son oxidados para generar energía en forma de calor, lo que reduce el tamaño de los adipocitos.

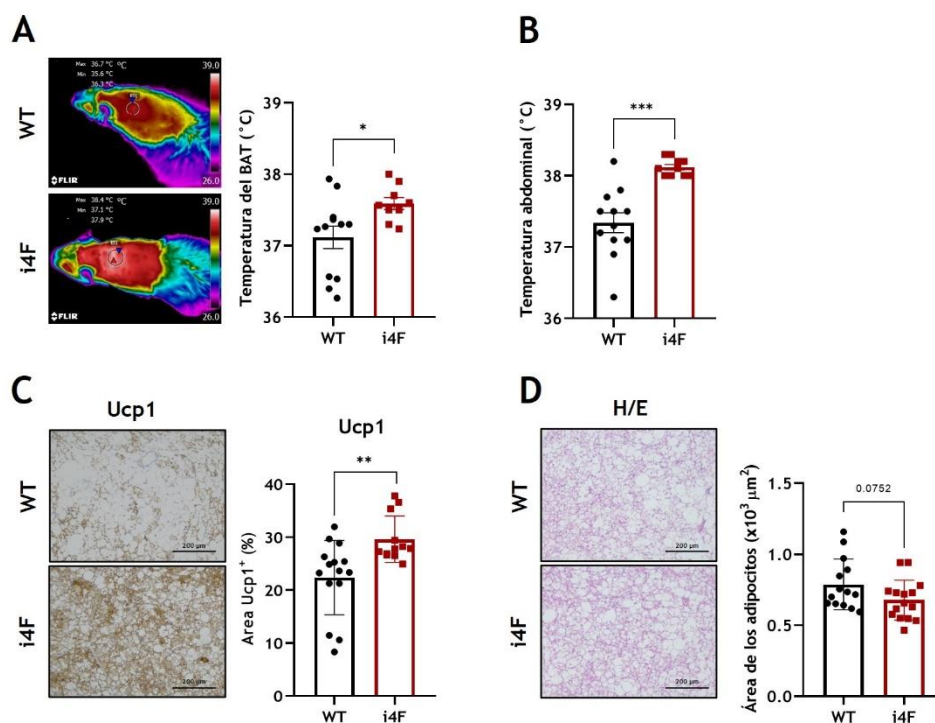


Figura 30. Termogénesis de ratones obesos tras la reprogramación parcial. (A) Imágenes representativas de las medidas de temperatura del BAT de los ratones, tomadas con cámara térmica (n=12). (B) Medida de temperatura abdominal de los ratones tomada con sonda rectal (n=12). (C) Imágenes representativas de secciones de BAT teñidas mediante inmunohistoquímica contra Ucp1, junto con la cuantificación del área positiva. (D) Imágenes representativas de secciones de BAT teñidas con H/E, con la cuantificación del área de los adipocitos. (En C y D se cuantificaron 3 secciones por ratón, n=5). La significancia estadística se analizó mediante el test t de student de dos colas. (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001, (ns) no significativo. Los datos se representan como media ± SEM.

Estos resultados demuestran un incremento en la termogénesis en los ratones obesos parcialmente reprogramados, lo que afecta a la temperatura general del animal.

5.3.6 La reprogramación parcial aumenta el metabolismo lipídico en el hígado de animales obesos

Posteriormente analizamos la acumulación lipídica en el hígado midiendo la presencia de ácidos grasos en secciones histológicas teñidas con *Oil Red O*, un colorante liposoluble que permite el marcaje específico de lípidos. Nuestros resultados revelaron una disminución significativa en la acumulación lipídica en el hígado de los ratones i4F (**Figura 31A**). Estos resultados se ven respaldados por el análisis transcriptómico mediante ARN-seq, que mostró un enriquecimiento positivo en la expresión de los genes relacionados con el metabolismo lipídico en los ratones i4F (**Figura 31B**). Además, el análisis de componentes principales (PCA) del transcriptoma hepático mostró una clara separación entre los grupos WT e i4F, lo que indica diferencias generales en los perfiles de expresión génica entre ambos grupos de ratones (**Figura 31C**).

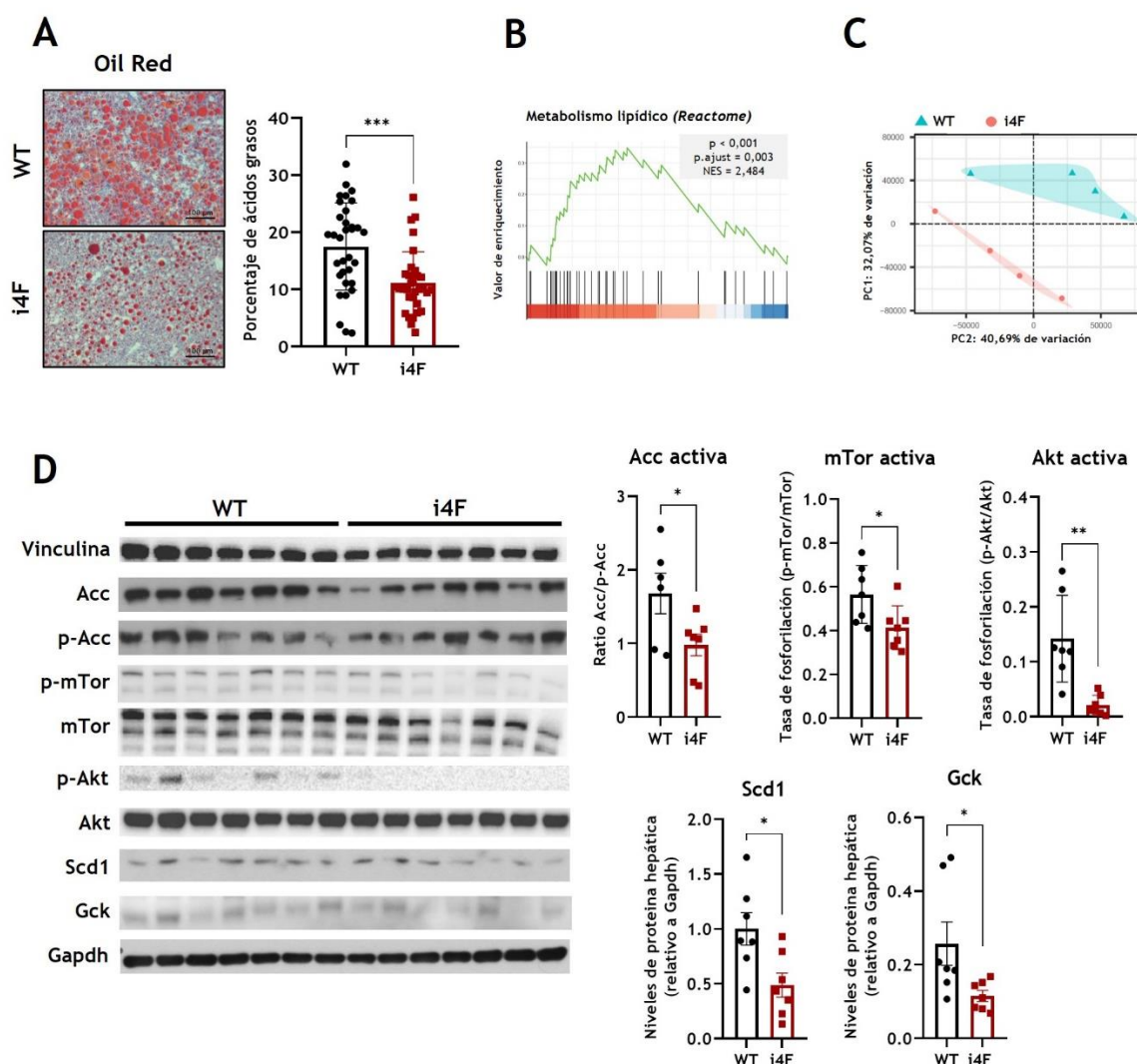


Figura 31. Análisis del metabolismo lipídico hepático. (A) Imágenes representativas de la tinción con *Oil Red O* de hígados de ratones obesos, junto con su cuantificación. Se cuantificaron 3 secciones por cada ratón ($n=10$). (B) GSEA del metabolismo lipídico. Se representa la expresión de este conjunto de genes de los ratones i4F frente a los WT. La base de datos usada fue *Reactome* ($n=4$). (C) Representación del análisis de componentes principales del transcriptoma hepático ($n=4$). (D) Análisis de los niveles proteicos mediante *Western blot* de Acc, p-Acc, p-mTor, mTor, p-Akt, Akt, Scd1 y Gck, con Vinculina y GAPDH como control de carga. Se representan a la derecha las cuantificaciones de estas proteínas ($n=7$). La significancia estadística se analizó mediante el test t de student de dos colas. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (ns) no significativo. Los datos se representan como media \pm SEM.

Posteriormente analizamos mediante *Western blot* distintas proteínas relacionadas con vías lipogénicas en el hígado. La menor activación de las proteínas Acc, mTor y Akt, y la menor presencia de las proteínas Scd1 y Gck en los ratones i4F (**Figura 31D** y **Figura S5**), se relacionan directamente con la disminución de la síntesis lipídica hepática, lo que concuerda con la menor acumulación de lípidos observada en el hígado.

5.3.7 Efecto de la expresión de OSKM en la acumulación lipídica en hepatocitos *in vitro*

Finalmente, decidimos comprobar si podíamos reproducir *in vitro* el efecto observado de la expresión de OSKM sobre la acumulación lipídica en hepatocitos. Para ello, utilizamos hepatocitos primarios, extraídos del hígado de ratones con el genotipo WT e i4F. De esta manera, con el tratamiento con doxiciclina (1 µg/mL), se induce únicamente la expresión de OSKM en los hepatocitos derivados de los ratones i4F. Para promover la acumulación lipídica, tratamos a los hepatocitos con ácido oleico (A.O.). Durante este tratamiento, o después del mismo, administramos doxiciclina para inducir la expresión de OSKM. Como se observa, la acumulación lipídica disminuyó en los hepatocitos i4F tras la expresión de los factores de reprogramación (**Figura 32**). Además, estos resultados se reproducen con distintos protocolos de tratamiento y expresión de los factores OSKM.

Los resultados *in vitro* muestran que OSKM reduce la acumulación de lípidos en hepatocitos, lo que respalda los resultados transcriptómicos, proteómicos e histológicos obtenidos *in vivo* previamente.

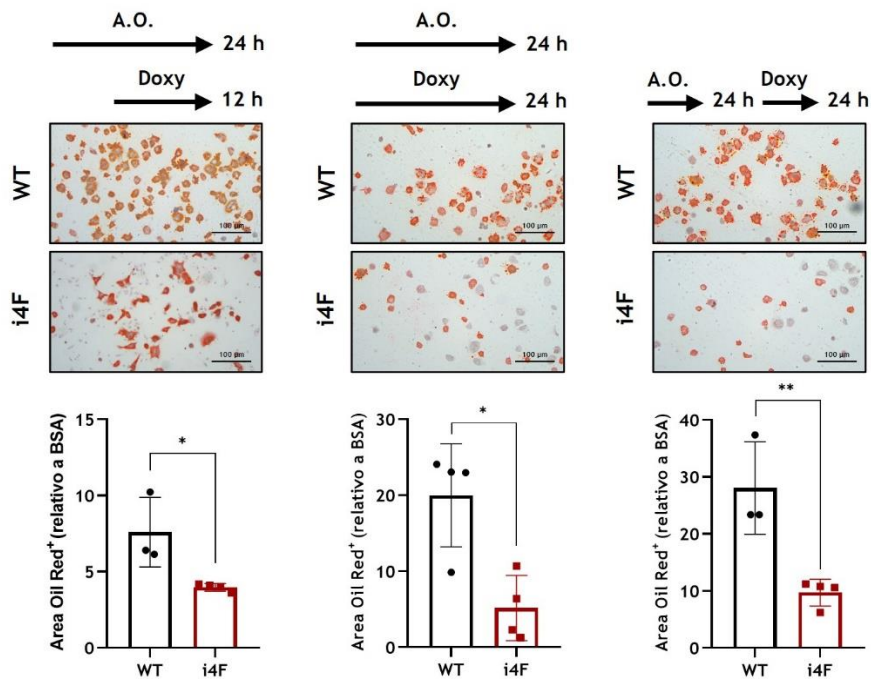


Figura 32 . Acumulación lipídica de hepatocitos *in vitro*. Imágenes representativas de los adipocitos teñidos con *Oil Red O* tras distintas pautas de tratamiento, junto con su cuantificación. La significancia estadística se analizó mediante el test t de student de dos colas. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (ns) no significativo (n=4).

6 DISCUSIÓN

La reprogramación celular es un proceso mediante el que una célula somática puede desdiferenciarse en una célula madre pluripotente inducida (iPSC). Este proceso da lugar a cambios importantes en la expresión génica y en la estructura epigenética de la célula, que promueven la pérdida de la identidad celular original. La reprogramación puede inducirse mediante la expresión de los factores de transcripción OSKM (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc) (Takahashi & Yamanaka, 2006).

Sin embargo, durante la reprogramación parcial las células no llegan a desdiferenciarse en iPSC, por lo que mantienen su identidad y función celular mientras que recuperan un patrón de expresión génica y un paisaje epigenético propio de un fenotipo más joven (Olova et al., 2019). La reprogramación parcial ha surgido como una nueva estrategia terapéutica en distintos contextos patológicos, especialmente sobre los que tienen un componente epigenético (Paine et al., 2024).

6.1 EFECTO SENOMÓRFICO DE LA REPROGRAMACIÓN PARCIAL

La senescencia celular es un proceso en el que las células dejan de dividirse, desencadenado como mecanismo de defensa ante situaciones de estrés o daño, como el daño en el ADN o el estrés oxidativo (Gorgoulis et al., 2019). Esto evita la proliferación de células potencialmente dañinas, lo que supone una barrera en el desarrollo tumoral. Sin embargo, la acumulación progresiva de células senescentes favorece el proceso de envejecimiento al promover una inflamación crónica en el tejido debido al fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP), promoviendo distintas patologías asociadas con la edad (B. Wang et al., 2024).

La senescencia celular tiene una importante base epigenética, que regula de manera compleja la secreción de los factores proinflamatorios del SASP (Dasgupta et al., 2024). Dada la importancia de las modificaciones epigenéticas en el desarrollo de la senescencia, así como la interacción entre el epigenoma y el secretoma, decidimos estudiar si la reprogramación celular parcial, genética o química, podría influir en el fenotipo senescente. Aunque se ha descrito que la reprogramación parcial tiene un efecto rejuvenecedor en células envejecidas al promover un cambio epigenético previo a la pérdida de la identidad somática (Lapasset et al., 2011; Olova et al., 2019; Simpson et al., 2021), existen diferencias clave entre el fenotipo envejecido y senescente.

Para estudiar el efecto de la reprogramación sobre el fenotipo senescente, indujimos la senescencia por irradiación (10 Gy) en MEFs (**Figura 12**), tras lo que promovimos la expresión de OSKM o tratamos con RepSox y TCP (2c). Pudimos observar que ni la reprogramación parcial genética ni química fueron capaces de rescatar la parada del ciclo celular característica de la senescencia (**Figura 13**). Sin embargo, tanto la expresión de OSKM como el tratamiento con 2c, indujeron una modulación transcriptómica respecto al control senescente, que sugiere una reversión parcial de la expresión génica propia de la senescencia (**Figura 14**). Al analizar en detalle marcadores específicamente relacionados con la senescencia, observamos una reversión parcial transcripcional y proteica tras ambos tratamientos. Asimismo, tras la

expresión de OSKM y el tratamiento con 2c pudimos observar una reducción del tamaño celular y nuclear propios de la senescencia (**Figura 15**).

Tras observar que los tratamientos inducen una reversión parcial del fenotipo senescente, estudiamos la secreción de distintos factores proinflamatorios. Al evaluar esto, detectamos un aumento en los factores del SASP secretados por las células senescentes, cuya concentración disminuyó tras la expresión de OSKM o el tratamiento con 2c (**Figura 15**). Durante el desarrollo de esta tesis, se publicó un estudio en el que se demuestran resultados similares a los nuestros, mostrando que la reprogramación mediada por OSK reduce el SASP en células senescentes (Sahu et al., 2024). Estos investigadores utilizaron un sistema de expresión de OSK bajo el promotor de *Cdkn2a*, restringiendo su actividad a células senescentes, lo que se asoció con un aumento en la supervivencia de los ratones (Sahu et al., 2024). En conjunto, sus resultados y los nuestros refuerzan la hipótesis de que la reprogramación parcial es un mecanismo efectivo para atenuar el fenotipo secretor asociado a la senescencia celular, independientemente del método empleado para inducirla. Del mismo modo, otro estudio reciente destacó que la reprogramación parcial química de células envejecidas (que no senescentes) es capaz de rejuvenecer estas células, al observar cambios en la expresión génica y la secreción de factores proinflamatorios (Mitchell et al., 2024), lo que concuerda con los resultados que hemos obtenido al tratar células senescentes con 2c.

En vista de estos resultados, decidimos analizar el efecto funcional que podía tener la reducción en la secreción del SASP. Los factores del SASP promueven la senescencia de manera paracrina, pudiendo incluso inducir daño en el ADN (Nelson et al., 2018). Al evaluar la capacidad de promover senescencia paracrina por parte de las células senescentes control observamos un incremento de los niveles de SA- β -Gal así como de distintas modificaciones morfológicas y de expresión de marcadores típicos del fenotipo senescente, acompañado de un aumento de daño en el ADN. Sin embargo, las células senescentes que habían expresado OSKM o habían sido tratadas con 2c, presentaban una menor capacidad para promover la senescencia paracrina, lo que confirma un efecto funcional de la modulación del secretoma por parte de ambos tratamientos durante la senescencia (**Figura 16**).

Por otra parte, la secreción de estos factores proinflamatorios está íntimamente relacionada con la inflamación crónica y el reclutamiento de células del sistema inmunitario, como los macrófagos (Behmoaras & Gil, 2021). En nuestros resultados observamos una mayor tasa de migración de los macrófagos co-cultivados con células senescentes. Sin embargo, este aumento se ve reducido al co-cultivar los macrófagos con células senescentes que habían expresado OSKM o que habían sido tratadas con 2c. Este resultado muestra cómo la reducción del secretoma senescente por parte de la reprogramación parcial genética y química tiene un efecto funcional sobre la activación del sistema inmunitario (**Figura 17**).

Otra actividad descrita para el SASP es su efecto potenciador de la reprogramación celular, tanto *in vitro* como *in vivo* (Mosteiro et al., 2016). Dado que la reprogramación celular se ve favorecida por distintos componentes del fenotipo secretor de las células senescentes, decidimos estudiar si el efecto modulador de OSKM y 2c sobre el SASP podría repercutir sobre el proceso de reprogramación. Al evaluar esto *in vitro*, comprobamos cómo se da una mayor tasa de formación de colonias en aquellas condiciones tratadas con el medio condicionado de las células senescentes control, mientras que aquellas que habían sido tratadas con el medio condicionado de las células senescentes OSKM o 2c, presentaron una tasa de formación de

colonias similar a las del control proliferativo (**Figura 18**). Asimismo, evaluamos también *in vivo* de manera indirecta el aumento de la eficiencia de reprogramación por el SASP. Dado que la reprogramación *in vivo* conlleva la formación de teratomas y la muerte del organismo (Abad et al., 2013), tomamos la tasa de supervivencia como medida indirecta de reprogramación. En este contexto, pudimos observar cómo los medios condicionados senescentes control favorecían significativamente el proceso de reprogramación, lo que disminuyó la supervivencia de estos animales. En cambio, aquellos animales que fueron inyectados con los medios condicionados OSKM y 2c mostraron un retraso en la mortalidad, lo que demuestra una menor eficiencia de reprogramación (**Figura 19**).

Estos resultados demuestran que la reducción en la secreción de factores del SASP mediado por OSKM y 2c tiene un efecto funcional, disminuyendo la inducción de senescencia paracrina, la captación de macrófagos y la eficiencia de reprogramación. Estos cambios observados en el secretoma de las células senescentes tras OSKM o 2c podrían relacionarse con una alteración en la regulación epigenética debida a los tratamientos, ya que la producción del SASP está regulada de manera muy compleja por parte del epigenoma (Dasgupta et al., 2024).

Dados el efecto de OSKM y 2c sobre el SASP, decidimos estudiar el fenotipo mitocondrial, ya que durante la senescencia las células presentan alteraciones en la función mitocondrial que contribuyen al fenotipo proinflamatorio mediante la activación de NF- κ B, cGAS/STING y RIG-I/MDA5 (López-Polo et al., 2024; Miwa et al., 2022; Victorelli et al., 2023; Wiley et al., 2016).

Las células senescentes se caracterizan por presentar una masa mitocondrial aumentada en respuesta a una pérdida en la función mitocondrial, que se ve reflejada en la reducción del potencial de membrana. Esto conlleva la acumulación de mitocondrias disfuncionales, lo que favorece la producción de ROS (Miwa et al., 2022). Mediante el empleo de sondas fluorescentes pudimos detectar cómo, tras la expresión de OSKM o el tratamiento con 2c, la masa mitocondrial de las células senescentes se ve reducida. Al analizar el potencial de membrana a través de la sonda TMRM, detectamos que la disminución de estos niveles se ve enmascarada por el aumento de la masa mitocondrial. Sin embargo, al normalizar el potencial de membrana a la masa mitocondrial, podemos observar cómo hay una disminución de este ratio durante la senescencia, que se ve restaurado tras la reprogramación parcial genética y química. Por otra parte, la disfunción mitocondrial tiene un gran impacto en la producción de energía. El aumento en la masa mitocondrial refleja un mayor consumo de oxígeno por parte de la célula senescente (Korolchuk et al., 2017). La reducción de la masa mitocondrial tras ambos tratamientos justifica la reducción observada en el consumo de oxígeno de las células senescentes tras OSKM y 2c (**Figura 20**).

Además, las células senescentes presentan una reducción significativa en la capacidad para producir ATP mediante la fosforilación oxidativa. Esta deficiencia energética se ve compensada a través del aumento de la glucólisis, lo que implica un incremento en la acidificación extracelular (Korolchuk et al., 2017). Nuestros resultados demostraron que los niveles de ATP mitocondrial, disminuidos durante la senescencia, se ven restaurados tras la expresión de OSKM y tras el tratamiento con 2c. Asimismo, el incremento en la acidificación extracelular propio de las células senescentes se ve corregido también tras la reprogramación parcial genética y química. Estos datos, junto con la reducción de la acumulación de ROS observada en las células senescentes tras OSKM y 2c, demuestran que la disfunción mitocondrial típica de la senescencia se está restaurando parcialmente con ambos tratamientos (**Figura 20**).

Nuestros resultados se ven reforzados por las observaciones de Mitchell et al. (2024), quienes observaron también una recuperación parcial en la función mitocondrial de células envejecidas tratadas con 2c y 7c.

En resumen, nuestros datos revelan que la expresión de OSKM y el tratamiento con 2c poseen un efecto senomórfico, modulando el fenotipo senescente sin inducir la proliferación celular. Por otra parte, se ha descrito ampliamente que la función mitocondrial y el SASP están estrechamente relacionados (Birch & Passos, 2017). Mecanísticamente, la recuperación parcial de la función mitocondrial mediante la expresión de OSKM y el tratamiento con 2c en células senescentes justifica la reducción en la secreción de factores proinflamatorios del SASP, con un impacto funcional en distintos contextos.

6.2 REDUCCIÓN DEL DESARROLLO TUMORAL MEDIANTE LA REPROGRAMACIÓN PARCIAL

El envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo tumoral (Hanahan & Weinberg, 2000). El ambiente proinflamatorio de los tejidos envejecidos, que resulta de la acumulación de células senescentes, acompañado de la inmunosenescencia típica de la vejez, propicia el desarrollo tumoral (Mittelbrunn & Kroemer, 2021; Muñoz-Espín & Serrano, 2014). Tal y como se ha mostrado previamente, la secreción de factores proinflamatorios por parte de las células senescentes se ve reducida tras un proceso de reprogramación parcial. Además, se ha descrito que la reprogramación parcial promueve el rejuvenecimiento de distintos tejidos de los organismos envejecidos (Ocampo et al., 2016). Por todo esto, decidimos estudiar si la reprogramación parcial podría afectar a la implantación y la progresión tumoral en organismos viejos a través del rejuvenecimiento de los tejidos.

Para estudiar si la reprogramación parcial podría afectar al desarrollo tumoral en pulmón y en la glándula mamaria, expusimos a ratones i4F-A de 2 años de edad a 4 ciclos de reprogramación parcial: 2 días expresando OSKM y 5 días sin la expresión. De esta manera se evita la reprogramación completa, lo que previene la formación de teratomas (**Figura 21**).

En primer lugar, estudiamos si la reprogramación parcial podría afectar al desarrollo tumoral en pulmón. Para ello, tras los 4 ciclos de reprogramación parcial, inyectamos en vena de cola de ratones macho i4F-A la línea celular de adenocarcinoma pulmonar L1475. Pudimos observar cómo los ratones, al estar afectando a un tejido tan sumamente vital como el pulmón, presentaron una pérdida de peso según avanzaba el desarrollo tumoral. Sin embargo, los ratones envejecidos parcialmente reprogramados (viejos + doxy) presentaron una pérdida de peso significativamente menor que los viejos control. Asimismo, el crecimiento de tumores en un animal puede conducir al incremento del tamaño del bazo (esplenomegalia), lo que se ha interpretado como una respuesta inmunológica del organismo al tumor (Gorelik et al., 1978; Mackay, 1965). Por ello, la esplenomegalia observada en los ratones viejos control, no presente en el grupo viejo + doxy, sugiere un menor desarrollo tumoral. Al analizar el crecimiento tumoral mediante histología, encontramos que los ratones viejos presentan unos pulmones mucho más afectados por tumores que los del grupo viejo + doxy. Asimismo, el tamaño individual de los tumores, más pequeño en los ratones parcialmente reprogramados, corroboran un menor desarrollo tumoral. Estos datos demuestran que la expresión cíclica de OSKM en animales envejecidos es capaz de remodelar el organismo, haciendo que presenten un microambiente menos favorable para el crecimiento tumoral (**Figura 22**).

En segundo lugar, para estudiar si la reprogramación parcial podía afectar al desarrollo tumoral en la mama, utilizamos el mismo sistema de expresión cíclica de OSKM. Una vez terminado el tratamiento, inyectamos la línea de carcinoma mamario B6BC-Luc (Perez-Lanzon et al., 2024) en la mama de ratones i4F-A. En este caso, dado que el desarrollo del tumor en la glándula mamaria no compromete de manera inmediata la vida del organismo, no se observó una reducción en el peso de los animales envejecidos, mientras que los animales jóvenes continuaron aumentando de peso. Al estudiar el crecimiento tumoral durante todo el experimento, observamos cómo en los ratones viejos se produjo un desarrollo mucho más acelerado que en los ratones jóvenes, lo que demuestra que el desarrollo del tumor en la glándula mamaria se ve favorecido por la edad. Sin embargo, con el proceso de reprogramación parcial previo a la implantación tumoral, observamos una menor progresión tumoral en los ratones viejos + doxy que en los ratones viejos, tal y como se ha comprobado a través del seguimiento tanto volumétrico como por IVIS. Estos datos apuntan a que, con la reprogramación parcial, se propicia la remodelación tisular necesaria para reducir parcialmente el efecto potenciador de los tejidos envejecidos sobre el desarrollo tumoral (**Figura 23**). Sin embargo, no fuimos capaces de observar la restauración del sistema inmunitario en los tumores de animales envejecidos tras la reprogramación parcial, por lo que no podemos argumentar una mejora en la inmunosenescencia que justifique la menor progresión tumoral en los ratones viejos parcialmente reprogramados (**Figura 24 y S2**).

Por otra parte, dado que la expresión de OSKM en este modelo de ratón es ubicua, no podemos discernir si la limitación de la progresión tumoral observada en mama y pulmón tras la reprogramación parcial en animales envejecidos se debe a un efecto de OSKM específico en estos tejidos o a efectos sistémicos.

Con todo, estos resultados demuestran que la reprogramación parcial en ratones de 2 años es suficiente para remodelar distintos tejidos envejecidos, haciéndolos menos susceptibles al desarrollo tumoral. Esto podría deberse a la reducción de la secreción de factores del SASP por parte de las células senescentes, típicamente acumuladas en tejidos envejecidos. Este efecto senomórfico por parte de OSKM podría estar reduciendo la inflamación crónica del tejido, afectando así a la implantación del tumor en distintos tejidos.

6.3 EFECTO DE LA REPROGRAMACIÓN PARCIAL SOBRE EL FENOTIPO OBESO

La obesidad es una patología compleja y multifactorial asociada a múltiples comorbilidades, con una alta prevalencia en la población humana (González-Muniesa et al., 2017). El desequilibrio entre la ingesta y el gasto calórico, junto con otros componentes ambientales, genéticos y epigenéticos propician la acumulación de ácidos grasos en el tejido adiposo y en el hígado, además de favorecer la diabetes tipo 2 o la inflamación crónica en distintos tejidos (González-Muniesa et al., 2017; Lin & Li, 2021).

Se ha demostrado que la obesidad tiene una importante base epigenética, capaz de regular el inicio, mantenimiento y recuperación del fenotipo obeso (Hinte et al., 2024; Ling & Rönn, 2019). Por ello, y dado que la reprogramación parcial puede modificar diversas marcas epigenéticas sin alterar la identidad celular, quisimos analizar si la expresión transitoria de OSKM en organismos obesos podía alterar su fenotipo a través de la remodelación epigenética. Dado que la obesidad es una patología que afecta simultáneamente a diversos tejidos y órganos, decidimos usar un modelo transgénico que pudiese expresar OSKM ubicuamente.

Para comprobar esta hipótesis, utilizamos el modelo de ratón OSKM-*only*. Con los cruces adecuados conseguimos ratones hermanos de camada con 2 genotipos: heterocigotos para rtTA/OSKM o heterocigotos para OSKM (sin rtTA), a los que denominaremos i4F y WT, respectivamente. De esta forma, tras suministrar doxiciclina en agua de bebida, solo el grupo i4F expresa OSKM. Posteriormente, inducimos el fenotipo obeso en estos ratones tras 3 meses con una dieta muy alta en grasa (60% grasa). Una vez desarrollada la obesidad, expusimos a estos ratones a un total de 7 ciclos de reprogramación parcial: 2 días con la expresión de OSKM (2D+) y 5 días sin (5D-). A lo largo de este tratamiento, se realizaron diversas pruebas a estos animales para comprobar distintos parámetros metabólicos (**Figura 25**).

En primer lugar, confirmamos que OSKM se expresase adecuadamente en los distintos tejidos de los ratones obesos i4F, y que tras la retirada de la doxiciclina la expresión del transgén se silenciase adecuadamente, lo que evita la formación de teratomas. Realizamos durante este proceso un seguimiento del peso y de la ingesta de comida. Al no detectar cambios bruscos en el peso corporal ni una disminución en la ingesta, asumimos que el proceso de reprogramación parcial no tuvo un impacto negativo en los tejidos de los ratones i4F (**Figura 25**).

Al analizar la glucosa en sangre periférica, detectamos que los ratones i4F presentaban unos niveles de glucosa menores que los WT. En línea con los niveles reducidos de glucosa, nuestros datos transcriptómicos de hígado nos permitieron observar cómo los ratones i4F presentaban una menor expresión de genes relacionados con la cascada de señalización de la insulina. Dada la posible alteración en la homeostasis de la insulina y la glucosa, decidimos estudiar la tolerancia a la insulina (ITT). Sin embargo, esta prueba reveló que ambos grupos de ratones no presentan una tolerancia a la insulina significativamente distinta, lo que indica que la reprogramación parcial no afecta a la sensibilidad a la insulina de los tejidos periféricos (**Figura 26**).

Posteriormente analizamos la tolerancia a la glucosa (GTT) de ambos grupos. En esta prueba pudimos comprobar cómo los ratones i4F presentan una retirada más rápida de la glucosa que los ratones WT, demostrando así una gestión más eficiente de la glucosa en sangre. Esta mayor eficiencia justifica los menores niveles de glucosa observados en los ratones, ya que son capaces de retirar más rápidamente la glucosa que les proporciona la dieta (**Figura 26**).

Al analizar la composición corporal de estos ratones mediante resonancia electromagnética, observamos cómo los ratones i4F presentan una reducción significativa en el porcentaje de masa grasa acompañada del aumento en la masa magra, lo que indica una mejoría en el fenotipo obeso. La firma de genes del metabolismo lipídico en el tejido graso, a pesar de no alcanzar significancia estadística, demuestra una tendencia positiva en la expresión de genes que favorecen el consumo lipídico. Esto es consistente con los datos observados sobre la composición corporal de los ratones i4F. Además, al analizar el tamaño de los adipocitos de la grasa blanca subcutánea y epididimal, observamos cómo el área media de los adipocitos de los ratones i4F era menor que el de los ratones WT. Esta reducción en el tamaño de los adipocitos concuerda con la reducción en el porcentaje de masa grasa observada en los ratones i4F, y con el aumento en el metabolismo lipídico. Por otra parte, al analizar los niveles de colesterol en sangre, a pesar de que en la tercera semana de tratamiento sí encontramos diferencias significativas, solo pudimos encontrar una tendencia en la reducción de los niveles de colesterol en los ratones i4F. A pesar de no encontrar diferencias significativas, la tendencia observada en los datos del colesterol sugiere una modificación metabólica en los ratones i4F que concuerda

con la alteración del perfil lipídico observado en los ratones obesos parcialmente reprogramados. En conjunto, estos datos demuestran una mejora en el perfil lipídico de los ratones i4F, que se relaciona con una remodelación positiva del fenotipo obeso (**Figura 27**).

Cabe destacar que también hemos sido capaces de reproducir la reducción observada en la acumulación lipídica de los adipocitos *in vitro* a través de la expresión de OSKM, apoyando los resultados obtenidos *in vivo* en el tejido adiposo blanco (**Figura 28**).

Por otra parte, se ha descrito que la acumulación del tejido adiposo blanco característico de la obesidad promueve un microambiente proinflamatorio (Engin & Engin, 2017). Por ello, decidimos estudiar la infiltración del sistema inmunitario, como marcador del fenotipo proinflamatorio. Al analizar el marcador general de leucocitos Cd45 y el marcador específico de macrófagos F4/80, en grasa blanca epididimal y subcutánea, observamos una reducción en la presencia de estas células del sistema inmunitario en el tejido adiposo de los ratones i4F. Asimismo, los resultados transcriptómicos obtenidos por ARN-seq de tejido adiposo blanco mostraron una reducción en las firmas génicas del sistema inmunitario, de migración leucocitaria y de respuesta inflamatoria en los ratones i4F. En conjunto, estos datos demuestran una reducción en el fenotipo proinflamatorio en el tejido adiposo blanco de ratones obesos tras el proceso de reprogramación parcial, lo que se puede relacionar con la reducción en la acumulación lipídica (**Figura 29**). Cabe destacar que la reducción en la inflamación del tejido adiposo contribuye a la sensibilidad a la insulina, así como a la gestión de la glucosa (R. L. Bradley et al., 2008; Jiang et al., 2021), lo que podría justificar la reducción observada en la GTT de los animales i4F.

Se ha descrito que los organismos adultos que padecen obesidad tienen una respuesta termogénica reducida (Jung et al., 1979). La inducción de la termogénesis mejora distintas características de la obesidad y las enfermedades metabólicas, resultando en una ventana terapéutica en este contexto patológico (Betz & Enerbäck, 2018; K. Y. Chen et al., 2020). Por otro lado, la activación de la termogénesis mediada por el tejido adiposo marrón, ya sea por frío, dieta o por compuestos químicos, puede reducir la obesidad al aumentar el consumo calórico para la producción de calor (Chouchani et al., 2019; Jagtap & Paul, 2023). Por ello, decidimos estudiar la termogénesis en los ratones obesos tras la reprogramación parcial. Al analizar con cámara térmica la temperatura de la región interescapular, lugar en el que se encuentra principalmente el tejido adiposo marrón en ratones, vemos un aumento significativo en la temperatura de los ratones i4F en comparación con los WT. Esta producción de calor en la región del BAT se ve acompañada del incremento de la temperatura general del ratón. Al estudiar por inmunohistoquímica la presencia en el BAT de la proteína mitocondrial Ucp1 (proteína desacoplante 1), proteína directamente relacionada con la termogénesis (Chouchani et al., 2019), observamos cómo hay un incremento significativo de este marcador en los ratones i4F. Este aumento en la termogénesis trae consigo la reducción del tamaño de los adipocitos del BAT en los ratones i4F, ya que la activación de Ucp1 promueve la lipólisis por el aumento en la demanda energética (Jagtap & Paul, 2023) (**Figura 30**). Por ello, el aumento de la temperatura puede ser el mecanismo mediante el cual la expresión transitoria de OSKM induce la reversión parcial del fenotipo obeso, mejorando la composición corporal de los ratones i4F. Cabe destacar que distintas moléculas inductoras de termogénesis se están estudiando actualmente en ensayos clínicos como posibles tratamientos contra la obesidad (Reyad-ul-Ferdous et al., 2024).

Otra de las patologías asociadas comúnmente con la obesidad es la acumulación de triglicéridos en el hígado, que da lugar al hígado graso no alcohólico. Cuando este estado es prolongado en el tiempo y se ve acompañado de un incremento en la respuesta inflamatoria, puede derivar en la esteatosis hepática no alcohólica (E. Lee et al., 2023). Por ello, decidimos estudiar la acumulación lipídica en el hígado en los ratones obesos. Al analizar la presencia de ácidos grasos, pudimos comprobar cómo los ratones parcialmente reprogramados tenían una menor acumulación lipídica en el hígado. Esta reducción podría explicarse por el aumento del metabolismo lipídico observado en el transcriptoma hepático, según los datos obtenidos mediante ARN-seq. En la misma línea, los resultados del PCA del ARN-seq del hígado mostraron una clara separación entre los grupos de ratones WT e i4F, reflejando diferencias en sus patrones de expresión génica que se pueden asociar a los cambios metabólicos observados (**Figura 31**).

En vista de los resultados histológicos y transcriptómicos en hígado, decidimos estudiar distintas vías asociadas con el anabolismo de lípidos, ya que la lipogénesis *de novo* juega un papel importante en la patología del hígado graso no alcohólico (Donnelly et al., 2005). Para ello, estudiamos la glucoquinasa (Gck), una enzima que fosforila a la glucosa en glucosa-6-fostato, favoreciendo el anabolismo lipídico e impulsando la obesidad (Tsukita et al., 2012). En cuanto a la gestión de la glucosa para la síntesis lipídica en el hígado, cabe destacar también a la acetil-CoA carboxilasa (Acc), una enzima que cataliza la carboxilación del acetil-CoA a malonil-CoA, paso inicial en la lipogénesis *de novo* a partir de glucosa (Engin & Engin, 2017). Por ello, la menor presencia de Acc activa (no fosforilada) y la menor expresión de Gck en los ratones i4F que en los WT, demuestra un menor grado de lipogénesis en los ratones parcialmente reprogramados. En la misma línea, la activación de Akt y mTor, relacionadas positivamente con la síntesis lipídica en el hígado, contribuyen a la esteatosis hepática no alcohólica (Laplane & Sabatini, 2009). Además, el hígado graso se caracteriza por la eliminación de ácidos grasos poliinsaturados y la acumulación de ácidos grasos monoinsaturados, debido al aumento de la actividad de la enzima esteroil-CoA desaturasa 1 (Scd1). Por todo esto, la menor activación de Akt y mTor, y la presencia reducida de Scd1 en ratones obesos i4F demuestran la menor lipogénesis hepática en ratones obesos parcialmente reprogramados, lo que junto con una menor activación de Acc y Gck reduce la esteatosis hepática al reducir la lipogénesis *de novo* (**Figura 31**). Cabe mencionar que hemos podido reproducir *in vitro* los resultados de la acumulación lipídica hepática observados *in vivo*. Para ello, partiendo de hepatocitos con los genotipos del modelo de ratón usado en este estudio, promovimos la acumulación de lípidos tratándolos con ácido oleico. Tras la expresión de OSKM pudimos observar cómo se reduce la acumulación lipídica en los hepatocitos, lo que apoya los resultados observados *in vivo* en el tejido hepático (**Figura 32**).

Una de las posibles complicaciones que podría tener este experimento, en cuanto al análisis de la mejoría del fenotipo obeso se refiere, es que la expresión de OSKM estuviese produciendo una pérdida parcial de la funcionalidad del intestino al inducir su desdiferenciación. Esto limitaría la captación de nutrientes e induciría una restricción calórica (Parras et al., 2023). No obstante, dado que los ratones i4F no perdieron peso durante los 7 ciclos de reprogramación parcial, mantuvieron una ingesta de comida constante y que, acompañado de la pérdida de grasa se observó un aumento en la masa magra, podemos asumir que estos ratones mostraron una mejora en el fenotipo obeso como consecuencia de la alteración de las vías de señalización metabólicas y no como resultado de una reducción en la captación de nutrientes.

Dado que se mantuvo durante todo el experimento la dieta alta en grasa, los cambios metabólicos observados se deben a la expresión cíclica de OSKM, posiblemente a través de la remodelación epigenética de los tejidos grasos. Asimismo, no observamos diferencias en los ratones tratados con dieta estándar (*normal diet*, ND) (**Figura S3**), lo que sugiere un efecto exclusivo de la reprogramación parcial sobre un fenotipo patogénico y no sobre los ratones sanos. Cabe resaltar que, el hecho de no encontrar diferencias en los ratones no obesos demuestra, una vez más, que los cambios observados en los animales obesos no fueron debidos a una desdiferenciación que disminuyese la absorción de nutrientes de manera inespecífica.

La reducción observada en el tamaño de los adipocitos en la grasa blanca, así como la menor acumulación de ácidos grasos en el hígado podrían estar relacionadas con el aumento de la termogénesis observada en los ratones obesos que fueron reprogramados parcialmente (Mills et al., 2021; Tsukita et al., 2012). La demanda energética del BAT para producir calor podría provocar la reducción de la acumulación de ácidos grasos en la grasa blanca y en el hígado. No obstante, por el momento no podemos asegurar si el aumento en la termogénesis en el BAT es el evento principal promovido por la reprogramación parcial, llegando a afectar a tejido adiposo e hígado, o si por el contrario la expresión de OSKM es necesaria en al menos todos estos tejidos para producir una mejora del fenotipo obeso. Para poder definir esta cuestión será necesario profundizar en este aspecto en futuros estudios.

En resumen, esta tesis describe cómo la reprogramación parcial tiene un efecto senomórfico, demuestra que los tejidos envejecidos pueden modularse mediante este proceso, haciéndolos menos propensos a la progresión tumoral y cómo la expresión cíclica de OSKM mejora distintos parámetros del fenotipo obeso. En conjunto, nuestros resultados justifican estudios futuros orientados a identificar nuevas vías que regulen la senescencia celular, así como a explorar compuestos químicos capaces de mimetizar los efectos beneficiosos de la reprogramación parcial, facilitando su traslación clínica. Asimismo, la modificación epigenética mediante la reprogramación parcial de los tejidos de organismos envejecidos y obesos proporciona una protección sobre la progresión tumoral y una mejora del fenotipo obeso, respectivamente. Por todo esto, la reprogramación parcial supone una estrategia prometedora en la medicina regenerativa y en la intervención sobre procesos patológicos asociados al envejecimiento.

7 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- i. La reprogramación parcial en células senescentes permite modular el fenotipo senescente.
 - a. La expresión de OSKM revierte parcialmente distintos marcadores transcriptómicos, proteómicos y secretómicos asociados con la senescencia. Además, tras expresar OSKM, el fenotipo secretor de las células senescentes mostró una reducción significativa, con una relevancia funcional tanto *in vitro* como *in vivo*.
 - b. La disfunción mitocondrial típica de la senescencia se vio parcialmente restaurada tras la expresión de OSKM. Dada la implicación de las mitocondrias sobre el fenotipo secretor, hipotetizamos que la mejora mitocondrial es el motivo por el que se reduce el SASP secretado por las células senescentes tras la reprogramación parcial.
 - c. Se comprobó que el tratamiento con los compuestos químicos RepSox y TCP (2c) mimetiza el efecto senomórfico de OSKM, reduciendo el fenotipo secretor y mejorando la disfunción mitocondrial típica de la senescencia.
- ii. La reprogramación parcial de animales envejecidos es capaz de remodelar el microambiente de los tejidos envejecidos. La mama y el pulmón de los ratones viejos presentan una mayor progresión tumoral que los ratones jóvenes. Sin embargo, tras la reprogramación parcial, los tumores del pulmón y la mama tienen un desarrollo significativamente menor.
- iii. La reprogramación parcial mejora distintas características del síndrome metabólico en ratones obesos.
 - a. La expresión cíclica de OSKM en animales obesos promueve la mejora del perfil glucémico.
 - b. La reprogramación parcial también mejora la composición corporal de los ratones obesos, reduciendo la acumulación lipídica en el tejido adiposo y en el hígado.
 - c. Los ratones obesos i4F presentaron una reducción en la infiltración inmunitaria en el tejido adiposo, que demuestra una reducción en el ambiente proinflamatorio típico de la obesidad.
 - d. Tras la expresión cíclica de OSKM, los ratones obesos presentaron una mayor termogénesis, lo que justifica el aumento en el consumo lipídico de estos ratones.

CONCLUSIONS

Based on the results obtained in this thesis, the following conclusions can be drawn:

- i. Partial reprogramming in senescent cells allows the modulation of the senescent phenotype.
 - a. The expression of OSKM partially reverses different transcriptomic, proteomic, and secretomic markers associated with senescence. Furthermore, after expressing OSKM, the secretory phenotype of senescent cells showed a significant reduction, with functional relevance both *in vitro* and *in vivo*.
 - b. The mitochondrial dysfunction typical of senescence was partially restored after OSKM expression. Given the mitochondria's involvement in the secretory phenotype, we hypothesize that mitochondrial improvement is the reason why the SASP secreted by senescent cells is reduced after partial reprogramming.
 - c. It was confirmed that the treatment with the chemical compounds RepSox and TCP (2c) mimics the senomorphic effect of OSKM, reducing the secretory phenotype and improving the mitochondrial dysfunction typical of senescence.
- ii. Partial reprogramming of aged animals can remodel the microenvironment of aged tissues. The mammary gland and lung of old mice show greater tumor progression than young mice. However, after partial reprogramming, lung and mammary tumors exhibit significantly lower development.
- iii. Partial reprogramming improves different characteristics of metabolic syndrome in obese mice.
 - a. Cyclic OSKM expression in obese animals promotes the improvement of the glycemic profile.
 - b. Partial reprogramming also improves the body composition of obese mice, reducing lipid accumulation in adipose tissue and the liver.
 - c. i4F obese mice showed a reduction in immune infiltration in adipose tissue, demonstrating a decrease in the pro-inflammatory environment typical of obesity.
 - d. After cyclic OSKM expression, obese mice exhibited increased thermogenesis, which justifies the increase in lipid consumption in these mice.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Cañamero, M., Rayon, T., Ors, I., Graña, O., Megías, D., Domínguez, O., Martínez, D., Manzanares, M., Ortega, S., & Serrano, M. (2013). Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature*, *502*(7471), 340-345. <https://doi.org/10.1038/nature12586>
- Ahima, R. S. (2009). Connecting obesity, aging and diabetes. *Nature Medicine*, *15*(9), 996-997. <https://doi.org/10.1038/nm0909-996>
- Aird, K. M., & Zhang, R. (2013). Detection of Senescence-Associated Heterochromatin Foci (SAHF). En L. Galluzzi, I. Vitale, O. Kepp, & G. Kroemer (Eds.), *Cell Senescence* (Vol. 965, pp. 185-196). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_12
- Alle, Q., Le Borgne, E., Bensadoun, P., Lemey, C., Béchir, N., Gabanou, M., Estermann, F., Bertrand-Gaday, C., Pessemesse, L., Toupet, K., Desprat, R., Vialaret, J., Hirtz, C., Noël, D., Jorgensen, C., Casas, F., Milhavet, O., & Lemaitre, J. (2022). A single short reprogramming early in life initiates and propagates an epigenetically related mechanism improving fitness and promoting an increased healthy lifespan. *Aging Cell*, *21*(11), e13714. <https://doi.org/10.1111/ace1.13714>
- Angarola, B. L., Sharma, S., Katiyar, N., Kang, H. G., Nehar-Belaid, D., Park, S., Gott, R., Eryilmaz, G. N., LaBarge, M. A., Palucka, K., Chuang, J. H., Korstanje, R., Ucar, D., & Anczuków, O. (2024). Comprehensive single-cell aging atlas of healthy mammary tissues reveals shared epigenomic and transcriptomic signatures of aging and cancer. *Nature Aging*, *5*(1), 122-143. <https://doi.org/10.1038/s43587-024-00751-8>
- Antón-Fernández, A., Roldán-Lázaro, M., Vallés-Saiz, L., Ávila, J., & Hernández, F. (2024). In vivo cyclic overexpression of Yamanaka factors restricted to neurons reverses age-associated phenotypes and enhances memory performance. *Communications Biology*, *7*(1), 631. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06328-w>
- Bai, Y., Yang, Z., Xu, X., Ding, W., Qi, J., Liu, F., Wang, X., Zhou, B., Zhang, W., Zhuang, X., Li, G., & Zhao, Y. (2023). Direct chemical induction of hepatocyte-like cells with capacity for liver repopulation. *Hepatology*, *77*(5), 1550-1565. <https://doi.org/10.1002/hep.32686>
- Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N. K., Childs, B. G., Van De Sluis, B., Kirkland, J. L., & Van Deursen, J. M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent

- cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479(7372), 232-236. <https://doi.org/10.1038/nature10600>
- Banito, A., Rashid, S. T., Acosta, J. C., Li, S., Pereira, C. F., Geti, I., Pinho, S., Silva, J. C., Azuara, V., Walsh, M., Vallier, L., & Gil, J. (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes & Development*, 23(18), 2134-2139. <https://doi.org/10.1101/gad.1811609>
- Barth, J., Abou-El-Ardat, K., Dalic, D., Kurrle, N., Maier, A.-M., Mohr, S., Schütte, J., Vassen, L., Greve, G., Schulz-Fincke, J., Schmitt, M., Tomic, M., Metzger, E., Bug, G., Khandanpour, C., Wagner, S. A., Lübbert, M., Jung, M., Serve, H., ... Berg, T. (2019). LSD1 inhibition by tranylcypromine derivatives interferes with GFII1-mediated repression of PU.1 target genes and induces differentiation in AML. *Leukemia*, 33(6), 1411-1426. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0375-7>
- Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.-V. F., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V. C., Takaoka, M., Nakagawa, H., Tort, F., Fugger, K., Johansson, F., Sehested, M., Andersen, C. L., Dyrskjot, L., Ørntoft, T., ... Gorgoulis, V. G. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, 444(7119), 633-637. <https://doi.org/10.1038/nature05268>
- Behmoaras, J., & Gil, J. (2021). Similarities and interplay between senescent cells and macrophages. *Journal of Cell Biology*, 220(2), e202010162. <https://doi.org/10.1083/jcb.202010162>
- Betz, M. J., & Enerbäck, S. (2018). Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(2), 77-87. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.132>
- Birch, J., & Passos, J. F. (2017). Targeting the SASP to combat ageing: Mitochondria as possible intracellular allies? *BioEssays*, 39(5), 1600235. <https://doi.org/10.1002/bies.201600235>
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 611-622. <https://doi.org/10.1038/nrg1656>
- Blasco, M. A., Lee, H.-W., Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. A., & Greider, C. W. (1997). *Telomere Shortening and Tumor Formation by Mouse Cells Lacking Telomerase RNA*.
- Blau, H. M., Chiu, C.-P., & Webster, C. (1983). Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell*, 32(4), 1171-1180. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90300-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90300-8)

- Bliddal, H., Leeds, A. R., & Christensen, R. (2014). Osteoarthritis, obesity and weight loss: Evidence, hypotheses and horizons – a scoping review. *Obesity Reviews*, *15*(7), 578-586. <https://doi.org/10.1111/obr.12173>
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C.-P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., & Wright, W. E. (1998). Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science*, *279*(5349), 349-352. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.349>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bradley, M. O., & Kohn, K. W. (1979). X-ray induced DNA double strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution. *Nucleic Acids Research*, *7*(3), 793-804. <https://doi.org/10.1093/nar/7.3.793>
- Bradley, R. L., Jeon, J. Y., Liu, F.-F., & Maratos-Flier, E. (2008). Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *295*(3), E586-E594. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00309.2007>
- Buganim, Y., Faddah, D. A., Cheng, A. W., Itskovich, E., Markoulaki, S., Ganz, K., Klemm, S. L., van Oudenaarden, A., & Jaenisch, R. (2012). Single-Cell Expression Analyses during Cellular Reprogramming Reveal an Early Stochastic and a Late Hierarchic Phase. *Cell*, *150*(6), 1209-1222. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.023>
- Campisi, J. (2013). Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annual Review of Physiology*, *75*(1), 685-705. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>
- Cao, N., Huang, Y., Zheng, J., Spencer, C. I., Zhang, Y., Fu, J.-D., Nie, B., Xie, M., Zhang, M., Wang, H., Ma, T., Xu, T., Shi, G., Srivastava, D., & Ding, S. (2016). Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. *Science*, *352*(6290), 1216-1220. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1502>
- Carey, B. W., Markoulaki, S., Hanna, J., Saha, K., Gao, Q., Mitalipova, M., & Jaenisch, R. (2009). Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(1), 157-162. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811426106>
- Cerneckis, J., Cai, H., & Shi, Y. (2024). Induced pluripotent stem cells (iPSCs): Molecular mechanisms of induction and applications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *9*(1), 112. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01809-0>

- Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.-M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N. E., Ding, S., Feng, W., Luo, Y., Wang, X., Aykin-Burns, N., Krager, K., Ponnappan, U., Hauer-Jensen, M., Meng, A., & Zhou, D. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nature Medicine*, 22(1), 78-83. <https://doi.org/10.1038/nm.4010>
- Chen, H., Liu, H., & Qing, G. (2018). Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3(1), 5. <https://doi.org/10.1038/s41392-018-0008-7>
- Chen, H., Xiang, J., Liu, Y., Pi, W., Zhang, H., Wu, L., Liu, Y., Ji, S., Li, Y., Cui, S., Liu, K., Fu, X., & Sun, X. (2024). Customized Proteinaceous Nanoformulation for In Vivo Chemical Reprogramming. *Advanced Materials*, 36(28), 2311845. <https://doi.org/10.1002/adma.202311845>
- Chen, K. Y., Brychta, R. J., Abdul Sater, Z., Cassimatis, T. M., Cero, C., Fletcher, L. A., Israni, N. S., Johnson, J. W., Lea, H. J., Linderman, J. D., O'Mara, A. E., Zhu, K. Y., & Cypess, A. M. (2020). Opportunities and challenges in the therapeutic activation of human energy expenditure and thermogenesis to manage obesity. *Journal of Biological Chemistry*, 295(7), 1926-1942. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007363>
- Chen, T., & Dent, S. Y. R. (2014). Chromatin modifiers and remodellers: Regulators of cellular differentiation. *Nature Reviews Genetics*, 15(2), 93-106. <https://doi.org/10.1038/nrg3607>
- Chen, Y., Chen, Y., Shi, C., Huang, Z., Zhang, Y., Li, S., Li, Y., Ye, J., Yu, C., Li, Z., Zhang, X., Wang, J., Yang, H., Fang, L., & Chen, Q. (2018). SOAPnuke: A MapReduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data. *GigaScience*, 7(1). <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix120>
- Chen, Y., Lüttmann, F. F., Schoger, E., Schöler, H. R., Zelarayán, L. C., Kim, K.-P., Haigh, J. J., Kim, J., & Braun, T. (2021). Reversible reprogramming of cardiomyocytes to a fetal state drives heart regeneration in mice. *Science*, 373(6562), 1537-1540. <https://doi.org/10.1126/science.abg5159>
- Cheng, F., Wang, C., Ji, Y., Yang, B., Shu, J., Shi, K., Wang, L., Wang, S., Zhang, Y., Huang, X., Zhou, X., Xia, K., Liang, C., Chen, Q., & Li, F. (2022). Partial reprogramming strategy for intervertebral disc rejuvenation by activating energy switch. *Aging Cell*, 21(4), e13577. <https://doi.org/10.1111/accel.13577>
- Cheng, L., Hu, W., Qiu, B., Zhao, J., Yu, Y., Guan, W., Wang, M., Yang, W., & Pei, G. (2014). Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Research*, 24(6), 665-679. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.32>

- Cheng, Z., Zheng, L., & Almeida, F. A. (2018). Epigenetic reprogramming in metabolic disorders: Nutritional factors and beyond. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *54*, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.10.004>
- Chiche, A., Charifou, E., Djoual, L., Wang, S., Temime, L., Saclier, M., Wang, S., Chantrel, J., & Li, H. (2024). *Induction of Senescence During Postpartum Mammary Gland Involution supports tissue remodeling and promotes postpartum tumorigenesis*. <https://doi.org/10.1101/2024.12.29.630686>
- Chiche, A., Chen, C., & Li, H. (2020). The crosstalk between cellular reprogramming and senescence in aging and regeneration. *Experimental Gerontology*, *138*, 111005. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111005>
- Chiche, A., Le Roux, I., Von Joest, M., Sakai, H., Agúín, S. B., Cazin, C., Salam, R., Fiette, L., Alegria, O., Flamant, P., Tajbakhsh, S., & Li, H. (2017). Injury-Induced Senescence Enables In Vivo Reprogramming in Skeletal Muscle. *Cell Stem Cell*, *20*(3), 407-414.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.020>
- Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J. E., Premsrirut, P., Luo, W., Chicas, A., Lee, C. S., Kogan, S. C., & Lowe, S. W. (2011). Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes & Development*, *25*(20), 2125-2136. <https://doi.org/10.1101/gad.17276711>
- Chondronasiou, D., Gill, D., Mosteiro, L., Urdinguio, R. G., Berenguer-Llargo, A., Aguilera, M., Durand, S., Aprahamian, F., Nirmalathasan, N., Abad, M., Martin-Herranz, D. E., Stephan-Otto Attolini, C., Prats, N., Kroemer, G., Fraga, M. F., Reik, W., & Serrano, M. (2022). Multi-omic rejuvenation of naturally aged tissues by a single cycle of transient reprogramming. *Aging Cell*, *21*(3), e13578. <https://doi.org/10.1111/accel.13578>
- Chondronasiou, D., Martínez De Villarreal, J., Melendez, E., Lynch, C. J., Pozo, N. D., Kovatcheva, M., Aguilera, M., Prats, N., Real, F. X., & Serrano, M. (2022). Deciphering the roadmap of in vivo reprogramming toward pluripotency. *Stem Cell Reports*, *17*(11), 2501-2517. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2022.09.009>
- Choquet, H., & Meyre, D. (2011). Molecular Basis of Obesity: Current Status and Future Prospects. *Current Genomics*, *12*(3), 154-168. <https://doi.org/10.2174/138920211795677921>
- Chouchani, E. T., Kazak, L., & Spiegelman, B. M. (2019). New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metabolism*, *29*(1), 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.11.002>

- Cipriano, A., Moqri, M., Maybury-Lewis, S. Y., Rogers-Hammond, R., De Jong, T. A., Parker, A., Rasouli, S., Schöler, H. R., Sinclair, D. A., & Sebastiano, V. (2023). Mechanisms, pathways and strategies for rejuvenation through epigenetic reprogramming. *Nature Aging*, 4(1), 14-26. <https://doi.org/10.1038/s43587-023-00539-2>
- Clemente-Periván, S. I., Gómez-Gómez, Y., Leyva-Vázquez, M. A., Lagunas-Martínez, A., Organista-Nava, J., & Illades-Aguiar, B. (2020). Role of Oct3/4 in Cervical Cancer Tumorigenesis. *Frontiers in Oncology*, 10, 247. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00247>
- Collado, M., Blasco, M. A., & Serrano, M. (2007). Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell*, 130(2), 223-233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.003>
- Collado, M., & Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: Evidence from mice and humans. *Nature Reviews Cancer*, 10(1), 51-57. <https://doi.org/10.1038/nrc2772>
- Colleluori, G., & Villareal, D. T. (2021). Aging, obesity, sarcopenia and the effect of diet and exercise intervention. *Experimental Gerontology*, 155, 111561. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2021.111561>
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(1), 99-118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>
- Coppé, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P.-Y., & Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biology*, 6(12), e301. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>
- d'Adda Di Fagagna, F. (2008). Living on a break: Cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature Reviews Cancer*, 8(7), 512-522. <https://doi.org/10.1038/nrc2440>
- Dasgupta, N., Arnold, R., Equey, A., Gandhi, A., & Adams, P. D. (2024). The role of the dynamic epigenetic landscape in senescence: Orchestrating SASP expression. *Npj Aging*, 10(1), 48. <https://doi.org/10.1038/s41514-024-00172-2>
- Davalos, A. R., Coppe, J.-P., Campisi, J., & Desprez, P.-Y. (2010). Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(2), 273-283. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9220-9>
- David, L., & Polo, J. M. (2014). Phases of reprogramming. *Stem Cell Research*, 12(3), 754-761. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2014.03.007>

- De Blander, H., Morel, A.-P., Senaratne, A. P., Ouzounova, M., & Puisieux, A. (2021). Cellular Plasticity: A Route to Senescence Exit and Tumorigenesis. *Cancers*, 13(18), 4561. <https://doi.org/10.3390/cancers13184561>
- De Lázaro, I., Yilmazer, A., Nam, Y., Qubisi, S., Razak, F. M. A., Degens, H., Cossu, G., & Kostarelou, K. (2019). Non-viral, Tumor-free Induction of Transient Cell Reprogramming in Mouse Skeletal Muscle to Enhance Tissue Regeneration. *Molecular Therapy*, 27(1), 59-75. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.10.014>
- De Mello, A. H., Costa, A. B., Engel, J. D. G., & Rezin, G. T. (2018). Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life Sciences*, 192, 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.019>
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., Laberge, R.-M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M. E. T., Hoeijmakers, J. H. J., de Bruin, A., Hara, E., & Campisi, J. (2014). An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell*, 31(6), 722-733. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>
- Den Hertog, J. (2016). Tumor Suppressors in Zebrafish: From TP53 to PTEN and Beyond. En D. M. Langenau (Ed.), *Cancer and Zebrafish* (Vol. 916, pp. 87-101). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30654-4_4
- Després, J.-P., & Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 444(7121), 881-887. <https://doi.org/10.1038/nature05488>
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Giovanni Nuciforo, P., Bensimon, A., Maestro, R., Giuseppe Pelicci, P., & d'Adda Di Fagagna, F. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, 444(7119), 638-642. <https://doi.org/10.1038/nature05327>
- Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., & d'Adda Di Fagagna, F. (2021). Cellular senescence in ageing: From mechanisms to therapeutic opportunities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), 75-95. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., & Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9363-9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>

- Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation*, *115*(5), 1343-1351. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>
- Drechsel, J., Kyrrousi, C., Cappello, S., & Sieber, S. A. (2020). Tranylcpromine specificity for monoamine oxidase is limited by promiscuous protein labelling and lysosomal trapping. *RSC Chemical Biology*, *1*(4), 209-213. <https://doi.org/10.1039/D0CB00048E>
- Dreesen, O., Chojnowski, A., Ong, P. F., Zhao, T. Y., Common, J. E., Lunny, D., Lane, E. B., Lee, S. J., Vardy, L. A., Stewart, C. L., & Colman, A. (2013). Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence. *Journal of Cell Biology*, *200*(5), 605-617. <https://doi.org/10.1083/jcb.201206121>
- Ebrahimi, B. (2015). Reprogramming barriers and enhancers: Strategies to enhance the efficiency and kinetics of induced pluripotency. *Cell Regeneration*, *4*(1), 4:10. <https://doi.org/10.1186/s13619-015-0024-9>
- Egolf, S., Aubert, Y., Doepner, M., Anderson, A., Maldonado-Lopez, A., Pacella, G., Lee, J., Ko, E. K., Zou, J., Lan, Y., Simpson, C. L., Ridky, T., & Capell, B. C. (2019). LSD1 Inhibition Promotes Epithelial Differentiation through Derepression of Fate-Determining Transcription Factors. *Cell Reports*, *28*(8), 1981-1992.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.058>
- Ellulu, M. S., Patimah, I., Khaza'ai, H., Rahmat, A., & Abed, Y. (2017). Obesity and inflammation: The linking mechanism and the complications. *Archives of Medical Science*, *4*, 851-863. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58928>
- Engin, A. B., & Engin, A. (Eds.). (2017). *Obesity and Lipotoxicity* (Vol. 960). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5>
- Erickson, S., Sangfelt, O., Heyman, M., Castro, J., Einhorn, S., & Grandér, D. (1998). Involvement of the Ink4 proteins p16 and p15 in T-lymphocyte senescence. *Oncogene*, *17*(5), 595-602. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201965>
- Fane, M., & Weeraratna, A. T. (2020). How the ageing microenvironment influences tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, *20*(2), 89-106. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0222-9>
- Ferreirós, A., Pedrosa, P., Da Silva-Álvarez, S., Triana-Martínez, F., Vilas, J. M., Picallos-Rabina, P., González, P., Gómez, M., Li, H., García-Caballero, T., González-Barcia, M., Vidal, A., & Collado, M. (2019). Context-Dependent Impact of RAS Oncogene Expression on Cellular Reprogramming to Pluripotency. *Stem Cell Reports*, *12*(5), 1099-1112. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.04.006>

- Finkel, T., Serrano, M., & Blasco, M. A. (2007). The common biology of cancer and ageing. *Nature*, 448(7155), 767-774. <https://doi.org/10.1038/nature05985>
- Freund, A., Laberge, R.-M., Demaria, M., & Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Molecular Biology of the Cell*, 23(11), 2066-2075. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-10-0884>
- Fu, Y., Huang, C., Xu, X., Gu, H., Ye, Y., Jiang, C., Qiu, Z., & Xie, X. (2015). Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails. *Cell Research*, 25(9), 1013-1024. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.99>
- Fumagalli, M., Rossiello, F., Mondello, C., & d'Adda Di Fagagna, F. (2014). Stable Cellular Senescence Is Associated with Persistent DDR Activation. *PLoS ONE*, 9(10), e110969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110969>
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 85(8), 348-362. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.348>
- González-Domínguez, Á., Visiedo-García, F. M., Domínguez-Riscart, J., González-Domínguez, R., Mateos, R. M., & Lechuga-Sancho, A. M. (2020). Iron Metabolism in Obesity and Metabolic Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5529. <https://doi.org/10.3390/ijms21155529>
- González-Muniesa, P., Martínez-González, M.-A., Hu, F. B., Després, J.-P., Matsuzawa, Y., Loos, R. J. F., Moreno, L. A., Bray, G. A., & Martínez, J. A. (2017). Obesity. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17034. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>
- Gorelik, E., Segal, S., & Feldman, M. (1978). GROWTH OF A LOCAL TUMOR EXERTS A SPECIFIC INHIBITORY EFFECT ON PROGRESSION OF LUNG METASTASES. *International Journal of Cancer*, 21(5), 617-625. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910210512>
- Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovskiy, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., ... Demaria, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179(4), 813-827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>
- Guan, J., Wang, G., Wang, J., Zhang, Z., Fu, Y., Cheng, L., Meng, G., Lyu, Y., Zhu, J., Li, Y., Wang, Y., Liuyang, S., Liu, B., Yang, Z., He, H., Zhong, X., Chen, Q., Zhang, X., Sun, S., ... Deng, H. (2022). Chemical reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cells. *Nature*, 605(7909), 325-331. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04593-5>

- Gurdon, J. B. (1962). The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. *Development*, 10(4), 622-640. <https://doi.org/10.1242/dev.10.4.622>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanna, J., Saha, K., Pando, B., Van Zon, J., Lengner, C. J., Creighton, M. P., Van Oudenaarden, A., & Jaenisch, R. (2009). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*, 462(7273), 595-601. <https://doi.org/10.1038/nature08592>
- Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.-W., Meissner, A., Cassady, J. P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.-C., Townes, T. M., & Jaenisch, R. (2007). Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin. *Science*, 318(5858), 1920-1923. <https://doi.org/10.1126/science.1152092>
- Hata, M., Andriessen, E. M. M. A., Hata, M., Diaz-Marin, R., Fournier, F., Crespo-Garcia, S., Blot, G., Juneau, R., Pilon, F., Dejda, A., Guber, V., Heckel, E., Daneault, C., Calderon, V., Des Rosiers, C., Melichar, H. J., Langmann, T., Joyal, J.-S., Wilson, A. M., & Sapieha, P. (2023). Past history of obesity triggers persistent epigenetic changes in innate immunity and exacerbates neuroinflammation. *Science*, 379(6627), 45-62. <https://doi.org/10.1126/science.abj8894>
- Hayflick, L. (1973). Subculturing Human Diploid Fibroblast Cultures. Supported, in part, by research Grant HD 04004 from the National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. En *Tissue Culture* (pp. 220-223). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-427150-0.50060-7>
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585-621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- He, S., & Sharpless, N. E. (2017). Senescence in Health and Disease. *Cell*, 169(6), 1000-1011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>
- He, Y., Su, Y., Duan, C., Wang, S., He, W., Zhang, Y., An, X., & He, M. (2023). Emerging role of aging in the progression of NAFLD to HCC. *Ageing Research Reviews*, 84, 101833. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101833>

- 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), 742-755. <https://doi.org/10.1038/s43587-022-00263-3>
- Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P. C., Chen, D. J., & Sedivy, J. M. (2004). Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, p53, and p21CIP1, but Not p16INK4a. *Molecular Cell*, 14(4), 501-513. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00256-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00256-4)
- Hinte, L. C., Castellano-Castillo, D., Ghosh, A., Melrose, K., Gasser, E., Noé, F., Massier, L., Dong, H., Sun, W., Hoffmann, A., Wolfrum, C., Rydén, M., Mejhert, N., Blüher, M., & Von Meyenn, F. (2024). Adipose tissue retains an epigenetic memory of obesity after weight loss. *Nature*, 636(8042), 457-465. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08165-7>
- Hockemeyer, D., Soldner, F., Cook, E. G., Gao, Q., Mitalipova, M., & Jaenisch, R. (2008). A Drug-Inducible System for Direct Reprogramming of Human Somatic Cells to Pluripotency. *Cell Stem Cell*, 3(3), 346-353. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.08.014>
- Höhn, A., Weber, D., Jung, T., Ott, C., Hugo, M., Kochlik, B., Kehm, R., König, J., Grune, T., & Castro, J. P. (2017). Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biology*, 11, 482-501. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.001>
- Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., & Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53–p21 pathway. *Nature*, 460(7259), 1132-1135. <https://doi.org/10.1038/nature08235>
- Horvath, S., Lacunza, E., Mallat, M. C., Portiansky, E. L., Gallardo, M. D., Brooke, R. T., Chiavellini, P., Pasquini, D. C., Girard, M., Lehmann, M., Yan, Q., Lu, A. T., Haghani, A., Gordevicius, J., Abba, M., & Goya, R. G. (2024). Cognitive rejuvenation in old rats by hippocampal OSKM gene therapy. *GeroScience*, 47(1), 809-823. <https://doi.org/10.1007/s11357-024-01269-y>
- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., Ge, J., Xu, J., Zhang, Q., Zhao, Y., & Deng, H. (2013). Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science*, 341(6146), 651-654. <https://doi.org/10.1126/science.1239278>
- Hu, W., Qiu, B., Guan, W., Wang, Q., Wang, M., Li, W., Gao, L., Shen, L., Huang, Y., Xie, G., Zhao, H., Jin, Y., Tang, B., Yu, Y., Zhao, J., & Pei, G. (2015). Direct Conversion of Normal and Alzheimer's Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules. *Cell Stem Cell*, 17(2), 204-212. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.006>

- Huang, C., Tu, W., Fu, Y., Wang, J., & Xie, X. (2018). Chemical-induced cardiac reprogramming in vivo. *Cell Research*, 28(6), 686-689. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0036-4>
- Huyghe, A., Furlan, G., Schroeder, J., Cascales, E., Trajkova, A., Ruel, M., Stüder, F., Larcombe, M., Yang Sun, Y. B., Mugnier, F., De Matteo, L., Baygin, A., Wang, J., Yu, Y., Rama, N., Gibert, B., Kielbassa, J., Tonon, L., Wajda, P., ... Laval, F. (2022). Comparative roadmaps of reprogramming and oncogenic transformation identify Bcl11b and Atoh8 as broad regulators of cellular plasticity. *Nature Cell Biology*, 24(9), 1350-1363. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00986-w>
- Huyghe, A., Trajkova, A., & Laval, F. (2024). Cellular plasticity in reprogramming, rejuvenation and tumorigenesis: A pioneer TF perspective. *Trends in Cell Biology*, 34(3), 255-267. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.07.013>
- Ichida, J. K., Blanchard, J., Lam, K., Son, E. Y., Chung, J. E., Egli, D., Loh, K. M., Carter, A. C., Di Giorgio, F. P., Koszka, K., Huangfu, D., Akutsu, H., Liu, D. R., Rubin, L. L., & Eggan, K. (2009). A Small-Molecule Inhibitor of Tgf- β Signaling Replaces Sox2 in Reprogramming by Inducing Nanog. *Cell Stem Cell*, 5(5), 491-503. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.09.012>
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071-1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Jacobs, J. J. L., & De Lange, T. (2004). Significant Role for p16INK4a in p53-Independent Telomere-Directed Senescence. *Current Biology*, 14(24), 2302-2308. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.12.025>
- Jagtap, U., & Paul, A. (2023). UCP1 activation: Hottest target in the thermogenesis pathway to treat obesity using molecules of synthetic and natural origin. *Drug Discovery Today*, 28(9), 103717. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103717>
- Jiang, X., Shen, H., Shang, X., Fang, J., Lu, Y., Lu, Y., Zheng, J., & Fu, P. (2022). Recent Advances in the Aging Microenvironment of Breast Cancer. *Cancers*, 14(20), 4990. <https://doi.org/10.3390/cancers14204990>
- Jiang, X., Zhang, Y., Hu, W., Liang, Y., Zheng, L., Zheng, J., Wang, B., & Guo, X. (2021). Different Effects of Leucine Supplementation and/or Exercise on Systemic Insulin Sensitivity in Mice. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 651303. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.651303>
- Jiao, Y., Feng, Y., & Wang, X. (2018). Regulation of Tumor Suppressor Gene CDKN2A and Encoded p16-INK4a Protein by Covalent Modifications. *Biochemistry (Moscow)*, 83(11), 1289-1298. <https://doi.org/10.1134/S0006297918110019>

- Jung, R. T., Shetty, P. S., James, W. P. T., Barrand, M. A., & Callingham, B. A. (1979). Reduced thermogenesis in obesity. *Nature*, 279(5711), 322-323. <https://doi.org/10.1038/279322a0>
- Kaplun, J., Zheng, L., Meissl, K., Chaneton, B., Selivanov, V. A., Mackay, G., Van Der Burg, S. H., Verdegaal, E. M. E., Cascante, M., Shlomi, T., Gottlieb, E., & Peeper, D. S. (2013). A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature*, 498(7452), 109-112. <https://doi.org/10.1038/nature12154>
- Kaur, Y., De Souza, R. J., Gibson, W. T., & Meyre, D. (2017). A systematic review of genetic syndromes with obesity. *Obesity Reviews*, 18(6), 603-634. <https://doi.org/10.1111/obr.12531>
- Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y. V., Menendez, S., Morera, L. B., Raya, A., Wahl, G. M., & Belmonte, J. C. I. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature*, 460(7259), 1140-1144. <https://doi.org/10.1038/nature08311>
- Kelly, J., Khan, A. A., Yin, J., Ferguson, T. A., & Apte, R. S. (2007). Senescence regulates macrophage activation and angiogenic fate at sites of tissue injury in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 117(11), 3421-3426. <https://doi.org/10.1172/JCI32430>
- Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., Ko, S., Yang, E., Cha, K. Y., Lanza, R., & Kim, K.-S. (2009). Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell*, 4(6), 472-476. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.005>
- Kim, J. (2020). Cellular reprogramming to model and study epigenetic alterations in cancer. *Stem Cell Research*, 49, 102062. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102062>
- Kim, Y. H., Choi, Y. W., Lee, J., Soh, E. Y., Kim, J.-H., & Park, T. J. (2017). Senescent tumor cells lead the collective invasion in thyroid cancer. *Nature Communications*, 8(1), 15208. <https://doi.org/10.1038/ncomms15208>
- Kim, Y., Jeong, J., & Choi, D. (2020). Small-molecule-mediated reprogramming: A silver lining for regenerative medicine. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(2), 213-226. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0383-3>
- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A., Ntounis, T., & Fasoulakis, Z. (2020). Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Research*, 40(11), 6009-6015. <https://doi.org/10.21873/anticanres.14622>

- Kopelman, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature*, *404*(6778), 635-643. <https://doi.org/10.1038/35007508>
- Korolchuk, V. I., Miwa, S., Carroll, B., & Von Zglinicki, T. (2017). Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link? *EBioMedicine*, *21*, 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.020>
- Krizhanovsky, V., Xue, W., Zender, L., Yon, M., Hernando, E., & Lowe, S. W. (2008). Implications of Cellular Senescence in Tissue Damage Response, Tumor Suppression, and Stem Cell Biology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *73*(0), 513-522. <https://doi.org/10.1101/sqb.2008.73.048>
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., & Lowe, S. W. (2008). Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell*, *134*(4), 657-667. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.049>
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Douma, S., Van Doorn, R., Desmet, C. J., Aarden, L. A., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2008). Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell*, *133*(6), 1019-1031. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.039>
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., & Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science*, *113*(20), 3613-3622. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.20.3613>
- Kwon, O.-J., Zhang, L., Jia, D., & Xin, L. (2021). Sox2 is necessary for androgen ablation-induced neuroendocrine differentiation from Pten null Sca-1+ prostate luminal cells. *Oncogene*, *40*(1), 203-214. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01526-2>
- Lan, T., Xue, X., Dunmall, L. C., Miao, J., & Wang, Y. (2021). Patient-derived xenograft: A developing tool for screening biomarkers and potential therapeutic targets for human esophageal cancers. *Aging*, *13*(8), 12273-12293. <https://doi.org/10.18632/aging.202934>
- Lapasset, L., Milhavet, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Aït-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J.-M., De Vos, J., Lehmann, S., & Lemaitre, J.-M. (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes & Development*, *25*(21), 2248-2253. <https://doi.org/10.1101/gad.173922.111>
- Laplane, M., & Sabatini, D. M. (2009). An Emerging Role of mTOR in Lipid Biosynthesis. *Current Biology*, *19*(22), R1046-R1052. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.058>

- Lecot, P., Alimirah, F., Desprez, P.-Y., Campisi, J., & Wiley, C. (2016). Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development. *British Journal of Cancer*, *114*(11), 1180-1184. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.115>
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*, *5*(2), 187-195. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>
- Lee, E., Korf, H., & Vidal-Puig, A. (2023). An adipocentric perspective on the development and progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, *78*(5), 1048-1062. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.01.024>
- Lee, M. G., Wynder, C., Schmidt, D. M., McCafferty, D. G., & Shiekhattar, R. (2006). Histone H3 Lysine 4 Demethylation Is a Target of Nonselective Antidepressive Medications. *Chemistry & Biology*, *13*(6), 563-567. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.05.004>
- Li, H., Collado, M., Villasante, A., Strati, K., Ortega, S., Cañamero, M., Blasco, M. A., & Serrano, M. (2009). The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature*, *460*(7259), 1136-1139. <https://doi.org/10.1038/nature08290>
- Li, W., Zhou, H., Abujarour, R., Zhu, S., Young Joo, J., Lin, T., Hao, E., Schöler, H. R., Hayek, A., & Ding, S. (2009). Generation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells in the Absence of Exogenous Sox2. *Stem Cells*, *27*(12), 2992-3000. <https://doi.org/10.1002/stem.240>
- Li, X., Zuo, X., Jing, J., Ma, Y., Wang, J., Liu, D., Zhu, J., Du, X., Xiong, L., Du, Y., Xu, J., Xiao, X., Wang, J., Chai, Z., Zhao, Y., & Deng, H. (2015). Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons. *Cell Stem Cell*, *17*(2), 195-203. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.06.003>
- Lian, J., Yue, Y., Yu, W., & Zhang, Y. (2020). Immunosenescence: A key player in cancer development. *Journal of Hematology & Oncology*, *13*(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00986-z>
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, *30*(7), 923-930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
- Lin, X., & Li, H. (2021). Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Frontiers in Endocrinology*, *12*, 706978. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.706978>
- Ling, C., & Rönn, T. (2019). Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Metabolism*, *29*(5), 1028-1044. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.03.009>

- Liu, D., & Hornsby, P. J. (2007). Senescent Human Fibroblasts Increase the Early Growth of Xenograft Tumors via Matrix Metalloproteinase Secretion. *Cancer Research*, *67*(7), 3117-3126. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3452>
- Liu, Z., Cai, Y., Wang, Y., Nie, Y., Zhang, C., Xu, Y., Zhang, X., Lu, Y., Wang, Z., Poo, M., & Sun, Q. (2018). Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell*, *172*(4), 881-887.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.020>
- Liu, Z., Liang, Q., Ren, Y., Guo, C., Ge, X., Wang, L., Cheng, Q., Luo, P., Zhang, Y., & Han, X. (2023). Immunosenescence: Molecular mechanisms and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *8*(1), 200. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01451-2>
- Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J., & Baltimore, D. (2002). Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors. *Science*, *295*(5556), 868-872. <https://doi.org/10.1126/science.1067081>
- López-Otín, C., Pietrocola, F., Roiz-Valle, D., Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2023). Metahallmarks of aging and cancer. *Cell Metabolism*, *35*(1), 12-35. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.11.001>
- López-Polo, V., Maus, M., Zacharioudakis, E., Lafarga, M., Attolini, C. S.-O., Marques, F. D. M., Kovatcheva, M., Gavathiotis, E., & Serrano, M. (2024). Release of mitochondrial dsRNA into the cytosol is a key driver of the inflammatory phenotype of senescent cells. *Nature Communications*, *15*(1), 7378. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51363-0>
- Lorenzatti Hiles, G., Cates, A. L., El-Sawy, L., Day, K. C., Broses, L. J., Han, A. L., Briggs, H. L., Emamdjomeh, A., Chou, A., Abel, E. V., Liebert, M., Palmbo, P. L., Udager, A. M., Keller, E. T., & Day, M. L. (2019). A surgical orthotopic approach for studying the invasive progression of human bladder cancer. *Nature Protocols*, *14*(3), 738-755. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0112-8>
- Lu, Y., Brommer, B., Tian, X., Krishnan, A., Meer, M., Wang, C., Vera, D. L., Zeng, Q., Yu, D., Bonkowski, M. S., Yang, J.-H., Zhou, S., Hoffmann, E. M., Karg, M. M., Schultz, M. B., Kane, A. E., Davidsohn, N., Korobkina, E., Chwalek, K., ... Sinclair, D. A. (2020). Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature*, *588*(7836), 124-129. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2975-4>
- Lujambio, A. (2016). To clear, or not to clear (senescent cells)? That is the question. *BioEssays*, *38*(S1). <https://doi.org/10.1002/bies.201670910>
- Lujambio, A., Akkari, L., Simon, J., Grace, D., Tschaharganeh, D. F., Bolden, J. E., Zhao, Z., Thapar, V., Joyce, J. A., Krizhanovskiy, V., & Lowe, S. W. (2013). Non-Cell-

Autonomous Tumor Suppression by p53. *Cell*, 153(2), 449-460.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.020>

Ma, Y., Xie, H., Du, X., Wang, L., Jin, X., Zhang, Q., Han, Y., Sun, S., Wang, L., Li, X., Zhang, C., Wang, M., Li, C., Xu, J., Huang, Z., Wang, X., Chai, Z., & Deng, H. (2021). In vivo chemical reprogramming of astrocytes into neurons. *Cell Discovery*, 7(1), 12.
<https://doi.org/10.1038/s41421-021-00243-8>

Mackay, W. D. (1965). Role of Splenomegaly in Tumour-bearing Mice. *Nature*, 205(4974), 918-919. <https://doi.org/10.1038/205918a0>

Mahato, B., Kaya, K. D., Fan, Y., Sumien, N., Shetty, R. A., Zhang, W., Davis, D., Mock, T., Batabyal, S., Ni, A., Mohanty, S., Han, Z., Farjo, R., Forster, M. J., Swaroop, A., & Chavala, S. H. (2020). Pharmacologic fibroblast reprogramming into photoreceptors restores vision. *Nature*, 581(7806), 83-88. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2201-4>

Maherali, N., & Hochedlinger, K. (2009). Tgfb β Signal Inhibition Cooperates in the Induction of iPSCs and Replaces Sox2 and cMyc. *Current Biology*, 19(20), 1718-1723.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.025>

Mahmoudi, S., & Brunet, A. (2012). Aging and reprogramming: A two-way street. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(6), 744-756. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.10.004>

Manukyan, M., & Singh, P. B. (2012). Epigenetic rejuvenation. *Genes to Cells*, 17(5), 337-343.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2012.01595.x>

Manukyan, M., & Singh, P. B. (2014). Epigenome rejuvenation: HP1 β mobility as a measure of pluripotent and senescent chromatin ground states. *Scientific Reports*, 4(1), 4789.
<https://doi.org/10.1038/srep04789>

Marión, R. M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M., & Blasco, M. A. (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature*, 460(7259), 1149-1153.
<https://doi.org/10.1038/nature08287>

McKenzie, M., Liolitsa, D., Akinshina, N., Campanella, M., Sisodiya, S., Hargreaves, I., Nirmalanathan, N., Sweeney, M. G., Abou-Sleiman, P. M., Wood, N. W., Hanna, M. G., & Duchon, M. R. (2007). Mitochondrial ND5 Gene Variation Associated with Encephalomyopathy and Mitochondrial ATP Consumption. *Journal of Biological Chemistry*, 282(51), 36845-36852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704158200>

Mills, E. L., Harmon, C., Jedrychowski, M. P., Xiao, H., Garrity, R., Tran, N. V., Bradshaw, G. A., Fu, A., Szpyt, J., Reddy, A., Prendeville, H., Danial, N. N., Gygi, S. P., Lynch, L., & Chouchani, E. T. (2021). UCP1 governs liver extracellular succinate and

- inflammatory pathogenesis. *Nature Metabolism*, 3(5), 604-617. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00389-5>
- Mirzai, S., Carbone, S., Batsis, J. A., Kritchevsky, S. B., Kitzman, D. W., & Shapiro, M. D. (2024). Sarcopenic Obesity and Cardiovascular Disease: An Overlooked but High-Risk Syndrome. *Current Obesity Reports*, 13(3), 532-544. <https://doi.org/10.1007/s13679-024-00571-2>
- Mitchell, W., Goeminne, L. J., Tyshkovskiy, A., Zhang, S., Chen, J. Y., Paulo, J. A., Pierce, K. A., Choy, A. H., Clish, C. B., Gygi, S. P., & Gladyshev, V. N. (2024). Multi-omics characterization of partial chemical reprogramming reveals evidence of cell rejuvenation. *eLife*, 12, RP90579. <https://doi.org/10.7554/eLife.90579>
- Mittelbrunn, M., & Kroemer, G. (2021). Hallmarks of T cell aging. *Nature Immunology*, 22(6), 687-698. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00927-z>
- Miwa, S., Kashyap, S., Chini, E., & Von Zglinicki, T. (2022). Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. *Journal of Clinical Investigation*, 132(13), e158447. <https://doi.org/10.1172/JCI158447>
- Mosteiro, L., Pantoja, C., Alcazar, N., Marión, R. M., Chondronasiou, D., Rovira, M., Fernandez-Marcos, P. J., Muñoz-Martin, M., Blanco-Aparicio, C., Pastor, J., Gómez-López, G., De Martino, A., Blasco, M. A., Abad, M., & Serrano, M. (2016). Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science*, 354(6315), aaf4445. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4445>
- Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(7), 482-496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochizuki, Y., Takizawa, N., & Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology*, 26(1), 101-106. <https://doi.org/10.1038/nbt1374>
- Narita, M., Nuñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., & Lowe, S. W. (2003). Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. *Cell*, 113(6), 703-716. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00401-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00401-X)
- Nelson, G., Kucheryavenko, O., Wordsworth, J., & Von Zglinicki, T. (2018). The senescent bystander effect is caused by ROS-activated NF- κ B signalling. *Mechanisms of Ageing and Development*, 170, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.08.005>

- Nicolaidis, S. (2008). Prenatal imprinting of postnatal specific appetites and feeding behavior. *Metabolism*, 57, S22-S26. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.07.004>
- Nicolaidis, S. (2019). Environment and obesity. *Metabolism*, 100, 153942. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.07.006>
- Nishimura, K., Sano, M., Ohtaka, M., Furuta, B., Umemura, Y., Nakajima, Y., Ikehara, Y., Kobayashi, T., Segawa, H., Takayasu, S., Sato, H., Motomura, K., Uchida, E., Kanayasu-Toyoda, T., Asashima, M., Nakauchi, H., Yamaguchi, T., & Nakanishi, M. (2011). Development of Defective and Persistent Sendai Virus Vector. *Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4760-4771. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.183780>
- Novakova, Z., Hubackova, S., Kosar, M., Janderova-Rossmeislova, L., Dobrovolna, J., Vasicova, P., Vancurova, M., Horejsi, Z., Hozak, P., Bartek, J., & Hodny, Z. (2010). Cytokine expression and signaling in drug-induced cellular senescence. *Oncogene*, 29(2), 273-284. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.318>
- Ocampo, A., Reddy, P., Martinez-Redondo, P., Platero-Luengo, A., Hatanaka, F., Hishida, T., Li, M., Lam, D., Kurita, M., Beyret, E., Araoka, T., Vazquez-Ferrer, E., Donoso, D., Roman, J. L., Xu, J., Rodriguez Esteban, C., Nuñez, G., Nuñez Delicado, E., Campistol, J. M., ... Izpisua Belmonte, J. C. (2016). In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell*, 167(7), 1719-1733.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.052>
- Ogrodnik, M., Carlos Acosta, J., Adams, P. D., d'Adda Di Fagagna, F., Baker, D. J., Bishop, C. L., Chandra, T., Collado, M., Gil, J., Gorgoulis, V., Gruber, F., Hara, E., Jansen-Dürr, P., Jurk, D., Khosla, S., Kirkland, J. L., Krizhanovsky, V., Minamino, T., Niedernhofer, L. J., ... Demaria, M. (2024). Guidelines for minimal information on cellular senescence experimentation in vivo. *Cell*, 187(16), 4150-4175. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.05.059>
- Ogrodnik, M., Miwa, S., Tchkonina, T., Tiniakos, D., Wilson, C. L., Lahat, A., Day, C. P., Burt, A., Palmer, A., Anstee, Q. M., Grellescheid, S. N., Hoeijmakers, J. H. J., Barnhoorn, S., Mann, D. A., Bird, T. G., Vermeij, W. P., Kirkland, J. L., Passos, J. F., Von Zglinicki, T., & Jurk, D. (2017). Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nature Communications*, 8(1), 15691. <https://doi.org/10.1038/ncomms15691>
- Ogrunc, M., Di Micco, R., Liontos, M., Bombardelli, L., Mione, M., Fumagalli, M., Gorgoulis, V. G., & d'Adda Di Fagagna, F. (2014). Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation. *Cell Death & Differentiation*, 21(6), 998-1012. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.16>
- Ohnishi, K., Semi, K., Yamamoto, T., Shimizu, M., Tanaka, A., Mitsunaga, K., Okita, K., Osafune, K., Arioka, Y., Maeda, T., Soejima, H., Moriwaki, H., Yamanaka, S., Woltjen,

- K., & Yamada, Y. (2014). Premature Termination of Reprogramming In Vivo Leads to Cancer Development through Altered Epigenetic Regulation. *Cell*, *156*(4), 663-677. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.005>
- Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, *448*(7151), 313-317. <https://doi.org/10.1038/nature05934>
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2008). Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science*, *322*(5903), 949-953. <https://doi.org/10.1126/science.1164270>
- Olova, N., Simpson, D. J., Marioni, R. E., & Chandra, T. (2019). Partial reprogramming induces a steady decline in epigenetic age before loss of somatic identity. *Aging Cell*, *18*(1), e12877. <https://doi.org/10.1111/acel.12877>
- Paine, P. T., Nguyen, A., & Ocampo, A. (2024). Partial cellular reprogramming: A deep dive into an emerging rejuvenation technology. *Aging Cell*, *23*(2), e14039. <https://doi.org/10.1111/acel.14039>
- Panganiban, R. A. M., & Day, R. M. (2013). Inhibition of IGF-1R Prevents Ionizing Radiation-Induced Primary Endothelial Cell Senescence. *PLoS ONE*, *8*(10), e78589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078589>
- Park, I.-H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W., & Daley, G. Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, *451*(7175), 141-146. <https://doi.org/10.1038/nature06534>
- Parras, A., Vílchez-Acosta, A., Desdín-Micó, G., Picó, S., Mrabti, C., Montenegro-Borbolla, E., Maroun, C. Y., Haghani, A., Brooke, R., Del Carmen Maza, M., Rechsteiner, C., Battiston, F., Branchina, C., Perez, K., Horvath, S., Bertelli, C., Sempoux, C., & Ocampo, A. (2023). In vivo reprogramming leads to premature death linked to hepatic and intestinal failure. *Nature Aging*, *3*(12), 1509-1520. <https://doi.org/10.1038/s43587-023-00528-5>
- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., & Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nature Cell Biology*, *5*(8), 741-747. <https://doi.org/10.1038/ncb1024>
- Passos, J. F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C. J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., Saretzki, G., Rudolph, K. L., Kirkwood, T. B. L., & Von Zglinicki, T. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Molecular Systems Biology*, *6*(1), 347. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.5>

- Passos, J. F., Saretzki, G., Ahmed, S., Nelson, G., Richter, T., Peters, H., Wappler, I., Birket, M. J., Harold, G., Schaeuble, K., Birch-Machin, M. A., Kirkwood, T. B. L., & Von Zglinicki, T. (2007). Mitochondrial Dysfunction Accounts for the Stochastic Heterogeneity in Telomere-Dependent Senescence. *PLoS Biology*, 5(5), e110. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050110>
- Pati, S., Irfan, W., Jameel, A., Ahmed, S., & Shahid, R. K. (2023). Obesity and Cancer: A Current Overview of Epidemiology, Pathogenesis, Outcomes, and Management. *Cancers*, 15(2), 485. <https://doi.org/10.3390/cancers15020485>
- Pedrosa, P., Zhang, Z., Nuñez-Quintela, V., Macias, D., Ge, J., Denholm, M., Dyas, A., Estevez-Souto, V., Lado-Fernandez, P., Gonzalez, P., Gomez, M., Martin, J. E., Da Silva-Alvarez, S., Collado, M., & Muñoz-Espín, D. (2024). Inhibition of lung tumorigenesis by transient reprogramming in cancer cells. *Cell Death & Disease*, 15(11), 857. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-07207-2>
- Pérez, L. M., Pareja-Galeano, H., Sanchis-Gomar, F., Emanuele, E., Lucia, A., & Gálvez, B. G. (2016). ‘Adipaging’: Ageing and obesity share biological hallmarks related to a dysfunctional adipose tissue. *The Journal of Physiology*, 594(12), 3187-3207. <https://doi.org/10.1113/JP271691>
- Perez-Lanzon, M., Maiuri, M. C., Lopez-Otin, C., & Kroemer, G. (2024). Preclinical models of breast cancer: B6BC, a transplantable hormone receptor-positive C57BL/6 mouse cell line. *Genes & Immunity*, 25(2), 172-174. <https://doi.org/10.1038/s41435-023-00241-8>
- Prieur, A., & Peeper, D. S. (2008). Cellular senescence in vivo: A barrier to tumorigenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(2), 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.01.007>
- Puisieux, A., Pommier, R. M., Morel, A.-P., & Laval, F. (2018). Cellular Pliancy and the Multistep Process of Tumorigenesis. *Cancer Cell*, 33(2), 164-172. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.007>
- Reed, M. J., Karres, N., Eyman, D., Cruz, A., Brekken, R. A., & Plymate, S. (2007). The effects of aging on tumor growth and angiogenesis are tumor-cell dependent. *International Journal of Cancer*, 120(4), 753-760. <https://doi.org/10.1002/ijc.22351>
- Reyad-ul-Ferdous, Md., Gul, I., Raheem, M. A., Pandey, V., & Qin, P. (2024). Mitochondrial UCP1: Potential thermogenic mechanistic switch for the treatment of obesity and neurodegenerative diseases using natural and epigenetic drug candidates. *Phytomedicine*, 130, 155672. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2024.155672>

- Rizwan, H., Pal, S., Sabnam, S., & Pal, A. (2020). High glucose augments ROS generation regulates mitochondrial dysfunction and apoptosis via stress signalling cascades in keratinocytes. *Life Sciences*, *241*, 117148. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117148>
- Robbins, E., Levine, E. M., & Eagle, H. (1970). MORPHOLOGIC CHANGES ACCOMPANYING SENESENCE OF CULTURED HUMAN DIPLOID CELLS. *The Journal of Experimental Medicine*, *131*(6), 1211-1222. <https://doi.org/10.1084/jem.131.6.1211>
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology*, *192*(4), 547-556. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094>
- Rodier, F., Muñoz, D. P., Teachenor, R., Chu, V., Le, O., Bhaumik, D., Coppé, J.-P., Campeau, E., Beauséjour, C. M., Kim, S.-H., Davalos, A. R., & Campisi, J. (2011). DNA-SCARS: Distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *Journal of Cell Science*, *124*(1), 68-81. <https://doi.org/10.1242/jcs.071340>
- Rodríguez-Matellán, A., Alcazar, N., Hernández, F., Serrano, M., & Ávila, J. (2020). In Vivo Reprogramming Ameliorates Aging Features in Dentate Gyrus Cells and Improves Memory in Mice. *Stem Cell Reports*, *15*(5), 1056-1066. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.09.010>
- Rohde, K., Keller, M., La Cour Poulsen, L., Blüher, M., Kovacs, P., & Böttcher, Y. (2019). Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism*, *92*, 37-50. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.10.007>
- Sahu, S. K., Reddy, P., Lu, J., Shao, Y., Wang, C., Tsuji, M., Delicado, E. N., Rodriguez Esteban, C., & Belmonte, J. C. I. (2024). Targeted partial reprogramming of age-associated cell states improves markers of health in mouse models of aging. *Science Translational Medicine*, *16*(764), eadg1777. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adg1777>
- Saklayen, M. G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Current Hypertension Reports*, *20*(2), 12. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>
- Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., & Narita, M. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes & Development*, *28*(2), 99-114. <https://doi.org/10.1101/gad.235184.113>
- Salminen, A., Kauppinen, A., & Kaarniranta, K. (2012). Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cellular Signalling*, *24*(4), 835-845. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.12.006>

- Saltiel, A. R., & Olefsky, J. M. (2017). Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(1), 1-4. <https://doi.org/10.1172/JCI92035>
- Salvestrini, V., Sell, C., & Lorenzini, A. (2019). Obesity May Accelerate the Aging Process. *Frontiers in Endocrinology*, *10*, 266. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00266>
- Sánchez Alvarado, A., & Yamanaka, S. (2014). Rethinking Differentiation: Stem Cells, Regeneration, and Plasticity. *Cell*, *157*(1), 110-119. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.041>
- Santos, A. L., & Sinha, S. (2021). Obesity and aging: Molecular mechanisms and therapeutic approaches. *Ageing Research Reviews*, *67*, 101268. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101268>
- Sarkar, T. J., Quarta, M., Mukherjee, S., Colville, A., Paine, P., Doan, L., Tran, C. M., Chu, C. R., Horvath, S., Qi, L. S., Bhutani, N., Rando, T. A., & Sebastiano, V. (2020). Transient non-integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells. *Nature Communications*, *11*(1), 1545. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15174-3>
- Saul, D., Kosinsky, R. L., Atkinson, E. J., Doolittle, M. L., Zhang, X., LeBrasseur, N. K., Pignolo, R. J., Robbins, P. D., Niedernhofer, L. J., Ikeno, Y., Jurk, D., Passos, J. F., Hickson, L. J., Xue, A., Monroe, D. G., Tchkonja, T., Kirkland, J. L., Farr, J. N., & Khosla, S. (2022). A new gene set identifies senescent cells and predicts senescence-associated pathways across tissues. *Nature Communications*, *13*(1), 4827. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32552-1>
- Schmitt, C. A., Fridman, J. S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R. M., & Lowe, S. W. (2002). A Senescence Program Controlled by p53 and p16INK4a Contributes to the Outcome of Cancer Therapy. *Cell*, *109*(3), 335-346. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00734-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00734-1)
- Schoenfeldt, L., Paine, P. T., Kamaludeen M., N. H., Phelps, G. B., Mrabti, C., Perez, K., & Ocampo, A. (2022). *Chemical reprogramming ameliorates cellular hallmarks of aging and extends lifespan*. <https://doi.org/10.1101/2022.08.29.505222>
- Sedelnikova, O. A., Horikawa, I., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Bonner, W. M., & Barrett, J. C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nature Cell Biology*, *6*(2), 168-170. <https://doi.org/10.1038/ncb1095>

- Semi, K., Matsuda, Y., Ohnishi, K., & Yamada, Y. (2013). Cellular reprogramming and cancer development. *International Journal of Cancer*, 132(6), 1240-1248. <https://doi.org/10.1002/ijc.27963>
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88(5), 593-602. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81902-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81902-9)
- Sharpless, N. E. (2005). INK4a/ARF: A multifunctional tumor suppressor locus. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 576(1-2), 22-38. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.08.021>
- Shenghui, H., Nakada, D., & Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25(1), 377-406. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113248>
- Simpson, D. J., Olova, N. N., & Chandra, T. (2021). Cellular reprogramming and epigenetic rejuvenation. *Clinical Epigenetics*, 13(1), 170. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01158-7>
- Singh, P. B., & Zacouto, F. (2010). Nuclear reprogramming and epigenetic rejuvenation. *Journal of Biosciences*, 35(2), 315-319. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0034-2>
- Singh, R., Barrios, A., Dirakvand, G., & Pervin, S. (2021). Human Brown Adipose Tissue and Metabolic Health: Potential for Therapeutic Avenues. *Cells*, 10(11), 3030. <https://doi.org/10.3390/cells10113030>
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., & Hochedlinger, K. (2008). Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. *Science*, 322(5903), 945-949. <https://doi.org/10.1126/science.1162494>
- Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M. C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., & Keyes, W. M. (2013). Senescence Is a Developmental Mechanism that Contributes to Embryonic Growth and Patterning. *Cell*, 155(5), 1119-1130. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.041>
- Suvà, M. L., Riggi, N., & Bernstein, B. E. (2013). Epigenetic Reprogramming in Cancer. *Science*, 339(6127), 1567-1570. <https://doi.org/10.1126/science.1230184>
- Tada, M. (1997). Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *The EMBO Journal*, 16(21), 6510-6520. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.21.6510>

- Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., & Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current Biology*, *11*(19), 1553-1558. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00459-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00459-6)
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, *131*(5), 861-872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, *126*(4), 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(3), 183-193. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.8>
- Takasugi, M., Yoshida, Y., Hara, E., & Ohtani, N. (2023). The role of cellular senescence and SASP in tumour microenvironment. *The FEBS Journal*, *290*(5), 1348-1361. <https://doi.org/10.1111/febs.16381>
- Tam, B. T., Morais, J. A., & Santosa, S. (2020). Obesity and ageing: Two sides of the same coin. *Obesity Reviews*, *21*(4), e12991. <https://doi.org/10.1111/obr.12991>
- Tentolouris, N., Liatis, S., & Katsilambros, N. (2006). Sympathetic System Activity in Obesity and Metabolic Syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1083*(1), 129-152. <https://doi.org/10.1196/annals.1367.010>
- Trim, W., Turner, J. E., & Thompson, D. (2018). Parallels in Immunometabolic Adipose Tissue Dysfunction with Ageing and Obesity. *Frontiers in Immunology*, *9*, 169. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00169>
- Tsuji, O., Miura, K., Okada, Y., Fujiyoshi, K., Mukaino, M., Nagoshi, N., Kitamura, K., Kumagai, G., Nishino, M., Tomisato, S., Higashi, H., Nagai, T., Katoh, H., Kohda, K., Matsuzaki, Y., Yuzaki, M., Ikeda, E., Toyama, Y., Nakamura, M., ... Okano, H. (2010). Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(28), 12704-12709. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910106107>
- Tsukita, S., Yamada, T., Uno, K., Takahashi, K., Kaneko, K., Ishigaki, Y., Imai, J., Hasegawa, Y., Sawada, S., Ishihara, H., Oka, Y., & Katagiri, H. (2012). Hepatic Glucokinase Modulates Obesity Predisposition by Regulating BAT Thermogenesis via Neural Signals. *Cell Metabolism*, *16*(6), 825-832. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.11.006>

- Turenne, G. A., Paul, P., Laflair, L., & Price, B. D. (2001). Activation of p53 transcriptional activity requires ATM's kinase domain and multiple N-terminal serine residues of p53. *Oncogene*, *20*(37), 5100-5110. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204665>
- Turrell, F. K., Kerr, E. M., Gao, M., Thorpe, H., Doherty, G. J., Cridge, J., Shorthouse, D., Speed, A., Samarajiwa, S., Hall, B. A., Griffiths, M., & Martins, C. P. (2017). Lung tumors with distinct p53 mutations respond similarly to p53 targeted therapy but exhibit genotype-specific statin sensitivity. *Genes & Development*, *31*(13), 1339-1353. <https://doi.org/10.1101/gad.298463.117>
- Utikal, J., Polo, J. M., Stadtfeld, M., Maherali, N., Kulalert, W., Walsh, R. M., Khalil, A., Rheinwald, J. G., & Hochedlinger, K. (2009). Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature*, *460*(7259), 1145-1148. <https://doi.org/10.1038/nature08285>
- Ventura, A., Kirsch, D. G., McLaughlin, M. E., Tuveson, D. A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E. E., Weissleder, R., & Jacks, T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*, *445*(7128), 661-665. <https://doi.org/10.1038/nature05541>
- Victorelli, S., Salmonowicz, H., Chapman, J., Martini, H., Vizioli, M. G., Riley, J. S., Cloix, C., Hall-Younger, E., Machado Espindola-Netto, J., Jurk, D., Lagnado, A. B., Sales Gomez, L., Farr, J. N., Saul, D., Reed, R., Kelly, G., Eppard, M., Greaves, L. C., Dou, Z., ... Passos, J. F. (2023). Apoptotic stress causes mtDNA release during senescence and drives the SASP. *Nature*, *622*(7983), 627-636. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06621-4>
- Vijgen, G. H. E. J., Bouvy, N. D., Teule, G. J. J., Brans, B., Schrauwen, P., & Van Marken Lichtenbelt, W. D. (2011). Brown Adipose Tissue in Morbidly Obese Subjects. *PLoS ONE*, *6*(2), e17247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017247>
- Von Joest, M., Chen, C., Douché, T., Chantrel, J., Chiche, A., Gianetto, Q. G., Matondo, M., & Li, H. (2022). Amphiregulin mediates non-cell-autonomous effect of senescence on reprogramming. *Cell Reports*, *40*(2), 111074. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111074>
- Waddington, C. H. (1957). *The Strategy of the Genes* (0 ed.). Routledge. <https://doi.org/10.4324/9781315765471>
- Wagner, K.-D., & Wagner, N. (2022). The Senescence Markers p16INK4A, p14ARF/p19ARF, and p21 in Organ Development and Homeostasis. *Cells*, *11*(12), 1966. <https://doi.org/10.3390/cells11121966>

- Wahl, S., Drong, A., Lehne, B., Loh, M., Scott, W. R., Kunze, S., Tsai, P.-C., Ried, J. S., Zhang, W., Yang, Y., Tan, S., Fiorito, G., Franke, L., Guarrera, S., Kasela, S., Kriebel, J., Richmond, R. C., Adamo, M., Afzal, U., ... Chambers, J. C. (2017). Epigenome-wide association study of body mass index, and the adverse outcomes of adiposity. *Nature*, *541*(7635), 81-86. <https://doi.org/10.1038/nature20784>
- Wallis, R., Milligan, D., Hughes, B., Mizen, H., López-Domínguez, J. A., Eduputa, U., Tyler, E. J., Serrano, M., & Bishop, C. L. (2022). Senescence-associated morphological profiles (SAMPs): An image-based phenotypic profiling method for evaluating the inter and intra model heterogeneity of senescence. *Aging*, *14*(10), 4220-4246. <https://doi.org/10.18632/aging.204072>
- Wallis, R., Mizen, H., & Bishop, C. L. (2020). The bright and dark side of extracellular vesicles in the senescence-associated secretory phenotype. *Mechanisms of Ageing and Development*, *189*, 111263. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111263>
- Wang, B., Han, J., Elisseeff, J. H., & Demaria, M. (2024). The senescence-associated secretory phenotype and its physiological and pathological implications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *25*(12), 958-978. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00727-x>
- Wang, B., Varela-Eirin, M., Brandenburg, S. M., Hernandez-Segura, A., Van Vliet, T., Jongbloed, E. M., Wilting, S. M., Ohtani, N., Jager, A., & Demaria, M. (2022). Pharmacological CDK4/6 inhibition reveals a p53-dependent senescent state with restricted toxicity. *The EMBO Journal*, *41*(6), e108946. <https://doi.org/10.15252/embj.2021108946>
- Wang, C., Rabadan Ros, R., Martinez-Redondo, P., Ma, Z., Shi, L., Xue, Y., Guillen-Guillen, I., Huang, L., Hishida, T., Liao, H.-K., Nuñez Delicado, E., Rodriguez Esteban, C., Guillen-Garcia, P., Reddy, P., & Izpisua Belmonte, J. C. (2021). In vivo partial reprogramming of myofibers promotes muscle regeneration by remodeling the stem cell niche. *Nature Communications*, *12*(1), 3094. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23353-z>
- Wang, J., Sun, S., & Deng, H. (2023). Chemical reprogramming for cell fate manipulation: Methods, applications, and perspectives. *Cell Stem Cell*, *30*(9), 1130-1147. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2023.08.001>
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P. K., Smith, Z. D., Meissner, A., Daley, G. Q., Brack, A. S., Collins, J. J., Cowan, C., Schlaeger, T. M., & Rossi, D. J. (2010). Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell*, *7*(5), 618-630. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.012>

- Wei, D., Wang, L., Yan, Y., Jia, Z., Gagea, M., Li, Z., Zuo, X., Kong, X., Huang, S., & Xie, K. (2016). KLF4 Is Essential for Induction of Cellular Identity Change and Acinar-to-Ductal Reprogramming during Early Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer Cell*, 29(3), 324-338. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.02.005>
- Weinberg, R. A. (1991). Tumor Suppressor Genes. *Science*, 254(5035), 1138-1146. <https://doi.org/10.1126/science.1659741>
- Weissman, I. L., Anderson, D. J., & Gage, F. (2001). Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17(1), 387-403. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.387>
- Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J. P., & Jaenisch, R. (2008). C-Myc Is Dispensable for Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2(1), 10-12. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.12.001>
- Wernig, M., Zhao, J.-P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., Broccoli, V., Constantine-Paton, M., Isacson, O., & Jaenisch, R. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), 5856-5861. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801677105>
- Wiley, C. D., Velarde, M. C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E. A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H. W., Davis, S. S., Ramanathan, A., Gerencser, A. A., Verdin, E., & Campisi, J. (2016). Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metabolism*, 23(2), 303-314. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.011>
- Wilmot, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), 810-813. <https://doi.org/10.1038/385810a0>
- Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., Kaji, K., Sung, H.-K., & Nagy, A. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 458(7239), 766-770. <https://doi.org/10.1038/nature07863>
- Xia, W., Veeragandham, P., Cao, Y., Xu, Y., Rhyne, T. E., Qian, J., Hung, C.-W., Zhao, P., Jones, Y., Gao, H., Liddle, C., Yu, R. T., Downes, M., Evans, R. M., Rydén, M., Wabitsch, M., Wang, Z., Hakoziaki, H., Schöneberg, J., ... Saltiel, A. R. (2024). Obesity causes mitochondrial fragmentation and dysfunction in white adipocytes due to RalA activation. *Nature Metabolism*, 6(2), 273-289. <https://doi.org/10.1038/s42255-024-00978-0>

- Xie, X., Fu, Y., & Liu, J. (2017). Chemical reprogramming and transdifferentiation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 46, 104-113. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.07.003>
- Xiong, S., Feng, Y., & Cheng, L. (2019). Cellular Reprogramming as a Therapeutic Target in Cancer. *Trends in Cell Biology*, 29(8), 623-634. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.05.001>
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R. A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., & Lowe, S. W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, 445(7128), 656-660. <https://doi.org/10.1038/nature05529>
- Yamakoshi, K., Takahashi, A., Hirota, F., Nakayama, R., Ishimaru, N., Kubo, Y., Mann, D. J., Ohmura, M., Hirao, A., Saya, H., Arase, S., Hayashi, Y., Nakao, K., Matsumoto, M., Ohtani, N., & Hara, E. (2009). Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *Journal of Cell Biology*, 186(3), 393-407. <https://doi.org/10.1083/jcb.200904105>
- Yang, J.-H., Petty, C. A., Dixon-McDougall, T., Lopez, M. V., Tyshkovskiy, A., Maybury-Lewis, S., Tian, X., Ibrahim, N., Chen, Z., Griffin, P. T., Arnold, M., Li, J., Martinez, O. A., Behn, A., Rogers-Hammond, R., Angeli, S., Gladyshev, V. N., & Sinclair, D. A. (2023). Chemically induced reprogramming to reverse cellular aging. *Aging*, 15(13), 5966-5989. <https://doi.org/10.18632/aging.204896>
- Yin, J.-C., Zhang, L., Ma, N.-X., Wang, Y., Lee, G., Hou, X.-Y., Lei, Z.-F., Zhang, F.-Y., Dong, F.-P., Wu, G.-Y., & Chen, G. (2019). Chemical Conversion of Human Fetal Astrocytes into Neurons through Modulation of Multiple Signaling Pathways. *Stem Cell Reports*, 12(3), 488-501. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.01.003>
- Youdim, M. B. H., Aronson, J. K., Blau, K., Green, A. R., & Grahame-Smith, D. G. (1979). Tranlylcypromine ('Parnate') overdose: Measurement of tranlylcypromine concentrations and MAO inhibitory activity and identification of amphetamines in plasma. *Psychological Medicine*, 9(2), 377-382. <https://doi.org/10.1017/S0033291700030890>
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2009). Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science*, 324(5928), 797-801. <https://doi.org/10.1126/science.1172482>
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*, 318(5858), 1917-1920. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>

- Zatterale, F., Raciti, G. A., Prevezano, I., Leone, A., Campitelli, M., De Rosa, V., Beguinot, F., & Parrillo, L. (2022). Epigenetic Reprogramming of the Inflammatory Response in Obesity and Type 2 Diabetes. *Biomolecules*, *12*(7), 982. <https://doi.org/10.3390/biom12070982>
- Zhang, L., Pitcher, L. E., Prahalad, V., Niedernhofer, L. J., & Robbins, P. D. (2023). Targeting cellular senescence with senotherapeutics: Senolytics and senomorphics. *The FEBS Journal*, *290*(5), 1362-1383. <https://doi.org/10.1111/febs.16350>
- Zhang, L., Yin, J.-C., Yeh, H., Ma, N.-X., Lee, G., Chen, X. A., Wang, Y., Lin, L., Chen, L., Jin, P., Wu, G.-Y., & Chen, G. (2015). Small Molecules Efficiently Reprogram Human Astroglial Cells into Functional Neurons. *Cell Stem Cell*, *17*(6), 735-747. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.012>
- Zhang, M., Lin, Y.-H., Sun, Y. J., Zhu, S., Zheng, J., Liu, K., Cao, N., Li, K., Huang, Y., & Ding, S. (2016). Pharmacological Reprogramming of Fibroblasts into Neural Stem Cells by Signaling-Directed Transcriptional Activation. *Cell Stem Cell*, *18*(5), 653-667. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.03.020>
- Zhang, S., Xiao, X., Yi, Y., Wang, X., Zhu, L., Shen, Y., Lin, D., & Wu, C. (2024). Tumor initiation and early tumorigenesis: Molecular mechanisms and interventional targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *9*(1), 149. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01848-7>
- Zou, Y., Zhang, N., Ellerby, L. M., Davalos, A. R., Zeng, X., Campisi, J., & Desprez, P.-Y. (2012). Responses of human embryonic stem cells and their differentiated progeny to ionizing radiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *426*(1), 100-105. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.043>

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Paisaje epigenético de Waddington	25
Figura 2. Representación esquemática del primer modelo de ratón reprogramable	26
Figura 3. Representación esquemática de reprogramación completa y parcial	30
Figura 4. Esquema de los distintos mecanismos moleculares que inducen la entrada en senescencia.....	32
Figura 5. Esquema de las características de la senescencia celular	34
Figura 6. Efectos positivos y negativos de la senescencia	38
Figura 7. Relación entre la senescencia y la reprogramación celular	40
Figura 8. Características clave de las células cancerígenas	41
Figura 9. La reprogramación puede dar lugar al rejuvenecimiento y a desarrollo tumoral	43
Figura 10. Relación entre la obesidad y el envejecimiento.....	47
Figura 11. Distribución espacial de la dosis suministrada	61
Figura 12. Inducción de senescencia celular mediante radiación X	76
Figura 13. Las células irradiadas siguen siendo senescentes tras expresar OSKM o ser tratadas con 2c	78
Figura 14. Análisis transcripcional mediante ARN-seq.....	79
Figura 15. Efecto senomórfico de OSKM y 2c.....	80
Figura 16. Disminución de la senescencia paracrina tras OSKM y 2c	82
Figura 17. Efecto de OSKM y 2c sobre la atracción de macrófagos	83
Figura 18. Reducción del efecto potenciador de la reprogramación tras OSKM o 2c	84
Figura 19. Reducción del efecto potenciador de la reprogramación tras OSKM o 2c <i>in vivo</i>	85
Figura 20. Efecto de OSKM y 2c sobre la disfunción mitocondrial.....	86
Figura 21. Representación esquemática del experimento de desarrollo tumoral en ratones viejos tras la reprogramación parcial.....	88
Figura 22. Reducción de progresión tumoral en el pulmón tras la reprogramación parcial	88

Figura 23. Reducción de progresión tumoral en la mama tras la reprogramación parcial	90
Figura 24. Análisis inmunohistoquímico de tumores de mama	91
Figura 25. Reprogramación parcial de animales obesos	93
Figura 26. Perfil glucémico de ratones obesos tras la reprogramación parcial	94
Figura 27. Perfil lipídico de ratones obesos tras la reprogramación parcial.....	95
Figura 28. Acumulación lipídica de adipocitos <i>in vitro</i>	96
Figura 29. Infiltración del sistema inmunitario en tejido graso.....	97
Figura 30. Termogénesis de ratones obesos tras la reprogramación parcial	98
Figura 31. Análisis del metabolismo lipídico hepático	99
Figura 32. Acumulación lipídica de hepatocitos <i>in vitro</i>	100
Figura S1. Datos complementarios para el análisis de proteínas secretadas de la Figura 15 .	152
Figura S2. Caracterización inmunológica de las poblaciones celulares en médula ósea	152
Figura S3. Medidas del grupo control con dieta estándar	153
Figura S4. Comprobación de la expresión de GFP tras la transducción con GFP/rtTA o con OSKM/rtTA en C3H10	153
Figura S5. Cuantificaciones individuales de los niveles proteicos.....	153

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos usados en las PCR de genotipado.	54
Tabla 2. Descripción de los ciclos utilizados para las PCR de genotipado.	54
Tabla 3. Lista de plásmidos empleados.	65
Tabla 4. Descripción de los ciclos utilizados para la PCR cuantitativa.	68
Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos usados en las PCR de genotipado.	68
Tabla 6. Anticuerpos primarios utilizados en el <i>Western blot</i>	71
Tabla 7. Anticuerpos secundarios utilizados en el <i>Western blot</i>	71
Tabla 8. Anticuerpos primarios utilizados para análisis inmunohistoquímico.	73

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE LAS FIGURAS

Las **Figuras 1-6** son de autoría propia.

La **Figura 7** ha sido adaptada del resumen gráfico de Mosteiro et al., 2016, con el permiso de *American Association for the Advancement of Science*.

La **Figura 8** ha sido adaptada de la Figura 3 de Hanahan & Weinberg, 2011, con el permiso de Elsevier.

La **Figura 9** ha sido adaptada de la Figura 1 de Huyghe et al., 2024, con el permiso de Elsevier.

Las **Figuras 10-32** son de autoría propia.

Las **Figuras S1-S5** son de autoría propia.

Las figuras de autoría propia y las figuras adaptadas se han generado con *Biorender*. Los gráficos se han representado usando *GraphPad Prism*.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

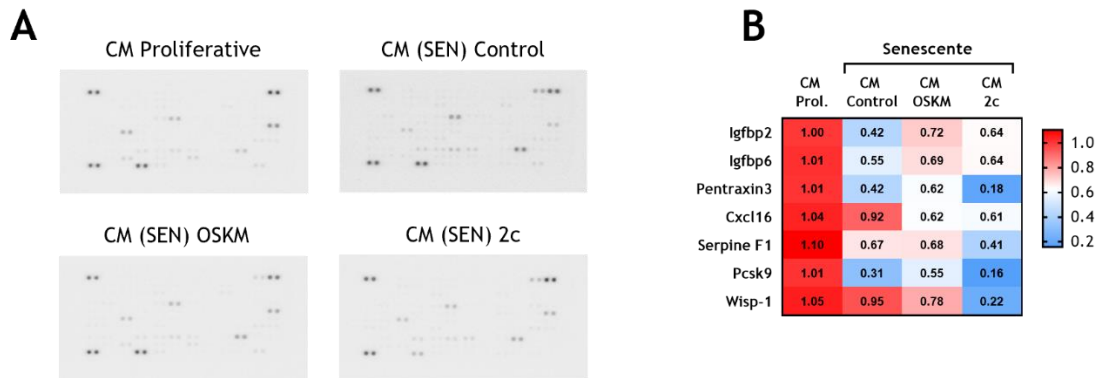


Figura S1. Datos complementarios para el análisis de proteínas secretadas de la Figura 15. (A) Membranas de Cytokine array. (B) Cuantificación de proteínas cuya presencia aumentaba en la condición proliferativa. (n=1)

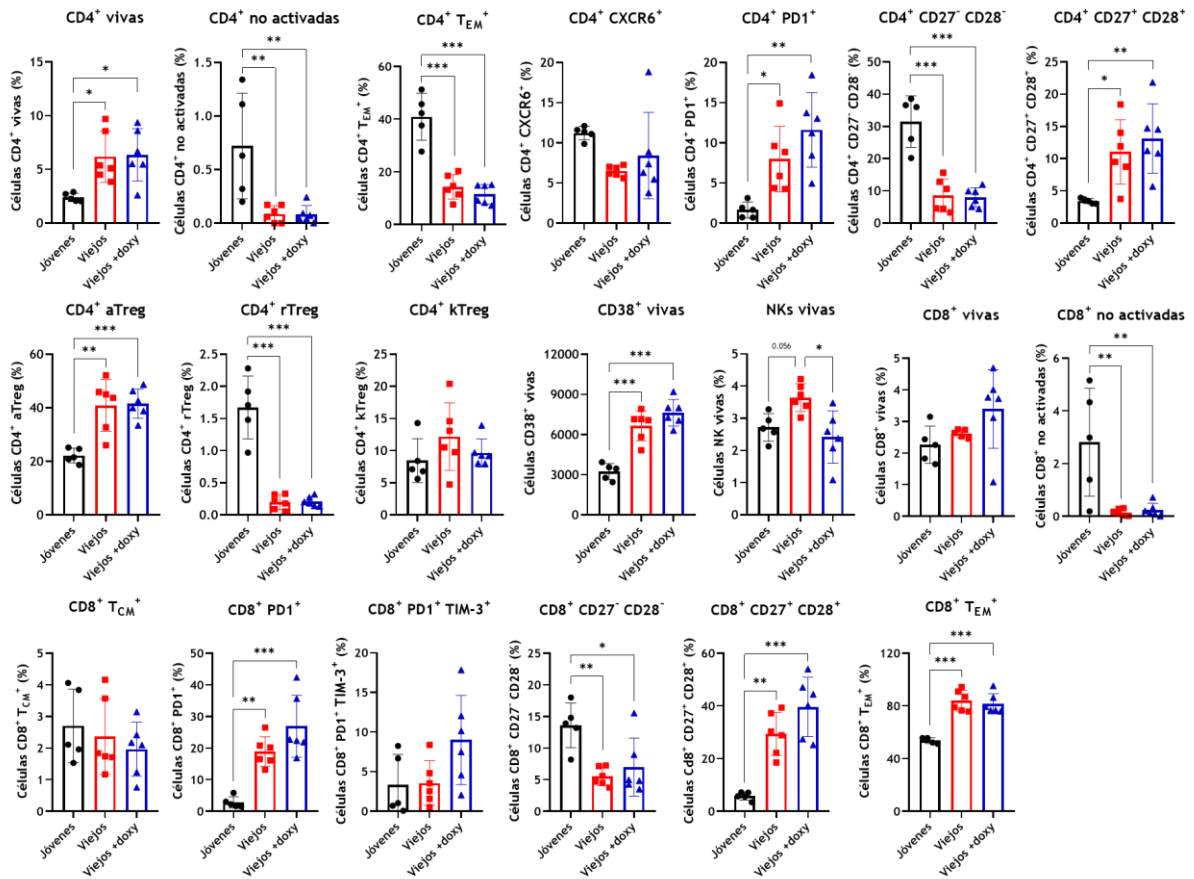


Figura S2. Caracterización inmunológica de las poblaciones celulares en médula ósea. Medición de las poblaciones celulares del sistema inmune en médula ósea de los ratones, mediante citometría de flujo. Se representan en abundancia relativa. La significancia estadística se analizó mediante el test ANOVA con el test *post hoc* de Tukey. (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001, (sin asterisco) no significativo. (n=6).

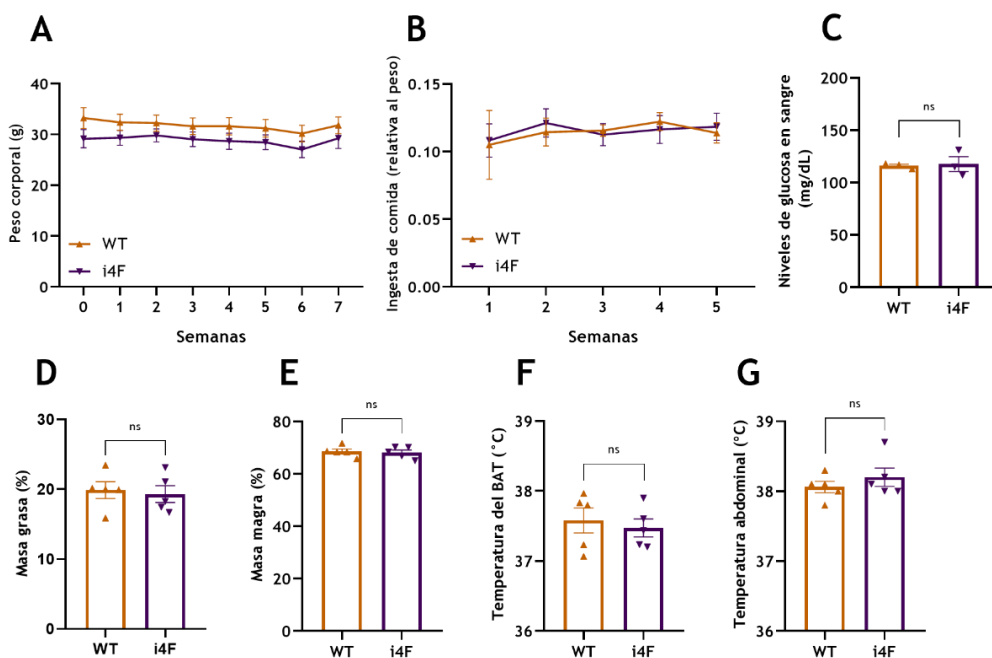


Figura S3. Medidas del grupo control con dieta estándar. (A) Representación de la variación del peso corporal durante el experimento. (B) Ingesta de comida durante el experimento, relativa al peso. (C) Medición de glucosa en sangre periférica de ratones obesos en ayunas. (D) Representación del porcentaje de masa grasa respecto al peso corporal total. (E) Representación del porcentaje de masa magra respecto al peso corporal total. (F) Medida de temperatura del BAT de los ratones, tomadas con cámara térmica. (G) Medida de temperatura abdominal de los ratones tomada con sonda rectal. La significancia estadística se analizó mediante el test t de student de dos colas. (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001, (ns) no significativo. (n=5).

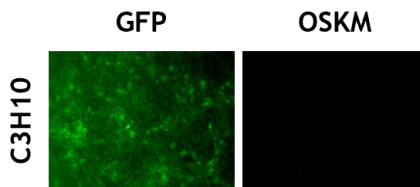


Figura S4. Comprobación de la expresión de GFP tras la transducción con GFP/rtTA o con OSKM/rtTA en C3H10. (n=3)

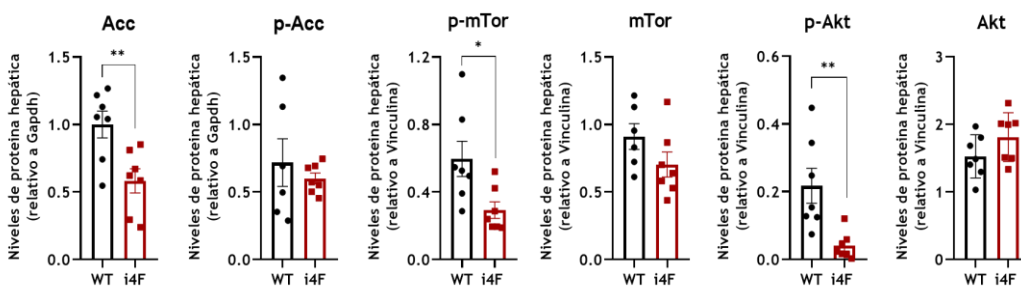


Figura S5. Cuantificaciones individuales de los niveles proteicos. Se midió mediante *Western blot* de Acc, p-Acc, p-mTor, mTor, p-Akt y Akt, con Vinculina y GAPDH como control de carga, según se indique. La significancia estadística se analizó mediante el test t de student de dos colas. (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001, (sin asterisco) no significativo (n=7).

AUTORIZACIONES PARA LA EDICIÓN Y USO DE MATERIAL GRÁFICO

Figura 7: adaptada del resumen gráfico de Mosteiro et al., 2016, con el permiso de *American Association for the Advancement of Science (AAAS)*.

REPRODUCING AAAS MATERIAL IN YOUR THESIS OR DISSERTATION

AAAS permits the use of content published in its journals but only provided the following criteria are met:

1. If you are using figures/tables, permission is granted for use in print and electronic versions of your dissertation or thesis.
2. A full text article may be used only in print versions of a dissertation or thesis. AAAS does not permit the reproduction of full text articles in electronic versions of theses or dissertations.
3. The following credit line must be printed along with the AAAS material: “From [Insert Full Reference Citation]/ Reprinted with permission from AAAS”.
4. All required credit lines and notices must be visible any time a user accesses any part of the AAAS material and must appear on any printed copies that an authorized user might make.
5. The AAAS material may not be modified or altered except that figures and tables may be modified with permission from the author. Author permission for any such changes must be secured prior to your use.
6. AAAS must publish the full paper prior to your use of any of its text or figures.
7. If the AAAS material covered by this permission was published in Science during the years 1974-1994, you must also obtain permission from the author, who may grant or withhold permission, and who may or may not charge a fee if permission is granted. See original article for author’s address. This condition does not apply to the news articles published in Science.
8. Permission covers the distribution of your dissertation or thesis on demand by a third party distributor (eg ProQuest/UMI), provided the AAAS material covered by this permission remains in situ and is not distributed by that third party outside of the context of your thesis/dissertation.
9. Permission does not apply to figures/photos/artwork or any other content or material included in your work that are credited to non-AAAS sources. If the requested material is sourced to or references non-AAAS sources, you must obtain authorization from that source as well before using that material. You agree to hold harmless and indemnify AAAS against any claims arising from your use of any content in your work that is credited to non-AAAS sources.
10. By using the AAAS Material identified in your request, you agree to abide by all the terms & conditions herein.
11. AAAS makes no representations or warranties as to the accuracy of any information contained in the AAAS material covered by this permission, including any warranties of merchantability or fitness for a particular purpose.

Elizabeth Sandler (Ms.)
 Rights & Permissions, *Science* family of journals
 American Association for the Advancement of Science (AAAS)
 1200 New York Avenue, NW | Washington, DC 20005
 E: esandler@aaas.org | Tel: +1-202-326-6765
www.aaas.org | www.science.org



Figura 8: adaptada de la Figura 3 de Hanahan & Weinberg, 2011, con el permiso de Elsevier.

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS
Feb 02, 2025

LICENSE DETAILS: This Agreement between Víctor Núñez Quintela ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5960841170906
License date	Feb 02, 2025
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Cell
Licensed Content Title Hallmarks of Cancer	The Next Generation
Licensed Content Author	Douglas Hanahan, Robert A. Weinberg
Licensed Content Date	Mar 4, 2011
Licensed Content Volume	144
Licensed Content Issue	5
Licensed Content Pages	29
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of translations	1
Title of new work	Reprogramación parcial como estrategia frente al envejecimiento, el cáncer y la obesidad
Institution name	Health Research Institute of Santiago de Compostela
Expected presentation date	Apr 2025
Portions	Figure 3
The Requesting Person to Appear on the License Specific Languages	Víctor Núñez Quintela Spanish
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12



Figura 9: adaptada de la Figura 1 de Huyghe et al., 2024, con el permiso de Elsevier.

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS
Feb 08, 2025

LICENSE DETAILS: This Agreement between Víctor Núñez Quintela ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5964170184121
License date	Feb 08, 2025
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Trends in Cell Biology
Licensed Content Title Hallmarks of Cancer	Cellular plasticity in reprogramming, rejuvenation and tumorigenesis: a pioneer TF perspective
Licensed Content Author	A. Huyghe, A. Trajkova, F. Lavial
Licensed Content Date	Mar 1, 2024
Licensed Content Volume	34
Licensed Content Issue	3
Licensed Content Pages	13
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of translations	1
Title of new work	Reprogramación parcial como estrategia frente al envejecimiento, el cáncer y la obesidad
Institution name	Health Research Institute of Santiago de Compostela
Expected presentation date	Apr 2025
Portions	Figure 1
The Requesting Person to Appear on the License	Víctor Núñez Quintela
Specific Languages	Spanish
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROYECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Departamento Territorial
Edificio Administrativo de Servizos Múltiples
Vicente Ferrer, 2
15071 – A Coruña

José Manuel Cifuentes
Departamento de Anatomía
Facultade de Veterinaria
Campus Universitario
27002 Lugo

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15010/17/001

Data de inicio: 24.02.2017

Interesado: Manuel Collado Rodríguez

Forma de inicio: solicitude do interesado

Procedemento: resolución de autorización

ANTECEDENTES

A persoa interesada, como representante do centro CIMUS (Universidade de Santiago de Compostela), presentou con data 24.02.2017 e rexistro de entrada 24199, unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal, cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: Células madre en cáncer y envejecimiento

Nome do centro usuario: CIMUS (USC)

Persoa responsable do proxecto: Manuel Collado Rodríguez

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Facultade de Medicina

Clasificación do proxecto : Tipo I Tipo II Tipo III

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1. O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.
2. O artigo 88 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.

REGISTRO XERAL DA XUNTA DE GALICIA
REGISTRO DO EDIFICIO ADMINISTRATIVO DA CORUÑA
A CORUÑA

SAÍDA 58403 / RX 756888

Data: 16/05/2017 08:11:13



CVE: MEFer20017
Verificador: <https://sede.xunta.gal/cve>





3. O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto, realizada polo órgano habilitado da Sección de Experimentación Animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co artigo 11 do Decreto 245/2009 de 30 de abril, polo que se regulan as delegacións territoriais da Xunta de Galicia (DOG 84, do 1 de maio de 2009) e o Decreto 166/2015, de 13 de novembro, polo que se aproba a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural (DOG 220, do 18 de novembro de 2015).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

- 1 Autorizar o proxecto solicitado.
- 2 O mencionado proxecto non precisa someterse a unha avaliación retrospectiva.
- 3 A autorización deste proxecto terá unha duración de cinco anos, transcorridos os cales, deberá ser renovada esta autorización.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida, no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirada, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non lle pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante a conselleira de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notifícaselle ao CIMUS da USC esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.

A Coruña, 10 de maio de 2017
O xefe territorial

Manuel Rodríguez Vázquez

Assinado por: RODRIGUEZ VAZQUEZ, MANUEL
Cargo: XEFE TERRITORIAL
Data e hora: 12/05/2017 13:32:21

CVE: MEF7ZCQ7
Verificación: <https://sede.xunta.gal/cve>



RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL
Expediente núm.: 15012/2022/020

Data de inicio do expediente: 16.9.2022

Persoa solicitante: Anxo Vidal Figueroa

Procedemento: resolución de autorización

Forma de inicio: solicitude da persoa interesada

ANTECEDENTES

A persoa solicitante, como representante do Centro de Biomedicina Experimental CEBEGA, presentou con data 16.9.2022 unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal (entrada no Rexistro Electrónico da Xunta de Galicia 2022/2289802), cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: Senescencia celular, cancro e envellecemento

Nome do centro usuario: Centro de Biomedicina Experimental CEBEGA

Persoa responsable do proxecto: Manuel Collado Rodríguez

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Centro de Biomedicina Experimental da USC (CEBEGA) (ES1507800292901)

Clasificación do proxecto: Tipo I Tipo II Tipo III
CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1 O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

2 O artigo 88 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.

CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL
XEFATURA TERRITORIAL
SERVIZO DE GANDARÍA
Edificio Administrativo Monelos
R/ Vicente Ferrer, 2, 4º andar
15071 A Coruña
T: 981 184 565
servizo.gandaria.a.coruna@xunta.gal
mediorural.xunta.gal

CVI: ND981BC1M4P1
Verificación: <https://sede.xunta.gal/ove>





3 O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto realizada polo órgano habilitado, o Comité de Bioética de Experimentación Animal da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co Decreto 149/2018, do 5 de decembro, polo que se establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e se modifica parcialmente o Decreto 177/2016, do 15 de decembro, polo que se fixa a estrutura orgánica da Vicepresidencia e das consellerías da Xunta de Galicia (DOG 235, do 11 de novembro).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

1 Autorizar o proxecto solicitado.

2 O proxecto non precisa someterse a unha avaliación retrospectiva.

3 A autorización deste proxecto terá unha duración de cinco anos e unha vez transcurrido este tempo, esta autorización deberá ser renovada.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirala, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante o conselleiro de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notifícaselle a Anxo Vidal Figueroa esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.

A Coruña, 23 de setembro de 2022

O xefe territorial

Jose Manuel Santos Maneiro

Achado por: SANTOS MANEIRO, JOSE MANUEL
Cargo: Xefe Territorial
Data e hora: 23/09/2022 14:39:50

CVE: ND08bCJMR7
Verificación: <https://sede.xunta.gal/ove>



CERTIFICADOS DE CAPACITACIÓN PARA EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES



AXENCIA GALEGA
DA CALIDADE
ALIMENTARIA

Alda. Do Camiño Francés, 10, Baixo
15703 Santiago de Compostela
A Coruña

Xacobeo 21-22

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á FUNCIÓN "b"
EUTANASIA DOS ANIMAIS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS

- 1.- Lexislación nacional (1 hora).
- 2.- Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).
- 3.- Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).
- 4.- Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).
- 5.- Recoñecemento da dor, o sufrimento e a angustia (3 horas).
- 6.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)

MÓDULOS ESPECÍFICOS DA FUNCIÓN "b"

- 1.- Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)
- 2.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES Y ESPECÍFICOS CORRESPONDIENTES A LA FUNCIÓN "b" EUTANASIA DE LOS ANIMALES – ORDEN ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA FUNCIÓN "b"

- 1.- *Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)*

CVE: M6GJW0L0J0NS
Verificación: <http://ndis.xunta.gal/boe>



Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.
Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.

1. IDENTIFICACIÓN / IDENTIFICACIÓN		
1.1. Apelidos / Apellidos Núñez Quintela		
1.2. Nome / Nombre Víctor		DNI / DNI 53974320J
1.3. Función / Función "b"	1.4. Grupo ou grupos de especies* / Grupo o grupos de especies* 1	1.5. Data inicial de vixencia** / Fecha inicial de vigencia** 28/09/2022
2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO		
b663		
3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO		
3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA Rúa do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)		
3.2. Teléfono / Teléfono 981 546 657	3.3. Fax / Fax 981 546 651	3.4. Correo electrónico / Correo electrónico formacion.cmr@xunta.es
3.5. Data / Fecha Ver sinatura / Ver firma	3.6. Lugar / Lugar Santiago de Compostela	
3.7. Nome e sinatura / Nombre y firma Santiago de Compostela, O director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria Por delegación de sinatura (Resolución do 15/02/2022) O xefe da Área de Formación, Innovación e Investigación Agraria Manuel López Luaces		

 Asinado por: LÓPEZ LUACES, MANUEL
 Cursado por: 15/02/2022
 Data e hora: 25/10/2022 14:56:59

 CVE: M1G1W0L0JNNS
 Verificación: https://xunta.gal/ove

* Anexo II da Orde ECC/566/2015, do 20 de marzo: 1 (roedores), 2 (lagomorfos), 3 (carnívoros), 4 (équidos, ruminantes e porcino), 5 (primates), 6 (aves), 7 (réptiles), 8 (peixes e anfíbios), 9 (cefalópodos), 10 (animais silvestres), 11 (outras especies).

** A validez deste certificado será de oito anos contados a partir da data inicial de vixencia. O mantemento da capacitación deberá solicitarse durante os oito meses anteriores á finalización do prazo de vixencia, preferiblemente entre os oito e os tres meses anteriores á finalización do mesmo. /

*** La validez de este certificado será de ocho años contados a partir de la fecha inicial de vigencia. El mantenimiento de la capacitación deberá solicitarse durante los ocho meses anteriores a la finalización del plazo de vigencia, preferiblemente entre los ocho y los tres meses anteriores a la finalización del mismo.



**MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á FUNCIÓN "c"
REALIZACIÓN DOS PROCEDEMENTOS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO**

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS

- 1.- Lexislación nacional (1 hora).
- 2.- Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).
- 3.- Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).
- 4.- Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).
- 5.- Recoñecemento da dor, o sufrimento e a angustia (3 horas).
- 6.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)

MÓDULOS ESPECÍFICOS DA FUNCIÓN "c"

- 1.- Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)
- 2.- Procedementos minimamente invasores sen anestesia, nivel 1 (5 horas)
- 3.- Procedementos minimamente invasores sen anestesia, nivel 2 (10 horas)
- 4.- Anestesia para procedementos menores (5 horas)
- 5.- Anestesia avanzada para intervencións cirúrxicas ou procedementos prolongados (8 horas)
- 6.- Principios de cirurxía (5 horas)

**MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES Y ESPECÍFICOS CORRESPONDIENTES A LA FUNCIÓN "c" REALIZACIÓN DE LOS
PROCEDIMIENTOS – ORDEN ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO**

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA FUNCIÓN "c"

- 1.- *Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Procedimientos mínimamente invasivos sin anestesia, nivel 1 (5 horas)*
- 3.- *Procedimientos mínimamente invasivos sin anestesia, nivel 2 (10 horas)*
- 4.- *Anestesia para procedimientos menores (5 horas)*
- 5.- *Anestesia avanzada para intervenciones quirúrgicas o procedimientos prolongados (8 horas)*
- 6.- *Principios de cirugía (5 horas)*

Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.

Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.

1. IDENTIFICACIÓN / IDENTIFICACIÓN		
1.1. Apelidos / Apellidos Núñez Quintela		
1.2. Nome / Nombre Victor		DNI / DNI 53974320J
1.3. Función / Función "c"	1.4. Grupo ou grupos de especies* / Grupo o grupos de especies* 1	1.5. Data inicial de vixencia** / Fecha inicial de vigencia** 28/09/2022
2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO		
c707		
3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO		
3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA Rúa do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)		
3.2. Teléfono / Teléfono 981 546 657	3.3. Fax / Fax 981 546 651	3.4. Correo electrónico / Correo electrónico formacion.cmr@xunta.es
3.5. Data / Fecha Ver sinatura / ver firma	3.6. Lugar / Lugar Santiago de Compostela	
3.7. Nome e sinatura / Nombre y firma Santiago de Compostela, O director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria Por delegación de sinatura (Resolución do 15/02/2022) O xefe da Área de Formación, Innovación e Investigación Agraria Manuel López Luaces		

Assinado por: LOPEZ LUACES, MANUEL
Cargo: Xefe do Área
Data e hora: 25/02/2022 14:57:01

CVE: J202-2934610
Verificación: <https://sede.xunta.gal/ove>

* Anexo II da Orde ECC/566/2015, do 20 de marzo: 1 (roedores), 2 (lagomorfos), 3 (carnívoros), 4 (équidos, ruminantes e porcino), 5 (primates), 6 (aves), 7 (réptiles), 8 (peixes e anfibios), 9 (cefalópodos), 10 (animais silvestres), 11 (outras especies).

** Anexo II da Orde ECC/566/2015, do 20 de marzo: 1 (roedores), 2 (lagomorfos), 3 (carnívoros), 4 (équidos, ruminantes e porcino), 5 (primates), 6 (aves), 7 (réptiles), 8 (peixes e anfibios), 9 (cefalópodos), 10 (animais silvestres), 11 (outras especies).

** A validez deste certificado será de oito anos contados a partir da data inicial de vixencia. O mantemento da capacitación deberá solicitarse durante os oito meses anteriores á finalización do prazo de vixencia, preferiblemente entre os oito e os tres meses anteriores á finalización do mesmo. /

** La validez de este certificado será de ocho años contados a partir de la fecha inicial de vigencia. El mantenimiento de la capacitación deberá solicitarse durante los ocho meses anteriores a la finalización del plazo de vigencia, preferiblemente entre los ocho y los tres meses anteriores a la finalización del mismo.



La reprogramación parcial mediante factores genéticos definidos (OSKM) supuso una revolución en múltiples áreas de investigación biomédica. En esta tesis planteamos tres aproximaciones experimentales que nos permitirán definir cómo la reprogramación parcial modifica las células senescentes, altera la progresión tumoral y modifica la obesidad.

Nuestros resultados muestran que la reprogramación parcial mejora el fenotipo senescente, disminuyendo su fenotipo secretor y mejorando la disfunción mitocondrial típica de la senescencia. Asimismo, observamos cómo la expresión cíclica de OSKM reduce la progresión tumoral en el pulmón y mama de ratones envejecidos. Por último, comprobamos que la reprogramación parcial en animales obesos mejora la composición corporal y diversas alteraciones metabólicas típicas de la obesidad.