



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D.^a Ana Constenla Quinteiro

**Estudo dos reguladores de m⁶A en ARN en envellecemento
acelerado e no rexuvenecemento mediante reprogramación
somática celular**

Traballo Fin de Grao

Xuño 2025

Índice

Índice de contidos

1. Resumos	4
2. Introducción:	7
2.1. O envellecemento celular	7
2.2. O síndrome de proxeria de Hutchinson-Gilford (HGPS)	7
2.3. Modificación do ARN mensaxeiro	10
2.4. A reprogramación celular somática	11
3. Obxectivos	13
4. Materiais e métodos	14
4.1. Análise dun dataset de proxéricos fronte a sans	14
4.2. Análise dun dataset de reprogramación celular somática de fibroblastos de rato ...	15
4.3. Cultivo de liñas celulares	16
4.4. Reprogramación celular somática de fibroblastos de rato	16
4.5. Xeración de partículas lentivirais	19
4.6. Infección de fibroblastos de rato utilizando shARNs para testear a súa eficiencia ...	21
4.7. Extracción de ARN, síntese de ADN complementario e qPCR	21
5. Resultados e discusión	22
5.1. Análise <i>in silico</i> de reguladores epitranscritómicos en modelos de rato de proxeria	22
5.2. Análise da expresión de reguladores de m ⁶ A durante a reprogramación somática celular:	27
5.3. Uso do sistema lentiviral OKSM para reprogramar fibroblastos de rato	31
5.4. Avaliación da eficiencia de silenciamento dos shARNs	36
5.5. Avaliación do impacto do silenciamento de <i>Mettl3</i> en reprogramación celular somática	38
6. Conclusións	42
7. Bibliografía	44
8. Material suplementario	49

Índice de Abreviaturas:

- **4',6-diamidino-2-fenilindol** (*DAPI*)
- **β-actina** (*ActB*)
- **Antíxeno proteico de proliferación nuclear** (*PCNA*)
- **Anticorpo secundario** (*Sec. Ab.*)

- **ARN mensaxeiro** (*mARN*)
- **Células pluripotentes inducidas** (*iPSCs*)
- **Coactivador do receptor gamma 1-alfa activado polo proliferador de peroxisomas** (*PGC-1 α*)
- **Cromatografía líquida – espectrometría de masas en tándem** (*LC-MS/MS*)
- **Cruzamento e inmunoprecipitación de m⁶A** (*m⁶A-CLIP*)
- **Disolución salina tamponada con fosfato** (*PBS*)
- **Enzima farnesiltransferasa** (*FTase*)
- **Enzima S-isoprenilcisteína O-metiltransferasa** (*ISMT*)
- **Especies reactivas de osíxeno** (*ROS*)
- **Factores inflamatorios** (*SASP*)
- **Fibroblastos de cola de rato** (*TF*; “*tail fibroblasts*”)
- **Fat Mass and Obesity-associated protein** (*Fto*)
- **Inmunoprecipitación de ARN con m⁶A seguida de secuenciación** (*meRIP-seq*)
- **Metilación da lisina 36 na histona H3** (*H3K36me*)
- **Medio para células nai embrionarias** (*medio SL*)
- **N6-metiladenosina** (*m⁶A*)
- **Oct4, Klf4, Sox2 e c-Myc** (*OKSM*)
- **Para-formaldehido** (*PFA*)
- **Proteína A do grupo Xeroderma Pigmentosum** (*XPA*)
- **S-adenosilmetionina** (*SAM*)
- **Síndrome de Proxeria de Hutchinson-Gilford** (*HGPS*)
- **Sítios de rotura de cadea dobre** (*DBS*)
- **Transición epitelio-mesénquima** (*EMT*)
- **Transición mesénquima-epitelio** (*MET*)
- **Xene constitutivo** (“*housekeeping*”; *HK*)
- **Xenotipo salvaxe** (“*wild type*”, *WT*)

1. Resumos

Resumo:

Este traballo de fin de grao céntrase no estudo dos reguladores epitranscritómicos da modificación N6-metiladenosina (m⁶A) no ARN, un mecanismo clave no control post-transcricional da expresión xénica. A investigación aborda dúas situacións biolóxicas contrapostas: o envellecemento acelerado, a través do modelo da síndrome de proxeira de Hutchinson-Gilford (HGPS), e o rexuvenecemento celular, mediante reprogramación somática a células nai pluripotentes inducidas (iPSCs).

Na primeira parte do estudo, realizouse unha análise bioinformática dun conxunto de datos transcriptómicos de fibroblastos de rato homocigotos para a expresión de proxeirina. Mediante ferramentas como BioJupies e Morpheus, examinouse a expresión dos xenes *Mettl3*, *Mettl14*, *Mettl16*, *Fto* e *Alkbh5*. Non se observaron cambios significativos entre as condicións proxeiricas e control, indicando que a regulación funcional destas encimas podería non depender exclusivamente da súa expresión transcricional.

Na segunda parte, levouse a cabo un estudo *in silico* da expresión dos reguladores de m⁶A empregando datos de secuenciación masiva publicados de reprogramación celular somática, así como un modelo experimental de reprogramación celular somática infectando fibroblastos de rato cun vector lentiviral que expresa os factores de Yamanaka (OKSM). Observouse que os niveis de expresión de *Mettl3* e *Mettl14* aumentan progresivamente durante o proceso. Ademais, mediante a interferencia de *Mettl3* con shARN, observouse unha diminución na eficiencia da reprogramación, evidenciada pola redución de células positivas para *Nanog*.

En conxunto, os resultados indican que os reguladores da m⁶A non están transcricionalmente alterados en proxeira, pero parecen xogar un papel no establecemento do estado pluripotente. Estes achados sitúan a metilación de ARN como un factor clave no control da identidade celular e na determinación da idade celular, abrindo novas posibilidades para investigacións en terapias anti-envellecemento e rexenerativas.

Resumen:

Este trabajo de fin de grado se centra en el estudio de los reguladores epitranscriptómicos de la modificación N6-metiladenosina (m⁶A) en el ARN, un mecanismo clave en el control post-transcricional de la expresión génica. La investigación aborda dos situaciones biológicas contrapuestas: el envejecimiento acelerado, a través del modelo del síndrome de progeria de

Hutchinson-Gilford (HGPS), y el rejuvenecimiento celular, mediante la reprogramación somática a células madre pluripotentes inducidas (iPSCs).

En la primera parte del estudio se analizó un conjunto de datos transcriptómicos de fibroblastos de ratón homocigotos para la expresión de progerina, utilizando herramientas bioinformáticas como BioJupies y Morpheus. No se observaron cambios significativos en la expresión de *Mettl3*, *Mettl14*, *Mettl16*, *Fto* y *Alkbh5* entre las condiciones control y HGPS, sugiriendo que su regulación funcional podría no depender de su expresión transcripcional.

En la segunda parte, se llevó a cabo un estudio *in silico* de la expresión de los reguladores de m⁶A utilizando datos de secuenciación masiva publicados sobre la reprogramación celular somática, así como un modelo experimental de reprogramación celular somática mediante la infección de fibroblastos de ratón con un vector lentiviral que expresa los factores de Yamanaka (OKSM). Se observó que los niveles de expresión de *Mettl3* y *Mettl14* aumentan progresivamente durante el proceso. Además, mediante la interferencia de *Mettl3* con shARN, se observó una disminución en la eficiencia de la reprogramación, evidenciada por la reducción de células positivas para *Nanog*.

En conjunto, los resultados indican que los reguladores de m⁶A no están alterados transcripcionalmente en la progeria, pero parecen desempeñar un papel en el establecimiento del estado pluripotente. Estos hallazgos sitúan a la metilación del ARN como un factor clave en el control de la identidad celular y en la determinación de la edad celular, abriendo nuevas posibilidades para investigaciones en terapias antienvjecimiento y regenerativas.

Abstract:

This undergraduate thesis focuses on the study of epitranscriptomic regulators of the N⁶-methyladenosine (m⁶A) modification in RNA, a key mechanism in the post-transcriptional control of gene expression. The research addresses two opposing biological scenarios: accelerated aging, using the Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) model, and cellular rejuvenation, through somatic reprogramming into induced pluripotent stem cells (iPSCs).

In the first part of the study, a transcriptomic dataset from mouse fibroblasts homozygous for progerin expression was analyzed using bioinformatic tools such as BioJupies and Morpheus. The expression levels of *Mettl3*, *Mettl14*, *Mettl16*, *Fto*, and *Alkbh5* showed no significant differences between HGPS and control samples. This suggests that the functional regulation of these enzymes may not rely solely on transcriptional expression.

In the second part, an *in silico* study of the expression of m⁶A regulators was conducted using publicly available high-throughput sequencing data from somatic cell reprogramming, as well as an experimental model of somatic cell reprogramming by infecting mouse fibroblasts with a lentiviral vector expressing the Yamanaka factors (OKSM). It was observed that the expression levels of *Mettl3* and *Mettl14* progressively increase during the process. Furthermore, knockdown of *Mettl3* using shRNA resulted in reduced reprogramming efficiency, as evidenced by a decrease in *Nanog*-positive cells.

Altogether, the results indicate that m⁶A regulators are not transcriptionally altered in progeria, but they appear to play a role in establishing the pluripotent state. These findings position RNA methylation as a key factor in the control of cell identity and in the regulation of cellular aging, opening new avenues for research into anti-aging and regenerative therapies.

Palabras clave: m⁶A (N6-metiladenosina), Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS), reprogramación celular, iPSCs (células nai pluripotentes inducidas), reguladores epitranscritómicos.

Palabras clave: m⁶A (N6-metiladenosina), Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS), reprogramación celular, iPSCs (células madre pluripotentes inducidas), reguladores epitranscritómicos.

Key words: m⁶A (N6-methyladenosine), Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS), cellular reprogramming, iPSCs (induced pluripotent stem cells), epitranscriptomic regulators.

Título: Estudio dos reguladores de m⁶A en ARN en envelhecimento acelerado e no rexuvenecemento mediante reprogramación somática celular.

Título: Estudio de los reguladores de m⁶A en ARN en envejecimiento acelerado y en el rejuvenecimiento mediante reprogramación somática celular.

Title: Study of m⁶a regulators in RNA in accelerated aging and in and rejuvenation through somatic cell reprogramming.

2. Introducción:

2.1. O envellecemento celular

O envellecemento fisiolóxico é un proceso progresivo caracterizado pola diminución da capacidade funcional dos órganos e sistemas do corpo, resultando nunha reserva homeostática reducida e maior susceptibilidade a enfermidades crónicas (Ferrando et al., 2024). A nivel celular, prodúcense danos acumulativos no ADN, encimas, e organelos, como as mitocondrias, co paso do tempo, xurdindo mecanismos como a senescencia celular, a inflamación crónica e a disfunción das capacidades reparatorias (López-Otín et al., 2023).

Unha das consecuencias principais deste desgaste é a acumulación de células senescentes, que deixan de dividirse pero seguen activas metabólicamente, emitindo factores inflamatorios (SASP) que prexudican os tecidos circundantes. Outros compoñentes importantes inclúen a perda da proteostasis (o control sobre a calidade do proteoma celular), o mal funcionamento mitocondrial que conduce a estrés oxidativo e dano molecular; o acurtamento dos telómeros que favorece o detemento da replicación celular e alteracións no epixenoma (López-Otín et al., 2023; Ferrando et al., 2024). Pese a que cada vez están mellor definidos estes cambios que ocorren a nivel molecular co paso do tempo, as causas do envellecemento seguen sen coñecerse, o que xustifica estudar o envellecemento dende novas perspectivas.

2.2. O síndrome de proxeira de Hutchinson-Gilford (HGPS)

O síndrome de proxeira de Hutchinson-Gilford (HGPS) é unha enfermidade xenética extremadamente rara que provoca un envellecemento prematuro e acelerado en nenos. Foi descrita por primeira vez polos médicos Jonathan Hutchinson (1886) e Hastings Gilford (1904) e afecta aproximadamente tan solo a 1 de cada 4-8 millóns de recen nados no mundo, con pouco máis de 100 casos documentados ata hoxe (Gordon et al., 2014). Aínda que estes pacientes con HGPS nacen aparentemente sans, durante o primeiro ou o segundo ano de vida, comezan a manifestar signos de envellecemento prematuro, o que conduce a complicacións médicas graves e a unha esperanza de vida reducida, xeralmente ao redor dos 14 anos (Merideth et al., 2008).

O HGPS está causado por unha mutación esporádica no xen *LMNA*, que codifica para a proteína laminina A, a cal ten un papel esencial na estabilidade da estrutura do núcleo celular (De Sandre-Giovannoli et al., 2003). No 90% dos casos desta enfermidade, a mutación consiste nun cambio dunha soa base (C1824T) que activa un sitio de corte e empalme alternativo (“splicing”) no ARN mensaxeiro.

A pre-laminina A contén unha caixa-CaaX no seu extremo carboxilo que é farnesilada, no seu residuo de cisteína, durante o procesamento postraducional pola encima farnesiltransferasa (FTase)

(**figura 1**). Unha vez que ocorre esta reacción, os tres últimos aminoácidos da pre-laminina A (aaX) son eliminados e levase a cabo a metilación do aminoácido farnesilado grazas a encima S-isoprenilcisteína O-metiltransferasa (ISMT). A continuación, a pre-laminina A é trasladada dende o retículo endoplásmico ata a membrana nuclear interna mediante transporte lateral. É aquí onde realízase o último corte na proteína grazas a metaloproteasa de zinc (ZMPTSE24), que elimina os últimos 15 aminoácidos, nos que está contida a cisteína farnesilada, do extremo carboxilo-terminal.

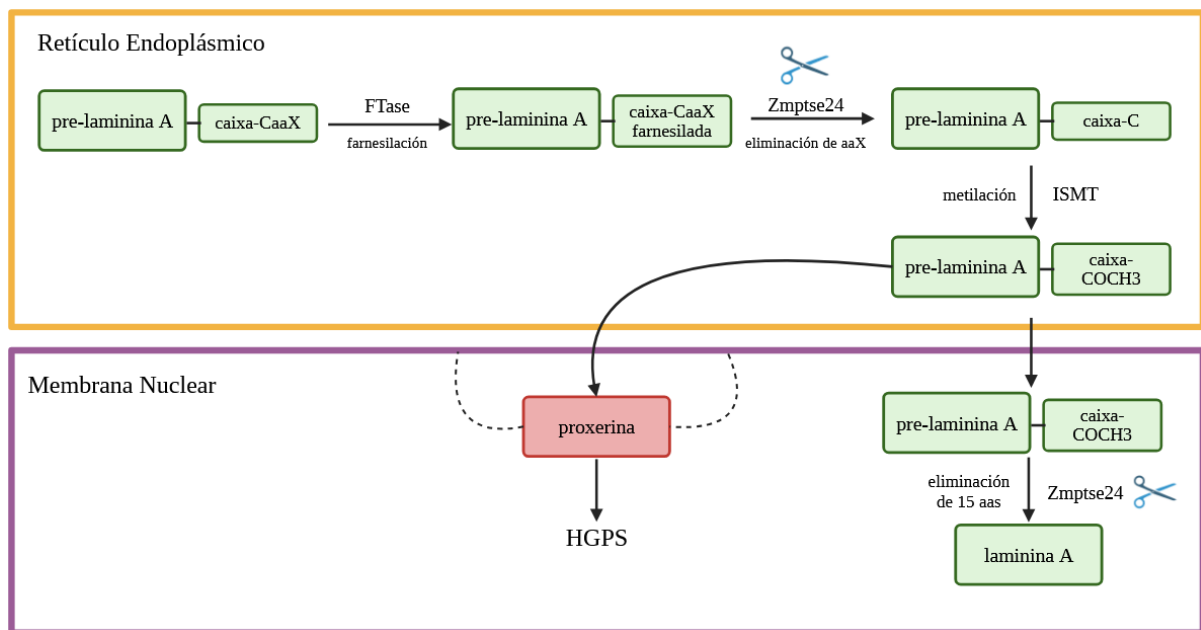


Figura 1: Procesamento postraduccional da pre-laminina A e formación de proxerina en HGPS. A pre-laminina A sintetízase no retículo endoplásmico e sofre varias modificacións postraduccionalas. Primeiro, a caixa-CaaX da pre-laminina A é farnesilada pola farnesil transferasa (FTase). A continuación, a endoproteasa Zmpste24 elimina o último aminoácido (aaX), permitindo a metilación da cisteína terminal pola encima ISMT. Posteriormente, Zmpste24 elimina un fragmento de 15 aminoácidos, o que dá lugar á forma madura da laminina A, que se incorpora á membrana nuclear. No síndrome de Hutchinson-Gilford (HGPS), unha mutación impide a eliminación do fragmento de 15 aminoácidos, o que xera unha forma truncada chamada proxerina. Esta proteína defectuosa se acumúlase na membrana nuclear provocando as alteracións características de HGPS.

A proxerina carece do sitio de recoñecemento da ZMPTSE24 e, por isto, permanece farnesilada e ancorada a envoltura nuclear de forma aberrante. Será esta unión anormal a que acabe por alterar a función nuclear da proteína derivando nas diferentes patoloxías presentes na enfermidade.

A acumulación de proxerina altera a estrutura do núcleo, xerando inestabilidade xenómica e acelerando os procesos asociados ao envellecemento, como a disfunción celular e a morte prematura dos tecidos (Goldman et al., 2004). Os mecanismos moleculares que se ven alterados son os seguintes e están resumidos na **figura 2**:

- **Disfunción mitocondrial:** consiste nunha menor bióxénese mitocondrial (xeración de novas mitocondrias e mitofaxia que elimina as mitocondrias danadas mediante autofaxia) debida a unha menor expresión do coactivador do receptor gamma 1-alfa activado polo proliferador de peroxisomas (PGC-1 α), o principal modulador transcricional da

homeostase mitocondrial. En consecuencia, pódese observar nas células afectadas: morfoloxía mitocondrial defectuosa, mobilidade mitocondrial reducida, niveles baixos de ATP e acumulación de especies reactivas de osíxeno (ROS) (Cisneros, B. et al., 2023).

- **Acurtamento acelerado dos telómeros:** O acurtamento dos telómeros é severo nas células con xenotipo HGPS porque a proxeirina provoca o colapso dos garfos de replicación mediante: o secuestro do antíxeno proteico de proliferación nuclear (PCNA), a localización errónea do da proteína A do grupo Xerodema Pigmentosum (XPA) e a produción de sitios de rotura de cadea dobre (DBS). Isto, a súa vez, produce unha resposta celular ante o dano do ADN que culmina co arresto do ciclo celular. A maiores, a acumulación de ROS, debidos a alteración do comportamento mitocondrial, produce grandes danos nos telómeros, os cales son especialmente susceptibles a estes compostos. (Li Y, et al., 2019)
- **Alteracións no tráfico nucleocitoplasmático de proteínas:** son debidas a formación de clusters nos complexos dos poros nucleares provocados pola acumulación de proxeirina. Estas estruturas impiden que os poros nucleares establezan un paso selectivo de moléculas entre o núcleo e o citoplasma.
- **Expansión nucleolar:** a proxeirina causa a desorganización da heterocromatina causando a perda de marcas represoras en locis de ADN ribosomal inactivos, o que, a súa vez, aumenta a actividade (bioxénese de ribosomas) e o tamaño nucleolar. (Cisneros, B. et al., 2023).

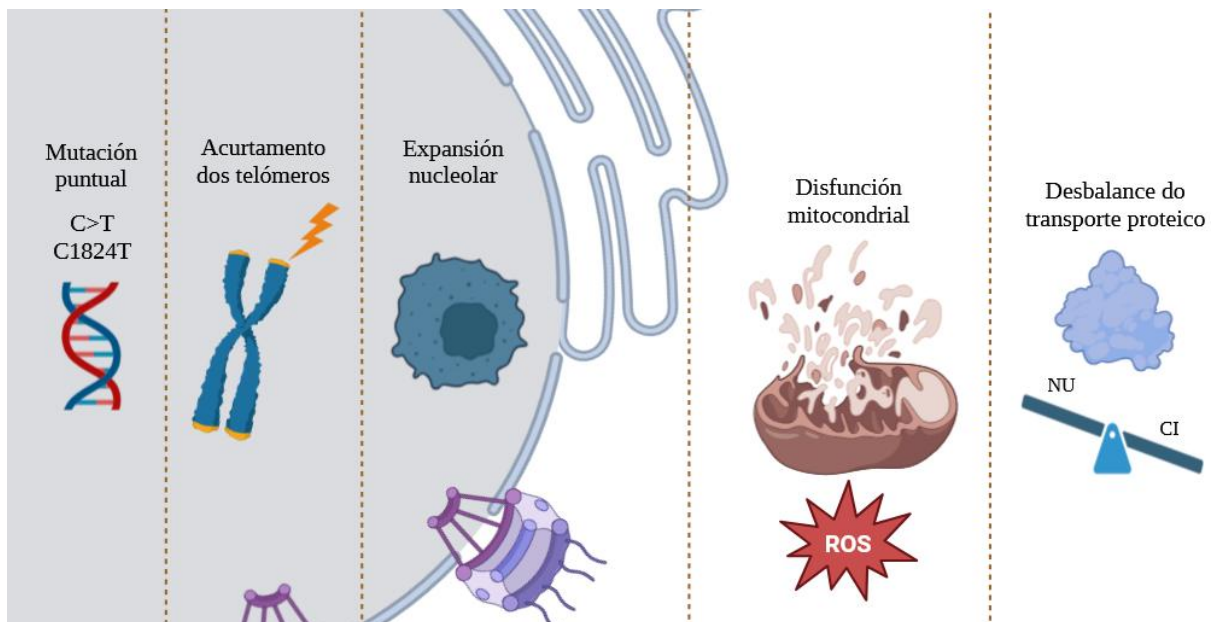


Figura 2: Principais consecuencias celulares da mutación asociada á progeria (HGPS). A mutación puntual C1824T no xen LMNA orixina a produción da proxeirina, unha proteína defectuosa que altera múltiples procesos celulares. Entre os efectos máis relevantes atópanse: o acurtamento dos telómeros, a expansión do nucleolo, a disfunción mitocondrial (que provoca un aumento da produción de especies reactivas de osíxeno, ROS) e o desbalance no transporte proteico entre o núcleo (NU) e o citoplasma (CI). Estes procesos contribúen ao envellecemento prematuro característico da progeria. Figura adaptada de: 6. Cisneros, B., García-Aguirre, I., De Ita, M., Arrieta-Cruz, I., Rosas-Vargas, H., (2023). Hutchinson-gilford progeria syndrome: cellular mechanisms and therapeutic perspectives. Arch. Med. Res., 54, 102837. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2023.06.002>.

2.3. Modificación do ARN mensaxeiro

A epitranscritómica é un campo emerxente que estuda as modificacións químicas no ARN que regulan a función xenómica sen alterar a secuencia nucleotídica, engadindo unha nova capa de control post-transcricional na expresión xénica (Imbriano et al., 2023). Estas modificacións inclúen máis de 170 variantes químicas (como m⁶A, m¹A, m⁵C, Ψ...), permitindo modular a función do ARN, dende a súa estrutura ata a súa localización, pasando pola súa estabilidade ou interacción con outras biomoléculas (Imbriano et al., 2023).

No ARN mensaxeiro (mARN), **N6-metiladenosina** (m⁶A) é unha das modificacións epitranscritómicas máis abundantes e localízanse en zonas funcionais como as rexións non traducidas 5'-UTR e 3'-UTR (do inglés “*untranslated regions*”) ou a rexión codificante (CDS, do inglés “*coding sequence*”) (Linder et al., 2016; Imbriano et al., 2023). Funcionalmente, a m⁶A regula procesos clave do metabolismo do mARN, incluíndo corte e empalme, o transporte nuclear, a estabilidade e a tradución (Zhu, W. et al., 2019). Esta marca epitranscritómica é incorporada no ARN grazas á acción dun conxunto de encimas metiltransferasas coñecidas como escritoras ou “*writers*”. Entre estas destacan:

- O complexo *Mettl3/Mettl14*, no cal a primeira actúa como subunidade catalítica e a derradeira proporciona estabilidade estrutural ao complexo, encargado da metilación de mARN en células eucariotas (Liu et al., 2014).
- *Mettl16*, encargada de metilar transcritos específicos, como o ARN nuclear pequeno (*snARN*) *U6* e o *mRNA de Mat2A*. A metilación do *U6 snARN* contribúe ao correcto funcionamento do espliceosoma, esencial no proceso de corte e empalme do ARN (Hong, Xu & Lee et al., 2022). Pola súa parte, a modificación do *mRNA de Mat2A* permite a regulación dos niveis de S-adenosilmetionina (SAM), o principal doador de grupos metilo na célula, actuando así *Mettl16* como un sensor metabólico da metilación celular (Imbriano et al., 2023; Hong et al., 2022).

Esta modificación ten certo carácter reversible e dinámico grazas as encimas coñecidas como borradoras ou “*erasers*”: *Fto* (Fat Mass and Obesity-associated protein) e *Alkbh5*, que son capaces de restaurar o estado orixinal do ARN ao eliminar a marca deste (Jia et al., 2011; Hong, J. et al., 2022).

Finalmente, a función biolóxica da m⁶A depende da súa interpretación por proteínas coñecidas como lectoras ou “*readers*” entre as cales destaca a familia de proteínas *Yth* que recoñecen o ARN metilado e dirixen os transcritos modificados cara á destino específicos na célula, regulando, por exemplo, a súa estabilidade e dispoñibilidade para a tradución (Wang et al., 2014). Neste grupo de encimas podemos destacar:

- **YTHDF1** promove a tradución dos transcritos modificados con m⁶A, facilitando a interacción cos ribosomas. (Wang, X. et al., 2015).

- **YTHDF2** dirixe os ARN metilados cara á súa degradación, regulando a estabilidade e a vida media dos transcritos (Wang, X. et al., 2014).
- **YTHDF3** coopera con YTHDF1 e YTHDF2, actuando como un modulador que potencia tanto a tradución como a degradación, segundo o contexto celular (Hong et al., 2022).
- **YTHDC1** é unha proteína nuclear implicada no procesamento do pre-MARN, incluíndo o corte e empalme alternativo, e na exportación do ARN ao citoplasma, regulando o tráfico dos transcritos modificados con m⁶A desde o núcleo (Imbriano et al., 2023).

En conxunto, as modificacións epittranscritómicas, especialmente m⁶A (**figura 3**), actúan como sinalizadores dinámicos que modulan a identidade celular, o desenvolvemento embrionario e as respostas fisiolóxicas, abrindo posibilidades en bioloxía celular, terapias dirixidas como as terapias celulares e xénicas e medicina rexenerativa (Imbriano et al., 2023; Hong et al., 2022).

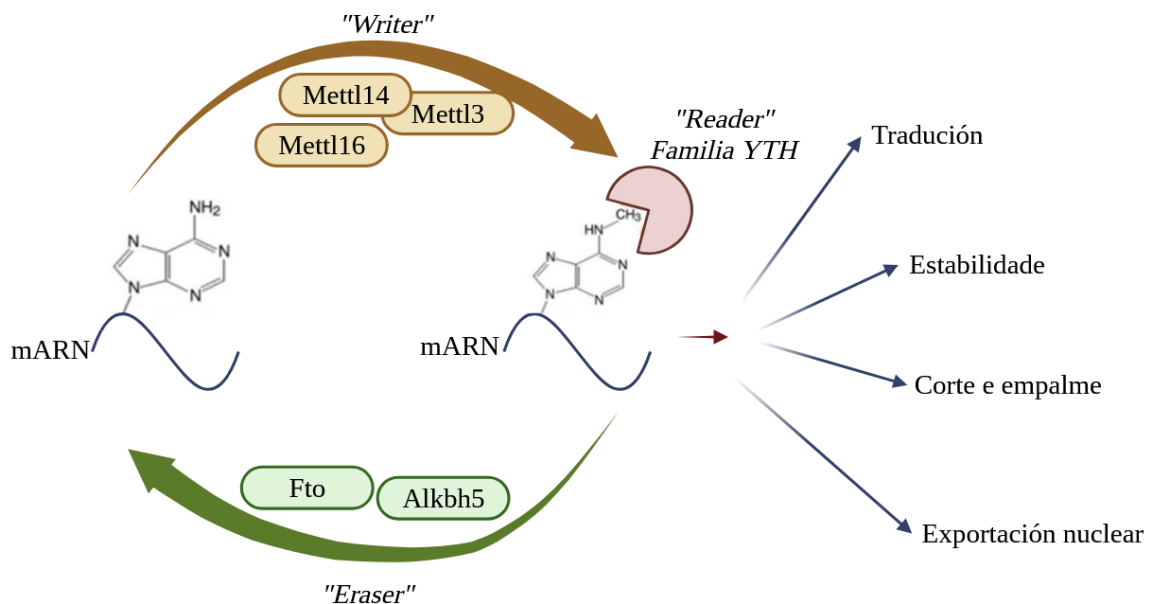


Figura 3: Papeis dos complexos “Writer”, “Eraser” e “Reader” da N6-metiladenosina na regulación do mARN. As modificacións m⁶A do ARN xogan papeis importantes nos mecanismos moleculares da bioloxía do ARN. Adaptado de Zhu, W., *Journal of Molecular Medicine*, 2019.

2.4. A reprogramación celular somática

A capacidade de reprogramar células somáticas diferenciadas cara un estado de pluripotencia inducida (iPSCs), similares ás células nai pluripotentes do embrión pre-implantación, representa un dos avances máis significativos na bioloxía molecular e na medicina rexenerativa. Este fito, logrado por Takahashi y Yamanaka no 2006, demostrou que a expresión exóxena de catro factores de transcrición (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* e *c-Myc*; coñecidos como factores de Yamanaka) era suficiente para reverter o estado diferenciado de fibroblastos de rato, converténdoo en células con propiedades similares ás células nai embrionarias (Takahashi & Yamanaka, 2006). Este descubrimento non só superou barreiras éticas

asociadas ao uso de embrións humanos, senón que abriu novas perspectivas para a investigación biomédica, o modelado de enfermidades e o desenvolvemento de terapias personalizadas.

Os estudos posteriores revelaron que a reprogramación celular ocorre en dúas fases distintas: unha inicial estocástica, onde os factores introducidos activan xenes de forma aleatoria, e outra xerárquica, caracterizada pola activación ordenada de xenes de pluripotencia como *Nanog* e *Oct4* (Buganim et al., 2012). Durante este proceso, obsérvase unha represión inicial de xenes relacionados coa adhesión celular e un aumento na expresión de xenes involucrados na replicación do ADN e na división celular (Kulcenty et al., 2015).

Mais aínda, estudos máis recentes sinalan que a expresión controlada ou cíclica dos factores de Yamanaka pode restaurar características epixenéticas propias de células novas, reducir o dano acumulado no ADN e mellorar a función mitocondrial, sen chegar a unha desdiferenciación completa (Ocampo et al., 2016). Por este motivo, a reprogramación parcial perfílase como unha estratexia prometedora para o rexuvenecemento celular *in vivo*, ofrecendo un modelo experimental útil para estudar os mecanismos moleculares do envellecemento e desenvolver posibles terapias rexenerativas.

Na última década, hipotetizouse que a modificación epitranscritómica do ARN, especialmente a m⁶A, desempeña un papel crucial na regulación da reprogramación celular (Batista, P. J. et al., 2014). En concreto, créese que a actividade das encimas reguladoras desta marca pode ser esencial para controlar a expresión temporal e espacial de xenes clave durante a reprogramación celular somática. Estudos recentes indican que a presenza de m⁶A en transcricións de xenes de pluripotencia favorece a súa expresión adecuada e contribúe á eficiencia do proceso de reprogramación (Batista et al., 2014; Geula et al., 2015). Así, a regulación dinámica das marcas de m⁶A no ARN constituiría unha nova capa de control post-transcricional fundamental para comprender e optimizar a xeración de iPSCs.

Con todo, o papel funcional da m⁶A na reprogramación celular aínda está en proceso de esclarecemento, e a comunidade científica non chegou a un consenso definitivo sobre o seu impacto global neste contexto. Porén, o papel preciso desta modificación continúa a ser obxecto de debate, xa que os mecanismos implicados non están completamente dilucidados e algunhas evidencias experimentais seguen sendo contraditorias ou contextuais.

Entre as diversas estratexias para introducir os factores de reprogramación (plásmidos, mARN ou proteínas recombinantes), os vectores lentivirais demostraron ser particularmente eficientes debido a súa alta capacidade de transdución e expresión xénica sostida (Kulcenty et al., 2015). Ademais, a diferenza dos retrovirus convencionais, os lentivirus poden infectar tanto células en división como quiescentes.

Neste traballo empregamos o sistema OKSM (**figura 4**), un vector lentiviral optimizado que conten os catro factores de Yamanaka nun único casete policistrónico. Este sistema demostrou unha maior

eficiencia que os vectores individuais, reducindo a variabilidade na expresión dos factores e minimizando o risco de silenciamento xénico (Kulcenty et al., 2015). A maiores, permite un mellor control da doses de infección e a monitorización da expresión transxénica.

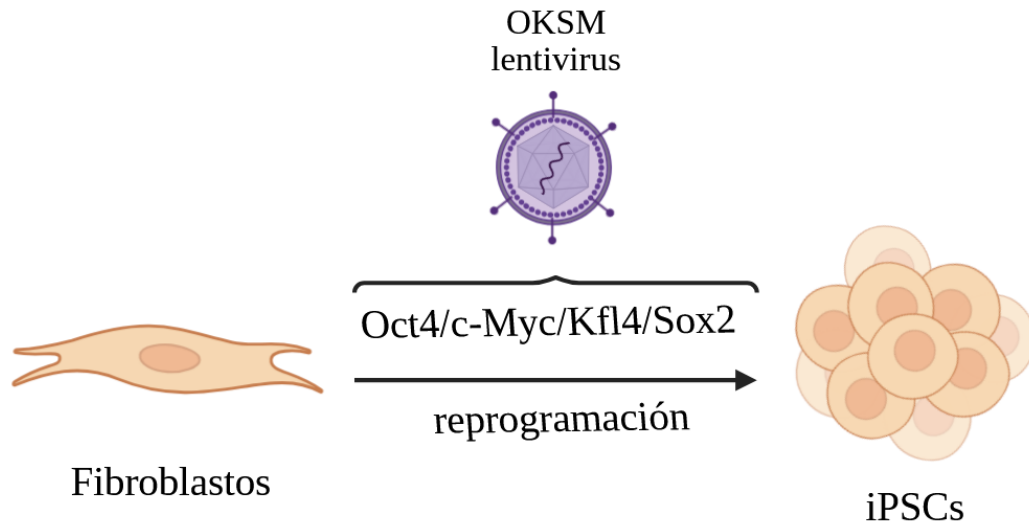


Figura 4: Reprogramación de fibroblastos a células nai pluripotentes inducidas (iPSCs). A introdución dos factores de reprogramación Oct4, c-Myc, Klf4 e Sox2 mediante un lentivirus (OKSM) permite a conversión de fibroblastos somáticos en células nai pluripotentes inducidas (iPSCs). Este proceso de reprogramación celular reverte o estado diferenciado da célula, conferíndolle propiedades semellantes ás das células nai embrionarias, como a capacidade de autorrenovación e pluripotencia. Imaxe creada coa ferramenta en liña Biorender.

3. Obxectivos

Durante este traballo de fin de grao, basándonos no coñecemento anteriormente resumido, propuxímonos os seguintes obxectivos:

- **Analizar os niveis de expresión de reguladores epitranscritómicos da modificación m⁶A** empregando datos publicados de cultivos celulares de modelos de ratos con expresión homocigota de proxeína (proxéricos) comparándoos cos de individuos silvestres homocigotos para a expresión de laminina A (control).
- **Analizar os niveis de expresión de reguladores epitranscritómicos da modificación m⁶A durante o proceso de reprogramación celular somática** empregando datos publicados.
- **Establecer posibles conexións entre os perfís de expresión dos reguladores de m⁶A e os procesos de envellecemento acelerado e rexuvenecemento celular**, para explorar a potencial contribución das modificacións epitranscritómicas nestes procesos.
- **Avaliar o impacto funcional da modulación de reguladores de m⁶A** sobre a eficiencia da reprogramación celular somática é un paso clave, tendo en conta que estudos recentes demostraron que a alteración da expresión de proteínas lectoras, escritoras e borradoras de m⁶A

pode mellorar ou dificultar a conversión de células somáticas en células nai pluripotentes inducidas (iPSCs). Por exemplo, a inhibición de FTO ou METTL3 pode modificar significativamente a eficiencia e a calidade da reprogramación, o que sitúa as modificacións epitranscritómicas como obxectivos reguladores fundamentais neste proceso.

4. Materiais e métodos

4.1. Análise dun dataset de proxéricos fronte a sans

Para poder analizar o papel dos reguladores epitranscritómicos no contexto de envellecemento acelerado, realizouse unha búsqueda bibliográfica utilizando a ferramenta online Gene Expression Omnibus (GEO) do National Center of Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para procurar estudos transcritómicos de fibroblastos de rato que expresasen proxerina (**táboa 1**).

Tras esta búsqueda, seleccionáronse os datos do artigo “*Single-dose CRISPR-Cas9 therapy extends lifespan of mice with Hutchinson-Gilford progeria syndrome*” publicado no ano 2019 na revista Nature Medicine (Beyret, E. et al., 2019).

Título do artigo	Tipo celular	Tipo de ensaio	Diseño xeral do experimento
Single-Dose CRISPR/Cas9 Therapy Extends Lifespan of Mice with Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome	Fibroblastos primarios de rato	Secuenciación total de ARN	Análises de: (1) homocigotos para a expresión de proxerina; (2) homocigotos para a expresión de laminina A; (3) heterocigotos con expresión de ambas proteínas.
Boosting ATM activity alleviates ageing and extends lifespan in a mouse model of progeria.	MEFs	Secuenciación de ARN	Análises de individuos salvaxes <i>Sirt6</i> ^{-/-} , o <i>Atm</i> ^{-/-} (alteracións nos mecanismos da glicolisis)
Dynamic Chromatin Localization of Sirt6 Shapes Stress- and Aging-Related Transcriptional Networks (ChIP-chip)	MEFs	Análises ChIP-chip	Comparación de individuos con xenotipo salvaxe <i>RelA</i> ^{-/-} e <i>Sirt6</i> ^{-/-} . A perda de <i>Sirt6</i> ou <i>RelA</i> induce un fenotipo similar ao de células proxéricas.
Dynamic Chromatin Localization of Sirt6 Shapes Stress- and Aging-	MEFs	Análises ChIP-chip	Comparación de individuos con xenotipo salvaxe <i>RelA</i> ^{-/-} e <i>Sirt6</i> ^{-/-} .

Related Transcriptional Networks (Illumina)			
Expression data from wild-type and Zmpste24-/- mouse embryonic fibroblasts (MEFs) at an early passage (passage 3, P3)	MEFs	ARN Affymetrix microarrays	Análises de fibroblastos con xenotipo salvaxe e <i>Zmpste24-/-</i> . As células con xenotipo <i>Zmpste24-/-</i> acumulan prelamina A.

Táboa 1: Artigos identificados mediante a busca (fibroblast progeria mouse) AND "Mus musculus"[porgn: __txid10090] na base de datos GEO (Gene Expression Omnibus). Inclúense detalles sobre o tipo celular empregado, o tipo de ensaio realizado e unha descrición xeral do deseño experimental para cada estudo.

Os datos do artigo seleccionado corresponden co análise de secuenciamento de ARN total (ARN-seq) provinte de células de fibroblastos da punta de cola de ratos de dous meses de idade dos seguintes xenotipos: homocigotos para a expresión de proxeirina (versión mutada do xen *Lmna*) e homocigotos para a expresión de lamina A. Para cada condición utilizáronse duplicados biolóxicos.

Para analizar os datos utilizamos a ferramenta online BioJupies (<https://maayanlab.cloud/biojupies/>) a cal permite automatizar pasos críticos do procesamento de datos transcricómicos, como a normalización e o análise de expresión diferencial ou enriquecemento de rutas. Isto permite identificar con maior precisión que xenes están regulados diferencialmente entre condicións experimentais e que funcións biolóxicas poden estar asociadas a estes cambios (Torre D. et al., 2018).

Empregamos os datos obtidos a través de esta ferramenta para xerar un arquivo de Excel que contiña os datos de expresión, o “*Fold Change*” (FC) e o “*False Discovery Rate*” (FDR), dos xenes que se vían alterados nos individuos proxéricos.

Unha vez recompilados estes datos, integráronse, utilizando a ferramenta de Microsoft Access, cos datos doutro arquivo Excel que contiña unha lista de reguladores coñecidos da modificación epitranscritómica m⁶A, recopilados mediante búsquedas bibliográficas. Este proceso permitiu identificar que reguladores de m⁶A atopábanse alterados no contexto das células proxéricas. A integración realizouse establecendo unha relación a través do nome do xene como identificador común en ambas táboas.

Exportouse o arquivo e seleccionáronse, de entre os reguladores alterados, *Mettl3*, *Mettl14*, *Mettl16*, *Fto* e *Alkbh5*.

4.2. Análise dun dataset de reprogramación celular somática de fibroblastos de rato

Co obxectivo de estudar o comportamento dos reguladores epitranscritómicos da modificación m⁶A durante o proceso de reprogramación celular somática, realizouse unha análise bioinformática dun conxunto de datos transcricómicos dispoñible publicamente na base de datos Gene Expression Omnibus

(GEO). Os datos foron extraídos do estudo publicado por Hoetker et al. (2023), titulado “*H3K36 methylation maintains cell identity by regulating opposing lineage programmes*” (Hoetker et al., 2023).

O ficheiro de expresión xénica obtido (formato .xlsx), contén os valores normalizados da expresión relativa de múltiples xenes en fibroblastos de rato ao longo de distintas fases da reprogramación (días 0, 2, 4, 6, 8 e colonias iPSC finais).

A partir dos datos contidos na táboa de Excel, recompiláronse os niveis de expresión destes xenes ao longo do tempo. A información foi organizada para xerar mapas de calor mediante ferramentas de visualización como Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>), co obxectivo de identificar patróns de regulación temporal asociados ao proceso de reprogramación.

4.3. Cultivo de liñas celulares

As células empregadas, HEK293T e fibroblastos primarios de rato, foron cultivados de maneira estándar en medio DMEM alto en glicosa (Corning™, #15323531), suplementado con 10% de soro fetal bovino (FBS), L-glutamina 200 mM, penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/mL. As liñas celulares foron mantidas en condicións estándar de cultivo, en esterilidade usando unha campá de fluxo laminar e en incubadoras a 37 °C con 5% de CO₂.

Para os ensaios de reprogramación empregouse medio pluripotente con soro e LIF (SL). Este consta de DMEM alto en glicosa (Corning™, #15323531), suplementado con 15% de FBS, 1% de mestura de nucleósidos, 200 mM de L-glutamina, 100 mM de aminoácidos non esenciais, penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/ml, 0,1 mM de β-mercaptoetanol e 1.000 U/mL de factor inhibidor de leucemia (LIF).

4.4. Reprogramación celular somática de fibroblastos de rato

Antes de empezar co procedemento experimental propio da reprogramación celular é necesario ter nunha placa crecendo a liña celular seleccionada, neste caso utilizáronse fibroblastos primarios procedentes da cola dun rato adulto de 12 meses de idade.

O primeiro día do procedemento aspírase o medio de cultivo da placa na que se encontran os fibroblastos e, seguidamente, lávase o pocillo unha vez utilizando PBS 1X para eliminar calquera resto de medio que poida quedar na placa. Este paso é necesario porque os medios de cultivo conteñen diferentes compostos que inhiben a acción da tripsina, encima que utilizamos para despegar as células, que crecen en adhesión, da placa. A incubación con tripsina realizouse durante 5 minutos a 37°C.

Unha vez transcorrido o tempo de incubación, inhibiouse a acción da tripsina engadindo medio de cultivo, e pasouse a suspensión celular a un tubo Falcon que se centrifuga a 300 x g durante 5 minutos para separar as células, que forman un pellet no fondo do tubo, do resto de compoñentes da suspensión. Seguidamente, aspirouse o sobrenadante do tubo e resuspendeuse o pellet.

Para o reconto celular empregouse unha cámara de Neubauer. Unha vez contados os fibroblastos, sementáronse dous pocillos con 16, 000 células por pocillo nunha placa de 12 pocillos, previamente tratada con xelatina ao 0.1% na que se levará a cabo a reprogramación celular somática. Un dos pocillos empregouse para a infección cos lentivirus OKSM e o segundo utilizouse como control negativo do experimento.

Para a infección, que se levou a cabo 24 horas despois da sementa, preparouse unha mestura de polibreno (concentración de traballo 6 µg/mL) e medio de fibroblastos fresco. O polibreno é unha molécula que aumenta a eficacia dos virus, entre 100 e 1,000 veces, na infección en células de mamíferos xa que neutraliza a repulsión de carga entre a superficie celular e a dos virus.

Despois de retirar o medio antigo, esta mestura engadiuse a ambos pocillos. Esta metodoloxía permitiu que as condicións experimentais sexan o mais semellantes posibles entre ambas condicións. Finalmente, engádense 15 µL dos lentivirus concentrados OKSM no pocillo a reprogramar.

Todo o material de cultivo que estivera en contacto cos lentivirus descartouse en lixivia concentrada.

A partir do terceiro día, o medio cambiouse diariamente e comezouse a utilizar medio para células nai embrionarias (medio SL). Este tipo de medio contén un compoñente non estándar: o Factor Inhibidor da Leucemia, ou LIF, un factor de crecemento que se utiliza para manter células nai pluripotentes (Wang, Y et al., 2015).

Ademais, periodicamente, tomáronse fotografías dos pocillos para avaliar os cambios que se produciron na morfoloxía celular. Este procedemento mantívose durante os 14 días seguintes a infección.

4.4.1. Reprogramación celular somática con silenciamento con shARNs

Para testar a influencia de silenciar *Mettl3* nos estadios temperáns da reprogramación celular somática, seguiuuse o protocolo experimental descrito no apartado 4.4. con pequenas adaptacións. No día 1, sementáronse 5,000 fibroblastos/pocillo nunha placa de 48 pocillos previamente tratada con xelatina ao 0.1%. Ao día seguinte relizouse unha co-infección cos lentivirus de *shMettl3* ou *shLuci* e lentivirus *OSKM*.

4.4.2. Procedemento experimental do análise mediante citometría de fluxo da proteína Nanog

No día 14 da reprogramación celular somática levamos a cabo un protocolo para estimar a porcentaxe de células reprogramadas mediante a detección de Nanog por citometría de fluxo. Para levalo a cabo, recollemos as células mediante tripsinización durante 20 minutos a 37°C con varias

rondas de “up and down” a distintos tempos da tripsinización. O obxectivo de este procedemento é disgregar as células das colonias reprogramadas en células individuais, que continuarían adheridas entre si se realizásemos un protocolo de disgregación química habitual. Despois de disgregar recollemos as células con medio de cultivo nun tubo Falcon que centrifugamos a 300 xg durante cinco minutos.

A continuación, contamos as células empregando unha cámara de Neubauer e alicuotamos, nun mililitro de PBS, a cantidade de células necesaria (320,000 células) para levar a cabo o protocolo de citometría de fluxo e centrifugamos a suspensión celular a 300 xg durante 5 minutos. Seguidamente, retiramos o sobrenadante (no pellet encóntranse as células) e realizamos un paso de lavado adicional con PBS para volver a centrifugar a 300 xg durante 5 minutos. Unha vez centrifugadas volvese a retirar o sobrenadante.

Como o noso obxectivo era detectar un marcador intracelular, Nanog, resuspendemos os pellets en 100 μ L do medio de fixado do kit comercial “FIX AND PERM™ Cell Permeabilization Kit” (Invitrogen) da compañía, durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Seguidamente lavamos as células utilizando 1 mL de medio de lavado (0.1% NaN₃, 5% FBS en PBS 1X) e volvemos a centrifugar a 300 xg durante 5 minutos.

Despois de retirar o sobrenadante resuspendimos as células utilizando o medio de permeabilización do kit e, a continuación, dividimos a solución celular en tres tubos: control negativo (sen anticorpo), control do anticorpo secundario e a condición experimental co anticorpo primario anti-Nanog e o secundario.

Cada condición conterà 100 μ L da suspensión celular (100, 000 células) e, no caso dos Eppendorfs correspondentes a condición C, o anticorpo anti-Nanog da compañía Santa Cruz Biotechnology (sc-134218). A incubación co anticorpo primario realizouse durante 1 hora a temperatura ambiente en axitación constante.

Seguidamente volvimos a lavar as células con medio de lavado e centrifugamos a 300 xg durante 5 minutos. Aspiramos o sobrenadante e resuspendimos os pellets correspondentes nunha solución que contén un anticorpo secundario marcado con Alexa Fluor 488 (JacksonImmunoResearch 715-545-150) diluído no medio de permeabilización nunha proporción 1:500. No caso da condición A o pellet foi resuspendido soamente utilizando o medio de permeabilización polo que no contendrá ningún dos anticorpos. A incubación realizouse a escuras e a 4°C durante 30 minutos.

Finalmente, lavamos as células utilizando o medio de lavado, centrifugamos a 300 xg durante 5 minutos e aspiramos o sobrenadante. Para realizar o análise por citometría de fluxo empregouse o equipo Beckman Coulter CytoFLEX e resuspendemos os pellets en 200 μ L dunha dilución de FBS en PBS ao 2%.

4.4.3. Ensaio de inmunofluorescencia

O día 15 da reprogramación celular somática, as células fixéronse nos pocillos cunha solución de para-formaldehído (PFA) ao 4% en PBS 1X. Para isto, as células laváronse utilizando 1X PBS e despois incubáronse en PFA durante 15 minutos a temperatura ambiente. Despois de fixar a placa, lavouse dúas veces con PBS e en PBS e sellada con parafilm a 4°C ata que se levou a cabo a tintura.

O primeiro paso da tinguidura é bloquear e permeabilizar as células. Para isto, aspirouse o PBS dos pocillos e incubouse cun “buffer de bloqueo e permeabilización” composto por 5% FBS, 0.3% tritón x-100 en 1xPBS durante 30 minutos a temperatura ambiente e na escuridade.

Unha vez terminada a incubación, laváronse os pocillos utilizando PBS dúas veces e comezouse a incubación co anticorpo primario anti-Nanog (sc-134218). Este estaba diluído nos compoñentes do “buffer de bloqueo e permeabilización” nunha proporción 1:1,000 co respecto do stock. A incubación co anticorpo primario realizouse durante toda a noite, a escuras e a 4°C.

Ao día seguinte os pocillos laváronse con PBS tres veces e despois incubáronse co anticorpo secundario Burro anti-rato AlexaFluor 488 (JacksonImmunoResearch 715-545-150) nunha proporción 1:500 mesturados con unha dilución DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) nunha proporción 1:1000 (concentración inicial= 1 mM) durante unha hora e media, a temperatura ambiente e na escuridade.

Despois fixéronse os últimos tres lavados con PBS e tomáronse as fotos utilizando un microscopio ZEISS Celldiscoverer 7 capaz de captar a fluorescencia emitida polo anticorpo secundario e DAPI.

4.5.Xeración de partículas lentivirais

Para producir as partículas lentivirais que empregaremos en fibroblastos nos apartados 4.6. e 4.7. empregamos células HEK293T que se co-transfectan con vectores que codifican para proteínas lentivirais que permitirán formar os lentivirus e o vector que permite a expresión dos shARN correspondentes. Para isto sementamos 500,000 células/pocillo HEK293T en placas de 6 pocillos cun medio composto por DMEM+ 10% FBS con penicilina e streptomina. Os cultivos incúbanse a 37°C, 5% CO₂ durante a noite.

Ao día seguinte da sementa, realizamos as seguintes dilucións:

- Por cada pocillo, 0.05 µL de JetPei 5x diluído en 100 µL de NaCl 150mM.

- Por cada pocillo, 1250 ng de ADN en NaCl 150mM nun volume final de 100 µL.

Nome do sh	Xen diana	Secuencia diana
pLKO.pim-shLuci	<i>Luciferasa</i>	5'-CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG-3'
pLKO.pim-shFto#1	<i>Fto</i>	5'-TAGTCTGACTTGGTGTTAAAT-3'
pLKO.pim-shMettl3#3	<i>Mettl3</i>	5'-GGAGATCCTAGAGCTATTA-3'
pLKO.pim-shMettl14#1	<i>Mettl14</i>	5'-CGGGAAAGAAACCGATCCAAT-3'

Táboa 2: Nome dos vectores pLKO empregados para o silenciamento xenético mediante shARN, xunto cos seus correspondentes xenos diana (*Luciferasa*, *Fto*, *Mettl3* e *Mettl14*) e as secuencias específicas empregadas.

Para mesturar de maneira apropiada as dilucións vortexeamos e espineamos cada unha antes de utilizalas. Seguidamente, engadimos a solución de JetPei na mestura de ADN e volvemos a vortexear e espinear. Neste paso é de importancia crítica mesturar as dilucións neste orde para non diminuír a eficiencia de transfección. Esta mestura final incubase durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Durante a incubación, reemplazamos o medio das HEK293T por 2 mL de medio fresco e, a continuación, engadese a mestura pinga a pinga nos pocillos, e homoxenízase para dispersar a mestura. É importante non realizar este paso de forma pouco vigorosa para evitar que as células se desprendan da placa. Finalmente, devolvemos as placas ao incubador e, vintecatro horas mais tarde realizamos un cambio de medio, descartando o medio en lexivia.

Corenta e oito e setenta e dous horas despois de realizar a transfección recolleemos o medio en tubos Eppendorf de 2 mL que foron almacenados a -80°C ata que se realizan as infeccións descritas nos apartados 4.6.

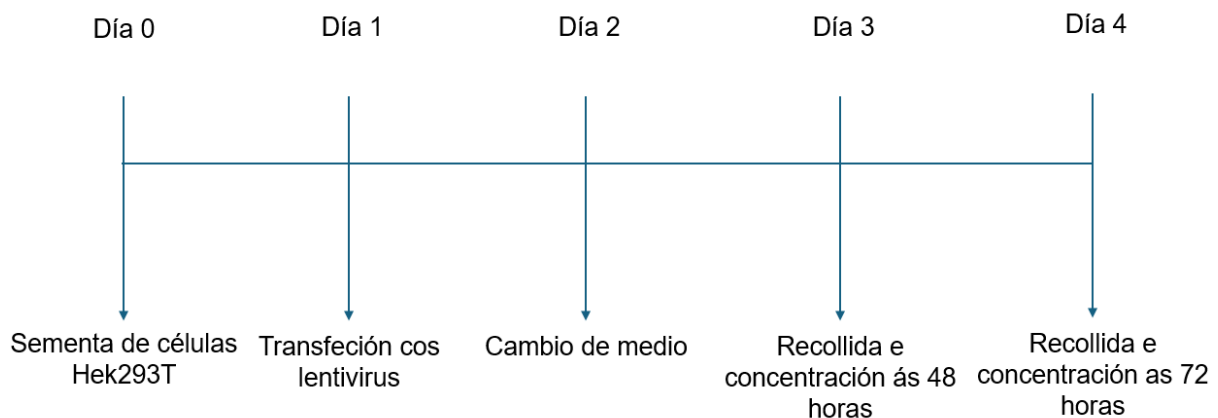


Figura 5: Esquema temporal da xeración de partículas lentivirais. O Día 0 realizouse a sementa celular, seguida pola transfección o Día 1 e o cambio de medio o Día 2. A recollida das partículas lentivirais foron feitas as 48 horas (Día 3) e as 72 horas (Día 4).

4.6. Infección de fibroblastos de rato utilizando shARNs para testear a súa eficiencia

Contáronse e sementáronse 32,800 fibroblastos inmortalizados por pocillo nunha placa de 12 pocillos en 1 mL de medio. Sementaremos un pocillo por cada shARN e dous máis para poder levar a cabo a selección: un deles corresponderá co control positivo ou de viabilidade e outro co control negativo ou de morte.

Vinte catro horas despois realizouse a infección cos shARNs. Neste caso, os lentivirus que conteñen os constructos cos shARNs non están concentrados polo que facemos unha mestura 50/50 do sobrenadante lentivírico e de medio fresco con polibreno (a concentración final de polibreno empregada foi de 6 µg/mL). A confluencia das células no momento da infección foi do 40%.

Ao día seguinte, comezamos a selección con puromicina, a unha concentración de traballo de 2 µg/mL. O antibiótico engádese coas células en suspensión polo que é necesario tripsinizarlas previamente a engadir a droga. A selección manteuse ata que todas as células do control de morte (sen infección e tratadas con puromicina) estaban mortas.

4.7. Extracción de ARN, síntese de ADN complementario e qPCR

Para extraer ARN das células empregouse o kit comercial EZNA Total RNA Kit seguindo as instrucións do fabricante. Unha vez extraídos todos os ARN cuantificáronse utilizando un Nanodrop. Unha vez obtidas as cantidades e calidade dos ARNs realizamos a transcrición reversa (RT) usando 1,000 ng de ARN total e a qScript cDNA superMix (5x) total e 4 µL da qScript cADN supermix (QuantaBio) ata un volume final de 20 µL.

Para a síntese de cADN empregouse o seguinte protocolo: 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C. O cADN diluíse e almaceouse a -20°C ata que se realizou a q-PCR. Para a realización da q-PCR empregáronse os oligos, tanto forward como reverse, listados na **táboa 3**.

Oligo	Secuencias
Act (F)	5'-ACCAACTGGGACGACATGGAGAAG-3'
Act (R)	5'-TACGACCAGAGGCATACAGGGACA-3'
Mettl3 (F)	5'-ATCCAGGCCATAAGAAACAG-3'
Mettl3 (R)	5'-CTATCACTACGGAAGGTTGGG-3'
Fto (F)	5'-TTCATGCTGGATGACCTCAATG-3'
Fto (R)	5'-GCCAACTGACAGCGTTCTAAG-3'
Mettl14 (F)	5'-CTGAGAGTGCGGATAGCATTG-3'
Mettl14 (R)	5'-GAGCAGATGTATCATAGGAAGCC-3'

Táboa 3: Secuencias do oligos empregados na qPCR. (F): forward, (R): reverse.

Se prepararon mezclas de 5 µL de PowerUp SYBR Green máster mix, 1 µL dunha mix 10 µM de dos oligos “forward” e “reverse” e 4 µL cDNA diluido. Estas mesturas cargáronse en placas de 384

pocillos e a qPCR levouse a cabo no sistema de PCR en tempo real QuantStudio 5 seguindo o programa da **táboa 4**.

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1	95	10 minutos
40	95	15 segundos
	55	15 segundos
	72	40 segundos
	95	5 segundos
1	65 (subindo 5°C/minuto ata alcanzar os 97°C)	1 minuto
1	97	15 segundos
-	4	manter

Táboa 4: Programa utilizado para a qPCR co número de ciclos, a temperatura e o tempo de de cada un deles.

O deseño experimental da qPCR baseouse na análise da expresión de distintos xenes implicados na modificación epitranscritómica m⁶A (*Mettl3*, *Mettl14* e *Fto*) en poboación celulares infectados cos diferentes shARNs que aparecen na **táboa 3**. Realizáronse reaccións en triplicado para cada xene en cada condición experimental o que permitiu avaliar a reproducibilidade e minimizar a variabilidade técnica. Ademais, incluíronse controis negativos sen cADN con auga H₂O para verificar a ausencia de contaminación ou amplificación inespecífica. Esta configuración permite comparar de forma fiable o efecto da interferencia xenética sobre os niveis de expresión dos xenes de interese entre as diferentes condicións experimentais.

5. Resultados e discusión

5.1. Análise *in silico* de reguladores epitranscritómicos en modelos de rato de proxeira

En primeiro lugar realizouse unha análise para determinar se había diferenzas globais de expresión entre os ratos proxéricos e os de fenotipo salvaxe. Para isto, realizouse unha análise de compoñentes principais (PCA), que se utiliza comunmente para reducir a dimensionalidade dos datos e visualizar agrupacións e patróns empregando a ferramenta Biojupies. Os eixes explican distintos porcentaxes da varianza total polo cal podemos afirmar que este tipo de visualización dos datos captura toda a variabilidade dos datos orixinais.

Na gráfica da **figura 6**, vemos que os grupos de fenotipo salvaxe (control) e proxéricos aparecen claramente separados polo PC1, o que suxire que existen diferenzas importantes na distribución dos datos entre ambas condicións. Ademais, os dous replicados de cada condición agrupan entre si, indicando unha boa semellanza entre as mostras e validando o uso deste dataset nas posteriores análises.

En conclusión, o PCA mostra que os datos baixo as condicións control e proxérico agrúpanse de forma diferenciada, polo que podemos afirmar que as condicións, individuos sans ou proxericos, afectan claramente á expresión xénica dos individuos.

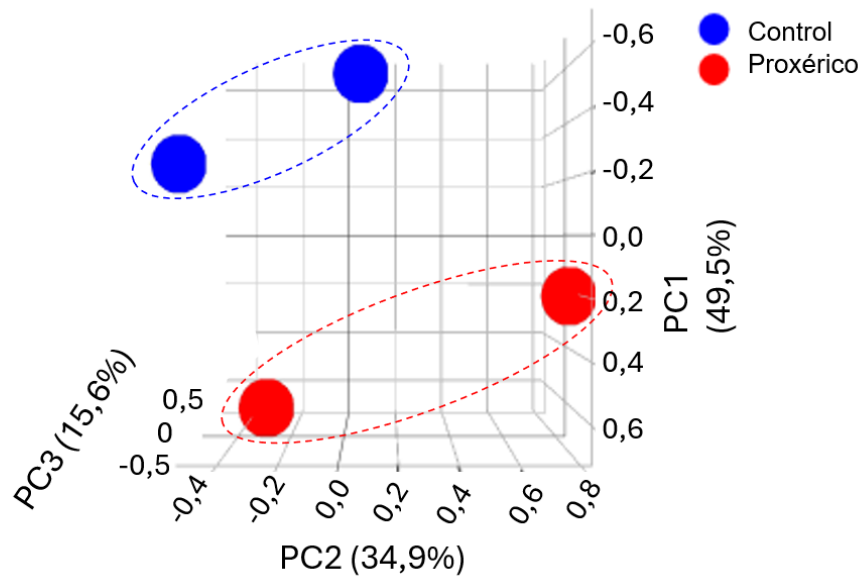


Figura 6: Análise de componentes principais (PCA) en 3D da expresión xénica en mostras control e proxéricas. Cada punto representa unha mostra individual: azul para Control e vermello para Proxérico. As elipses indican agrupacións segundo a variación explicada polas tres primeiras compoñentes principais: PC1 (49.5%), PC2 (34.9%) e PC3 (15.6%).

Para visualizar todos os xenes diferencialmente expresados entre as condicións control vs proxérico, obtívose un gráfico de volcán, ou volcano plot (**figura 7**).

O eixe das X representa o cambio de expresión transformado en logarítmico en base 2 (\log_2 FoldChange). Á esquerda do eixe das ordenadas encóntanse os valores negativos do logaritmo, é dicir, aqueles xenes que están expresados nun menor nivel (regulados á baixa; representados en azul) nos individuos proxéricos, e a dereita encóntanse aqueles valores que exprésanse nunha maior medida (regulados á alza; representados en vermello). Aqueles xenes que no presentan un cambio significativo na expresión entre as condición aparecen en negro na gráfica. O eixe das ordenadas ($-\log_{10}P$) representa o valor de significanza estatística: canto máis alto é o valor neste eixe, máis significativo é o resultado (p-valores máis pequenos).

Observando a gráfica podemos concluir que unha gran cantidade de xenes están alterados a causa da presenza da mutación en forma homocigota no xen da Laminina nos fibroblastos, con 9,712 regulados á alza e 11,679 regulados á baixa na condición de proxéricos respecto ao control. Este análise vai en liña co demostrado ata o momento, a Laminina non é só necesaria para manter a integridade nuclear se non tamén para manter unha apropiada expresión xénica nas células (Lammerding, J. et al, 2006).

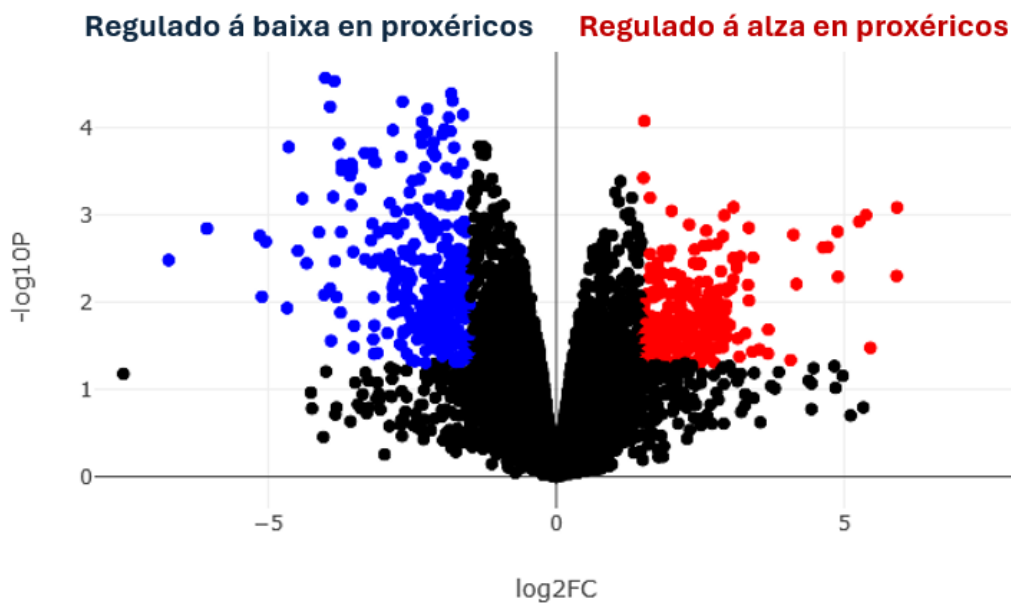


Figura 7: Gráfica tipo volcán que representa a expresión diferencial de xenes no tecido proxérico. O eixo X amosa o cambio de expresión en logaritmo base 2 (\log_2FC), mentres que o eixo Y representa a significancia estatística como $-\log_{10}$ do valor p . Os puntos vermellos indican xenes *sobreexpresados* (*up-regulated*) no tecido proxérico, e os azuis indican xenes *infraexpresados* (*down-regulated*). Os puntos negros corresponden a xenes sen cambios significativos na expresión.

Para explorar estes xenes regulados diferencialmente, leváronse a cabo os análises de enriquecemento funcional (“*gene ontology*”), tanto para os 137 xenes á alza, en vermello, como para os 98 regulados á baixa, en azul, en resposta á expresión de Proxerina, a forma anómala da Laminina A. O eixe das abscisas mostra os valores de $-\log_{10}(P)$.

A análise de funcións biolóxicas mostra que, nos individuos con proxerina (HGPS), hai unha regulación diferencial clara de diversas rutas moleculares en comparación cos individuos control.

Na **figura 8A**, os procesos positivamente regulados en individuos proxéricos inclúen:

- A regulación positiva da sinalización da quinasa-3 de fosfatidilinositol, que está implicada en procesos de crecemento e supervivencia celular.
- A organización da matriz extracelular, cuxa activación pode estar relacionada con procesos de remodelado tisular ou fibrosis, frecuentes en condicións de envellecemento prematuro.
- A presenza incrementada de compoñentes integrais da membrana plasmática, que pode reflectir cambios na composición ou función das membranas celulares.
- A regulación da fosforilación dos residuos de tirosina, un mecanismo clave na transdución de sinais e na activación de proteínas reguladoras.

Na **figura 8B**, os procesos negativamente regulados son principalmente rutas inmunolóxicas, incluíndo:

- A resposta celular ao interferón tipo 1 e ao interferón gamma, que xogan papeis esenciais na defensa fronte a infeccións virais e na modulación da resposta inmune.
- A vía de sinalización mediada por citoquinas, esencial para a comunicación intercelular en procesos inmunes.
- A regulación negativa do ciclo de vida vírico, o que podería suxerir unha diminución na capacidade de defensa contra infeccións virais.

Por un lado, a activación de procesos como a sinalización da quinasa-3 de fosfatidilinositol, a organización da matriz extracelular ou a fosforilación de residuos de tirosina en individuos con HGPS é consistente coa presenza de alteracións no tráfico nucleocitoplasmático, a expansión nucleolar e a disfunción mitocondrial. Isto é debido a que estas rutas están asociadas ao crecemento celular desregulado, remodelado tisular e cambios estruturais, todos eles fenómenos esperables nun contexto de inestabilidade nuclear como o que causa a proxeirina. A presenza incrementada de compoñentes da membrana plasmática tamén pode estar relacionada coa reorganización estrutural global e as alteracións no transporte intracelular (Cao, K. et al., 2007; Kubben, N. et al., 2017).

Por outra banda, a supresión de rutas inmunes (como a resposta ao interferón tipo I e gamma ou a sinalización mediada por citoquinas) observada na **figura 8B** pode estar relacionada coa acumulación de danos no ADN, o acurtamento telomérico e a disfunción mitocondrial, que, en conxunto, provocan un estado celular pro-envellecemento, con perda de funcionalidade e capacidade de resposta ante estímulos externos. A menor capacidade de resposta inmune suxerida polos datos é coherente coa maior

susceptibilidade a infeccións e procesos inflamatorios crónicos que caracteriza os pacientes con HGPS (López-Otín, C. et al., 2013).



Figura 8: Análise de enriquecemento de funcións biolóxicas (Gene Ontology) realizada coa ferramenta en liña BioJupies a partir dun conxunto de datos transcritómicos de individuos homocigotos para a expresión de proxerina (proxéricos) comparados con individuos homocigotos para a expresión de laminina A (control). **A)** Procesos biolóxicos significativamente regulados á alta en individuos proxéricos. **B)** Procesos biolóxicos significativamente regulados á baixa en individuos proxéricos.

O eixe X representa os valores de $-\log(p\text{-valor})$, indicando a significancia estatística dos termos enriquecidos.

Finalmente, se analizaron os niveis de expresión de distintos reguladores de m⁶A co obxectivo de observar se hai diferenzas entre ambas condicións de estudo.

A gráfica da **figura 9** mostra a expresión de ARN dos principais reguladores da modificación epixenética m⁶A en condicións silvestre (WT, do inglés “wild type”) e HGPS, concretamente para os xenes Mettl3, Mettl14, Mettl16, Fto e Alkbh5. Este análise non revelou diferenzas de expresión para ningún dos xenes analizados, suxerindo unha expresión amplamente conservada destes reguladores entre os dous contextos celulares, sendo necesarias análises máis profundas para esclarecer calqueira implicación funcional real.

Con todo, a ausencia de cambios a nivel de ARN non exclúe posibles alteracións funcionais destas encimas polo que sería interesante avaliar se existen modificacións a nivel proteico, xa que poderían

estar sometidas a regulación post-transcripcional, como cambios na estabilidade, na tradución ou degradación das proteínas. Ademais, tamén podería haber variacións na súa actividade encimática, mesmo sen cambios na súa abundancia.

Para investigar isto, poderían realizarse análises directas dos niveis de m⁶A nos ARN mensaxeiros mediante técnicas como LC-MS/MS (cromatografía líquida – espectrometría de masas en tándem), meRIP-seq (inmunoprecipitación de ARN con m⁶A seguida de secuenciación) ou m⁶A-CLIP (Cruzamento e inmunoprecipitación de m⁶A), que permitirían detectar cambios globais ou específicos nos patróns de metilación. Estudos previos teñen empregado este tipo de aproximacións en modelos de enfermidades ou en diferentes contextos celulares para revelar alteracións funcionais nos niveis de m⁶A, mesmo en ausencia de cambios na expresión dos xenes reguladores (Jiang et al., 2021; Gao et al., 2022).

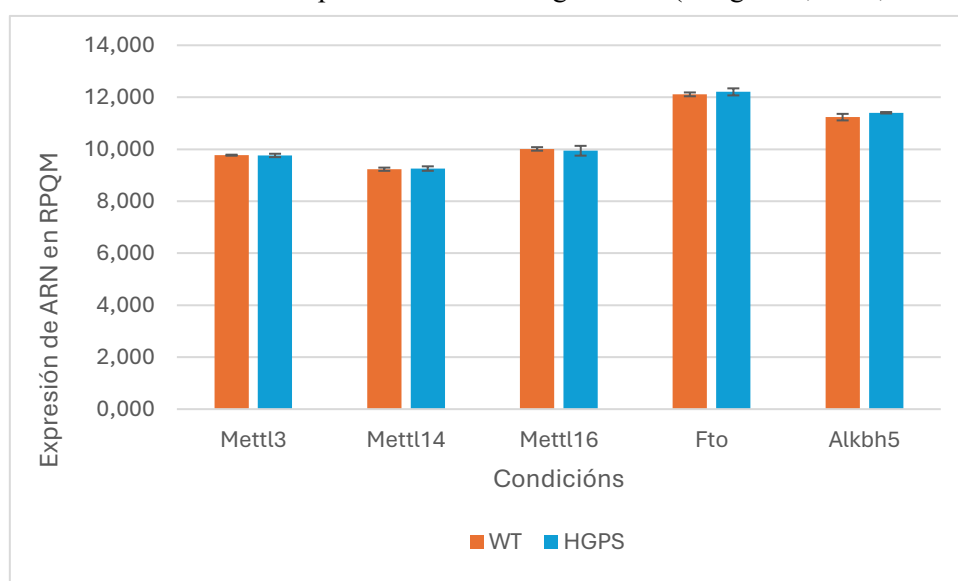


Figura 9: *Expresión media de ARN dos principais reguladores de m⁶A (Mettl3, Mettl14, Mettl16, Fto e Alkbh5) en condicións WT e HGPS. As barras representan a media de expresión en RPQM (lecturas por quilobase por millón de lecturas mapeadas) con erro estándar. Os valores numéricos de esta gráfica aparecen contidos na figura suplementaria 1.*

5.2. Análise da expresión de reguladores de m⁶A durante a reprogramación somática celular:

Os primeiros cambios detectables na reprogramación celular somática, a nivel morfolóxico, maniféstanse a través dunha transición celular coordinada, que inclúe unha rápida redución do tamaño celular e o inicio da formación de agrupamentos compactos de células redondeadas. Neste contexto, destaca a transición mesénquima-epitelio (MET), que implica a perda de características mesenquimais, como a motilidade celular, ao tempo que se adquiren propiedades epiteliais, tales como o establecemento de contactos célula-célula, a polaridade celular e a expresión de moléculas de adhesión (Li et al., 2010; Samavarchi-Tehrani et al., 2010; Zaravinos et al., 2015).

Co obxectivo de estudar que o ARN-seq empregado reproduce o contido da literatura, analizáronse os valores de expresión xénica que aparecen na **figura 10**. Os datos corresponden cos obtidos dos cultivos entre os días 0-8 da reprogramación e as iPSC nas poboacións celulares OKSM, nos que se puido advertir: unha regulación á alza e homoxénea de reguladores epiteliais (**figura 10A**) e unha regulación á baixa de varios marcadores mesenquimáticos (**figura 10B**) conforme avanza o proceso de reprogramación celular.

A	Nome do xen	d0	d2	d4	d6	d8	iPSCs
	<i>Cdh1</i>	8,67	8,08	482,22	2863,22	7614,40	14008,08
	<i>Epcam</i>	6,19	13,01	184,99	1172,03	4777,00	8195,88
	<i>Cldn3</i>	3,65	14,91	46,43	109,34	472,97	284,85
	<i>Ocln</i>	1,20	6,02	119,38	321,26	558,37	263,74

B	Nome do xen	d0	d2	d4	d6	d8	iPSCs
	<i>Zeb1</i>	2909,71	1218,65	1182,40	1106,94	748,29	272,39
	<i>Snai2</i>	1363,44	224,17	111,49	122,16	81,85	75,07
	<i>Vim</i>	150240,67	109262,79	146627,63	117974,19	78782,75	9146,90
	<i>Fn1</i>	205306,941	27455,14	19516,91	32538,15	31508,18	69066,09
	<i>Cdh2</i>	3692,03	2865,59	1884,02	1580,13	1040,19	87,49

Figura 10: Media da expresión obtida das células durante a reprogramación. Os xenes da táboa A son marcadores epiteliais e os contidos na táboa B son marcadores mesenquimais. d0: día cero; d2: día 2; d4: día catro; d6: día seis; d8: día oito e células pluripotentes inducidas (iPSCs). Marcado por un gradiente por fila vermello-azul os niveis de expresións dos xenes de máis a menos abundante.

Superada esta fase de iniciación, marcada pola MET, iníciase a fase de maduración. Durante esta etapa, a expresión dos marcadores mesenquimais desaparece por completo mentres se activa de maneira progresiva a expresión de xenes asociados á pluripotencia, como *Fbxo15* e *Sall4*, seguidos por *Nanog*, *Esrrb* e *Oct4* endógeno. A activación definitiva de *Nanog* representa un punto de inflexión necesario e irreversible, que permite o paso á fase final da reprogramación: a fase de estabilización (**figura 11**) (Martín López, M., 2016).

Nesta última etapa prodúcense cambios transcricionais e proteómicos significativos, caracterizados pola reactivación secuencial de xenes responsables do mantemento e regulación da pluripotencia, como *Lin28*, *Rex1*, *Dppa2* (*Developmental pluripotency associated 2*), *Dppa3*, *Dppa4*, *Dppa5*, *Gdf3* (*Growth and differentiation factor*) e *Utf1*. Este proceso culmina coa consolidación do estado pluripotente nas células reprogramadas (**figura 11**) (Martín López, M., 2016).

Nome do xen	d0	d2	d4	d6	d8	iPSCs
<i>Fbxo15</i>	0,62	14,65	79,30	135,76	281,70	3472,38
<i>Sall4</i>	0,60	0,45	78,34	316,48	923,29	5585,72
<i>Nanog</i>	11,57	3,68	6,96	240,62	1766,46	10328,71
<i>Esrrb</i>	1,82	2,42	3,30	50,73	602,29	14970,48
<i>Oct4</i>	26,74	5844,95	3471,83	3820,95	5336,64	20057,16
<i>Lin28</i>	0,00	0,00	5,51	28,58	205,53	8060,00
<i>Rex1</i>	105,60	154,78	73,99	91,68	126,80	1088,45
<i>Dppa2</i>	2,42	0,00	0,00	1,61	32,68	528,84
<i>Dppa3</i>	1,82	0,00	1,83	5,94	160,14	1328,87

Figura 11: Media da expresión obtida das células durante a reprogramación durante as fases de maduración e de estabilización. d0: día cero; d2: día 2; d4: día catro; d6: día seis; d8: día oito e células pluripotentes inducidas (iPSCs). Marcado por un gradiente por fila vermello-azul os niveis de expresións dos xenes de máis a menos abundante.

Seguidamente, propúxenme analizar a expresión dos principais escritores, borradores e lectores, involucrados na regulación de m⁶A en mARN durante as distintas fases da reprogramación empregando os datos citados. Para isto, se realizou un mapa de calor coa ferramenta en liña Morpheus, o cal aparece na representado na **figura 12**. Nel podemos observar que a expresión de xenes codificantes de reguladores de m⁶A varía segundo avanza a reprogramación celular dos fibroblastos de rato cara células iPSCs:

- En canto aos “*writers*”, *Mettl3* e *Mettl14* pódese afirmar que a súa expresión xénica tende a aumentar gradualmente dende os fibroblastos ao día 0 de reprogramación ata que están completamente reprogramadas as células a iPSCs. No caso de *Mettl16* prodúcese un pico na expresión no día 2, diminúe o día 4 e despois aumenta progresivamente ata chegar ao estado de iPSCs. Este suceso pode indicar que o proceso de escritura de m⁶A é de unha necesidade maior segundo avanza as etapas da reprogramación.
- Por outra banda, os dous “*erasers*” non seguen a mesma tendencia. *Alkbh5* ten altos niveis de expresión nas iPSCs. Pola contra, os valores correspondentes con *Fto* tenden a diminuír durante os oito primeiros días da reprogramación e teñen un leve repunta nas colonias de iPSCs, polo que os niveis máis altos de este xen encóntranse nos fibroblastos a día 0.

- Finalmente, os “*readers*”: a expresión de *Ythdf2* aumenta entre os dous primeiros días da reprogramación e despois diminúe progresivamente ata un nivel medio nas iPSCs; *Ythdc1* vai aumentando a súa expresión progresivamente ata chegar ao estado de iPSCs; *Ythdc2* ten un pico de expresión no día dous e despois a súa expresión diminúe entre os días 4 e 6 e finalmente aumenta ata chegar ao estado de iPSCs; *Ythdf1* ten o seu pico de expresión no estado final de iPSCs; e *Ythdf3* ten os seus maiores niveis de expresión os primeiros días da reprogramación. Observando estes datos, pódese especular que estas proteínas poderían ter como función facilitar a eliminación do transcrito orixinal, propio dos fibroblastos, mediante a degradación selectiva dos ARNs metilados, permitindo, deste modo, establecer un novo transcrito compatible cun estado de pluripotencia. . Ademais, as distintas tendencias na expresión dos distintos “*readers*” suxire que posiblemente cumpran funcións únicas e non redundantes neste proceso, observación apoiada por estudos publicados que demostran que YTHDF2 e YTHDF3, pero non YTHDF1 son necesarios para a reprogramación celular somática (Liu, J., et al., 2020).

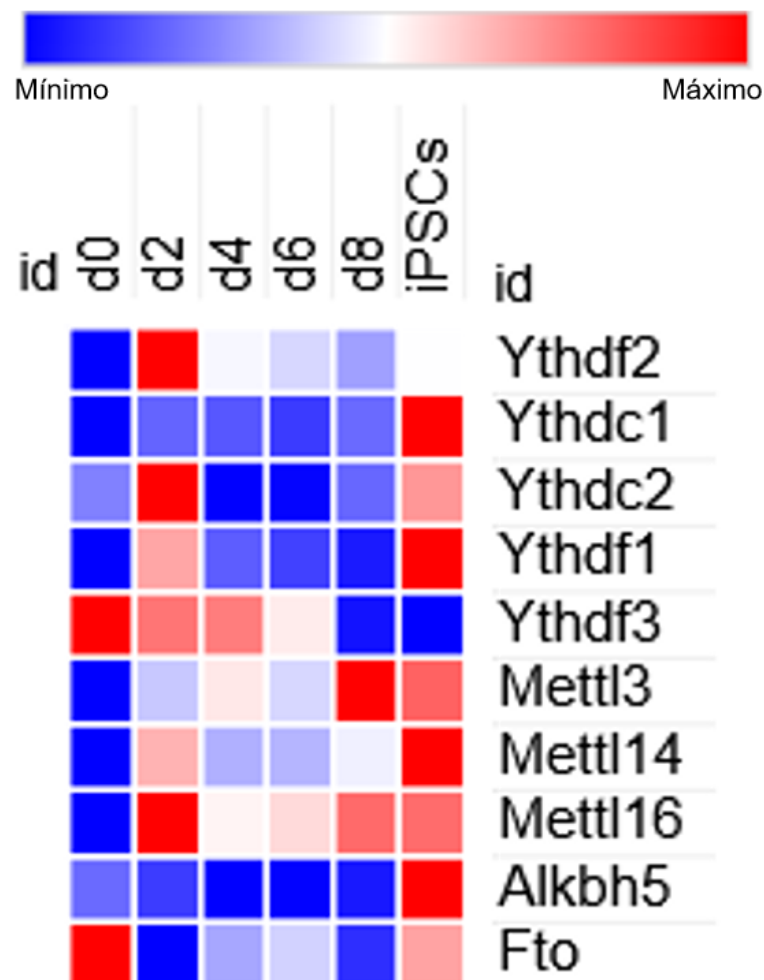


Figura 12: Mapa de calor da expresión xénica de “*writers*” (*Mettl3*, *Mettl14* e *Mettl16*), “*erasers*” (*Alkbh5* e *Fto*) e “*readers*” (*Ythdc1*, *Ythdf1*, *Ythdf2*.) de m6A durante o proceso de reprogramación celular cara a células nai pluripotentes inducidas (iPSCs). Amonsanse os niveis relativos de expresión dos xenes relacionados coa metilación do ARN en distintos días do proceso de reprogramación (d0 a d8) e en células iPSC. As cores indican os niveis de expresión relativa, onde o azul representa expresión mínima e o vermello expresión máxima. Os valores numéricos representados en este mapa de calor aparecen contidos na figura suplementaria 2.

5.3. Uso do sistema lentiviral OKSM para reprogramar fibroblastos de rato

Durante o proceso de reprogramación celular dos fibroblastos de cola de rato adulto mediante infección cun construto lentiviral OKSM, realizouse un seguimento visual da evolución morfolóxica celular e tomáronse imaxes por microscopía óptica nos días 1, 6 e 13 posteriores á infección. Este seguimento permitiu avaliar de forma cualitativa o progreso do proceso de reprogramación, así como identificar indicios iniciais da formación de colonias de células pluripotentes inducidas (iPSCs).

No **día 1**, despois da infección viral, os fibroblastos presentaban a morfoloxía típica de células fusiformes, alongadas e organizadas en monocapa adherida ao fondo do pocillo. A súa distribución era uniforme e non se apreciaban signos de diferenciación ou alteracións estruturais. (**figura 13**).

No **día 6**, tras varios días de exposición ao medio SL e á acción dos factores de transcripción codificados polo lentivirus (*Oct4*, *Klf4*, *Sox2* e *c-Myc*), comezaron a observarse os primeiros cambios morfolóxicos. En certas zonas do pocillo tratado, as células perderon a súa forma fusiforme e comezaron a adquirir unha morfoloxía máis redondeada e compacta, formando pequenos grupos celulares. Estas estruturas son indicativas do inicio da MET. A diferenza co control negativo era evidente, xa que neste último non se rexistraban cambios morfolóxicos nin formación de agrupamentos celulares.

No **día 13**, os sinais de reprogramación eran máis pronunciados. As colonias redondeadas e compactas, con bordes definidos, era visibles no pocillo infectado. Estas características son propias das colonias de iPSCs e coinciden cos criterios morfolóxicos, descritos na literatura para células, en estado pluripotente. Pola contra, o pocillo control mostraba un crecemento celular típico de fibroblastos, sen formación de colonias nin cambios estruturais.

En resumo, a análise das imaxes ao longo do experimento amosa unha progresión clara e consistente da reprogramación celular inducida por lentivirus OKSM: a aparición progresiva de colonias con morfoloxía compatible con iPSCs no pocillo tratado, e a súa ausencia no control negativo,. Estes resultados confirman a eficacia do protocolo empregado e reforzan o valor da observación

morfolóxica como ferramenta complementaria ao diagnóstico molecular no seguimento de procesos de reprogramación celular.

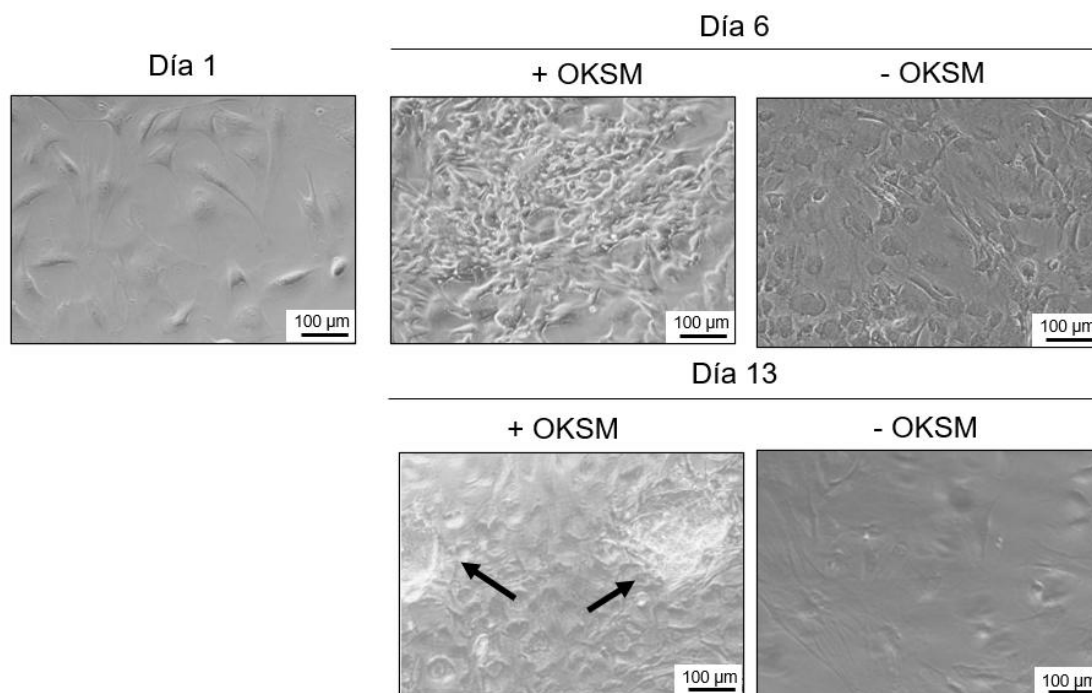


Figura 13: Seguimento morfolóxico do proceso de reprogramación celular con OKSM ao longo de 13 días. Imaxes de microscopía de células vivas sen tinguir control (- OKSM) e en reprogramación (+ OKSM) a días 1,6 e 13 da reprogramación celular. Escala: 100 µm..

5.3.1. Análise mediante citometría de fluxo da eficiencia de reprogramación:

Co obxectivo de cuantificar o porcentaxe de células reprogramadas a día 13 da reprogramación, procedeuse a detectar células que expresaban *Nanog*, un factor de transcripción que axuda no mantemento da pluripotencia mediante a supresión de factores de determinación celular (Heurtier, V., Owens, N., Gonzalez, I. et al., 2019), mediante citometría de fluxo. Na **figura 14** e a **táboa resumo 5** recóllense o porcentaxe e número de células detectadas como positivas para *Nanog* na mostra do ensaio e os controis.

Observando os datos obtidos na táboa e figura superiores podemos afirmar que:

1. A porcentaxe de células *Nanog* positivas nas respectivas poboacións celulares son consistentes cos valores esperados para cada grupo experimental:

a. Control negativo (SCR c (-)):

Nesta condición, as células non foron expostas a ningún anticorpo, actuando como control basal para avaliar a autofluorescencia do sistema. O sinal verde detectado foi lixeiro, o que indica que corresponde ao ruído de fondo propio do equipamento e non á sinal específica. Estes resultados confirman que a autofluorescencia non interfere de maneira significativa na detección do marcador *Nanog*.

- b.** Control con só anticorpo secundario (SCR sec. Ab.):
Este control é fundamental para descartar unións inespecíficas do anticorpo secundario. Observouse unha porcentaxe mínima de células fluorescentes, comparable ao control negativo, o que indica que o anticorpo secundario non se une espontaneamente a estruturas celulares. Así, podemos concluír que a fluorescencia observada nas condicións experimentais se debe exclusivamente á unión específica do anticorpo primario contra Nanog.
 - c.** Condición experimental (SCR Nanog (+)):
Na condición onde se incubaron as células con ambos anticorpos (primario anti-Nanog e secundario fluorescente), observouse unha porcentaxe significativamente superior de células fluorescentes. Este resultado é coherente coa expresión esperada de Nanog nas células reprogramadas, confirmando a presenza deste marcador pluripotente na poboación analizada.
2. Os procesos de fixación e lavado empregados no protocolo experimental deben ser claramente optimizados, xa que, observouse que a cantidade final de células detectadas no ensaio, en todas as condicións, é significativamente inferior á poboación celular inicial. Esta flutuación non só compromete a reproducibilidade do experimento senón que tamén dificulta a interpretación cuantitativa dos datos, debido a que na análise por citometría de fluxo a cantidade e calidade celular son factores críticos. É posible que as perdas estean relacionadas con tempos de incubación excesivos, manipulacións bruscas ou centrifugacións inadecuadas, polo que se recomenda revisar detalladamente cada etapa para minimizar perdas celulares. Ademais, esta escasa cantidade de eventos dificultou a definición clara da poboación de células (gating) e a separación de posibles os restos celulares (debris) que podían estar contidos na mostra.

En conclusión, podemos afirmar que, para solucións futuras, é necesario mellorar o rendemento do protocolo mediante cambios no número de células inicial ou nos procesos de fixado e lavado das poboacións celulares.

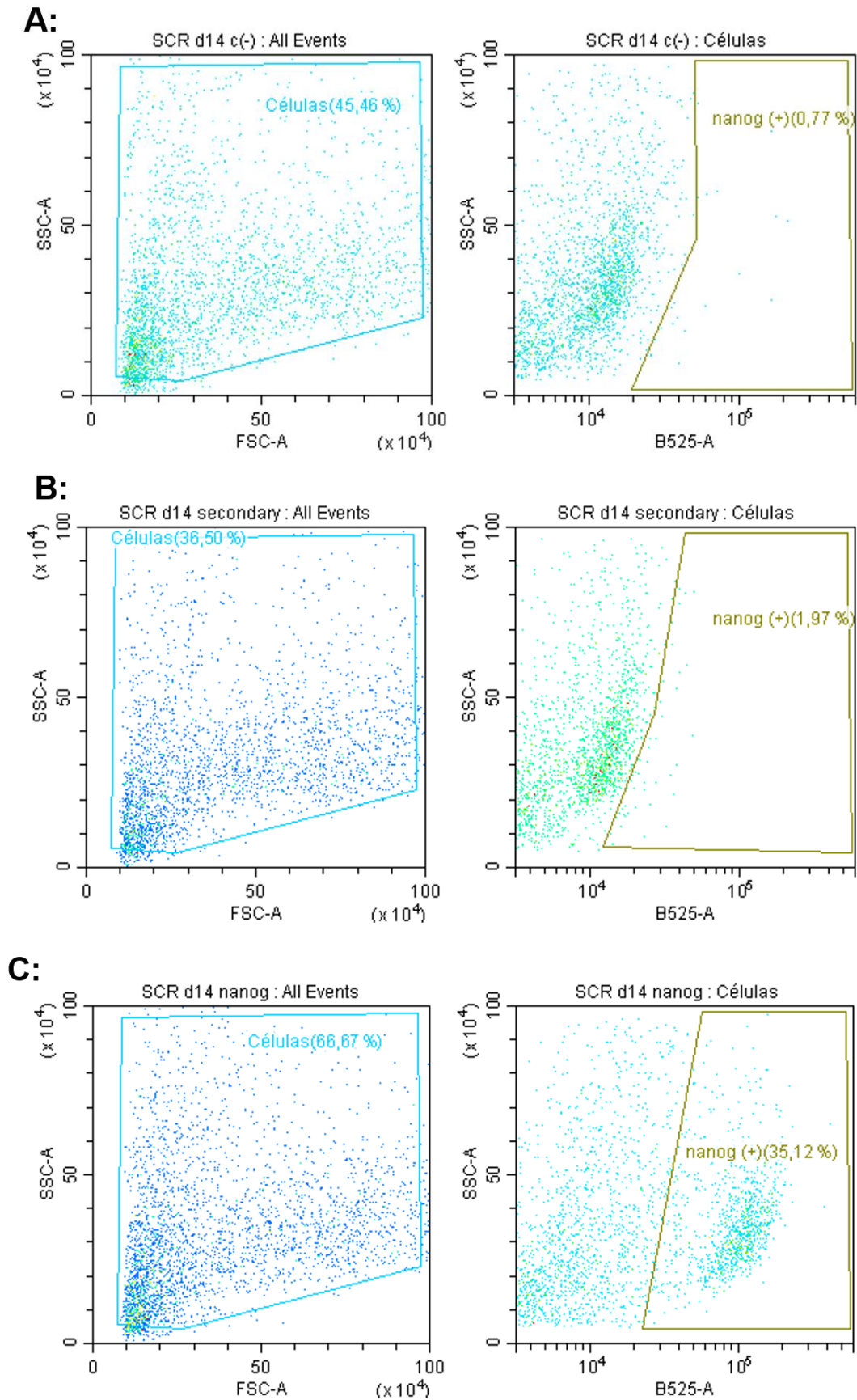


Figura 14: Gráficas obtenidas do ensaio de citometría de fluxo (FACS) para a detección do marcador Nanog en distintas condicións experimentais. As poboacións celulares analizáronse tras a incubación co anticorpo primario anti-Nanog e o anticorpo secundario conxugado con Alexa Fluor 488.

	Nº de células	% de células Nanog positivas
SCR d14 c (-)	2731	0.77
SCR d14 sec. Ab.	2381	1.97
SCR d14 Nanog (+)	2916	35.12

Táboa 5: número de células e porcentaxe de células Nanog positivas obtidas en cada condición de estudo despois de realizar o protocolo de citometría de fluxo (4.4.1.)

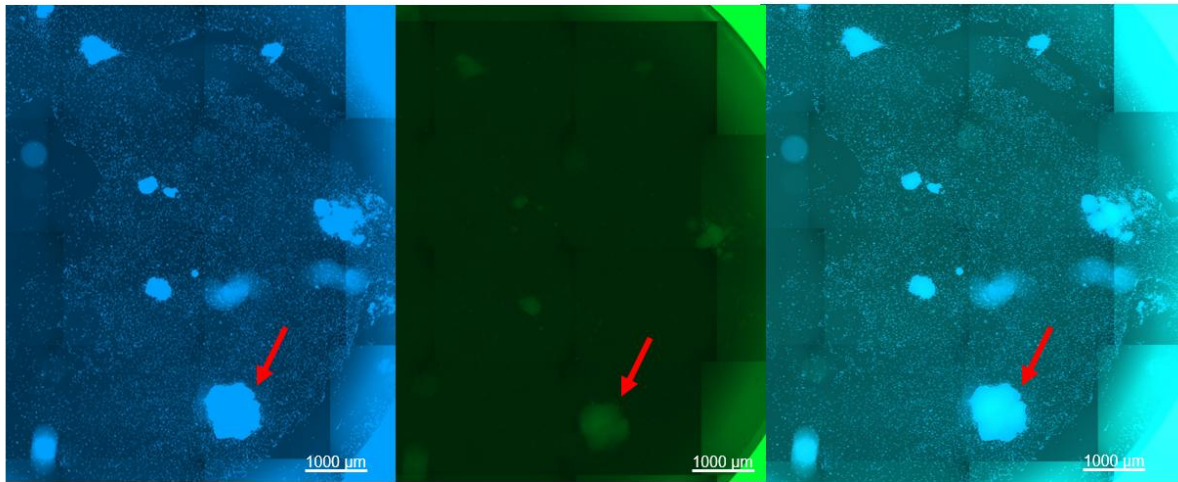
5.3.2. Detección da activación do marcador de pluripotencia *Nanog* trasla reprogramación mediante inmunofluorescencia

Como aproximación complementaria ao análise por citometría de fluxo, levouse a cabo unha inmunofluorescencia para Nanog tamén a día 13 de reprogramación. Os resultados obtidos do ensaio de inmunofluorescencia mediante microscopía foron claros: no pocillo tratado co lentivirus OKSM, observouse unha sinal fluorescente verde intenso exclusivamente nas células que formaban colonias, indicando a expresión do marcador Nanog e, polo tanto, a reprogramación efectiva dos fibroblastos. Pola contra, as células que non formaban colonias nestes mesmos pocillos non presentaban sinal verde detectable, o que reforza a especificidade da expresión de Nanog nas células reprogramadas (figura 14).

No caso do pocillo control, que non foi infectado co lentivirus, non observamos ningunha sinal significativa de fluorescencia verde, confirmando que a sinal observada é específica e consecuencia directa da expresión dos factores de transcripción OKSM contidos no lentivirus. A ausencia de sinal inespecífica nos pocillos control tamén valida a especificidade dos anticorpos utilizados, tanto primario coma secundario, e confirma a eficacia do protocolo de bloqueo e lavado. Ademais, a distribución nuclear da fluorescencia azul (DAPI) foi uniforme e coherente co número e morfoloxía esperada dos núcleos, o que indica que o procedemento de fixado e permeabilización non afectou negativamente á integridade celular.

En resumo, este ensaio a pequena escala confirma a eficacia do proceso de reprogramación mediante lentivirus OKSM, e demostra que o protocolo de tinguidura inmunofluorescente é fiable para detectar a expresión de marcadores de pluripotencia como *Nanog*.

A: OKSM (+)

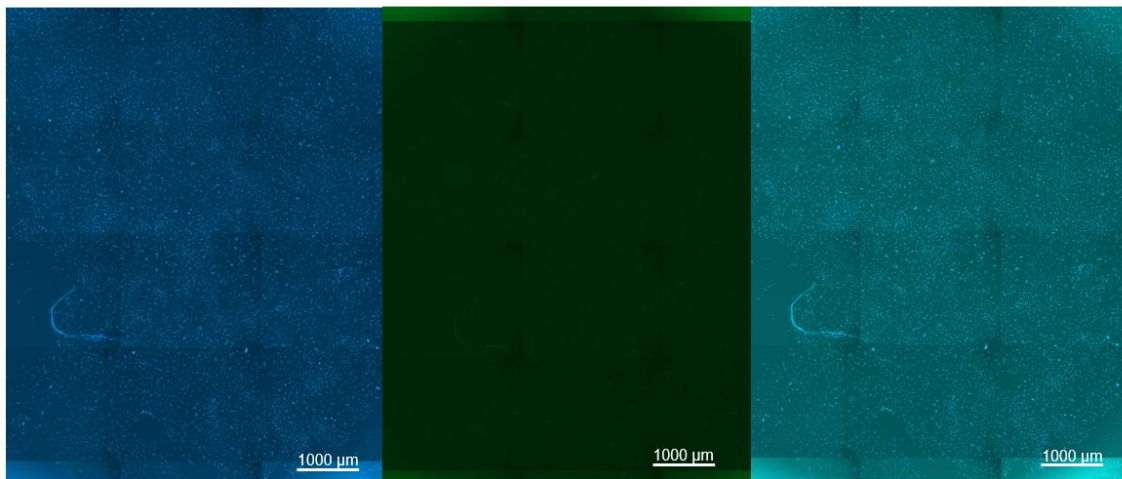


Dapi

Nanog

Merge

B: OKSM (-)



Dapi

Nanog

Merge

Figura 15: Imaxes obtidas mediante microscopía de fluorescencia do ensaio de reprogramación en placa de 48 pocillos. As células foron tinguidas con DAPI (azul) para visualizar os núcleos e co anticorpo secundario Alexa Fluor 488 (verde) para detectar a expresión do marcador de pluripotencia Nanog. A: células infectadas co lentivirus OKSM. B: células non infectadas. na figura), indicando unha reprogramación efectiva. As imaxes foron adquiridas co microscopio ZEISS CellDiscoverer 7. Escala: 1,000 µm..

5.4. Avaliación da eficiencia de silenciamento dos shARNs

Na **figura 16** represéntase a expresión relativa de distintos xenes implicados na regulación da marca epitranscritómica m⁶A tras a inhibición específica de *Fto*, *Mettl3* e *Mettl14* mediante o uso de shARNs dirixidos. A expresión dos xenes normalizouse respecto ao xene constitutivo Actb (HK, do inglés “housekeeping”) e ao grupo control, tratado con *shLuci*.

Na **figura 16A**, o silenciamento de *Fto* provocou unha redución marcada da súa expresión, o que confirma a eficacia do “*knockdown*”. Ademais, observouse unha lixeira diminución nos niveis de expresión de *Mettl3* e *Mettl14*. Na **figura 16B**, vemos que o silenciamento de *Mettl3* é inferior ao 70%, suxerindo unha baixa eficacia dos shARNs. Ademais, asociouse cun incremento na expresión de *Mettl14* e, de maneira máis pronunciada, de *Fto*. Este aumento podería deberse á existencia de mecanismos compensatorios ou de retroalimentación entre os distintos compoñentes da maquinaria epitranscritómica. Por último, na **figura 16C**, o silenciamento de *Mettl14* foi tamén pouco pronunciado e este provocou un incremento tanto de *Mettl3* como de *Fto*. A expresión deste último aumentou de maneira considerable, reforzando a hipótese dun equilibrio regulador entre escritores (“*writers*”) e borradores (“*erasers*”) da metilación m⁶A.

En resumo, a marcada redución na expresión de *Fto* tras o tratamento con shARNs específicos, indica que o shARN empregado ten alta eficiencia. Pola contra, para *Mettl3* e *Mettl14* a eficiencia de silenciamento foi solo parcial. Experimentos replicados serán necesarios para validar este resultados e así poder empregalos como ferramentas útiles para o estudo da epixenética do ARN e da súa implicación en diversos procesos celulares.

Ademais, a observación de efectos compensatorios tras o silenciamento de *Mettl3* e *Mettl14*, reflectidos no incremento da expresión de *Fto*, reforza a hipótese de que os niveis de metilación m⁶A están sometidos a un control fino por parte da célula para manter o equilibrio funcional.

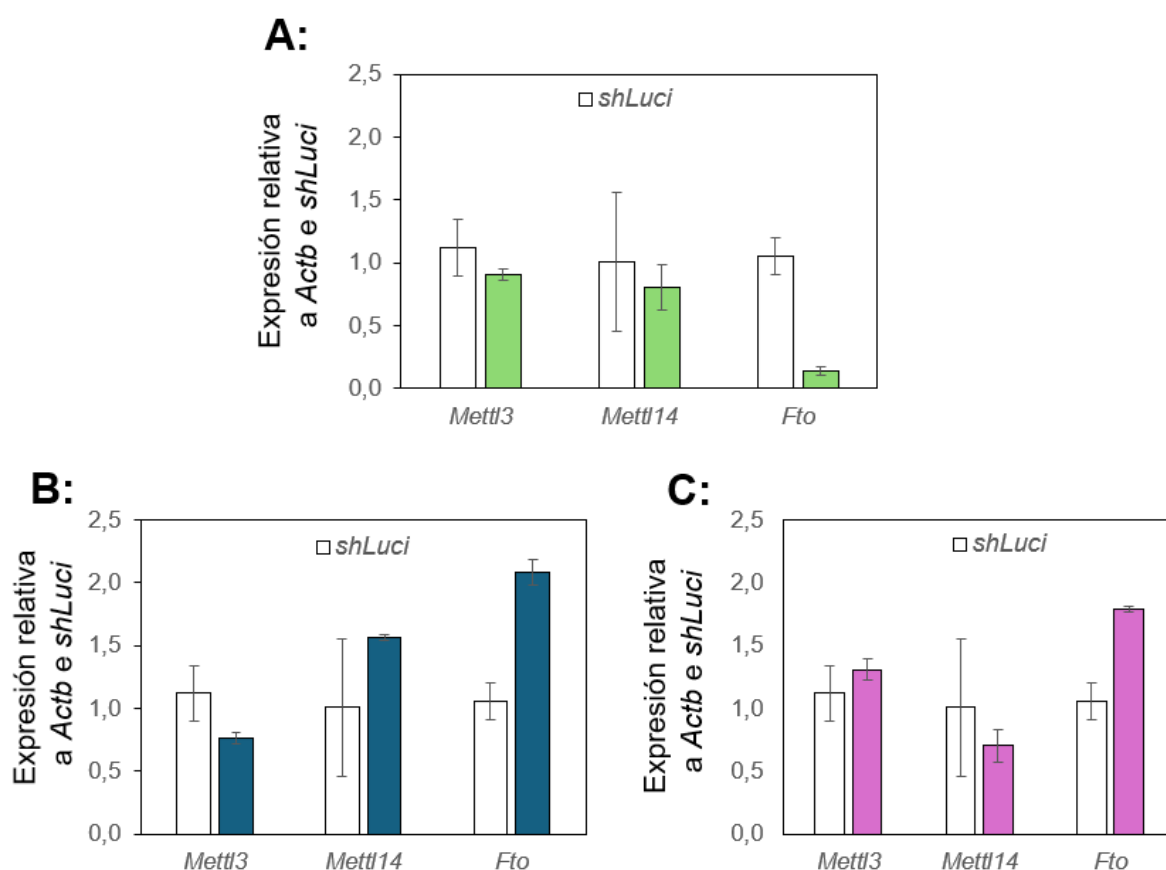


Figura 16: Efecto do silenciamento con shARNs dos “writers” de m⁶A Mettl3/Mettl14 e o “eraser” Fto na expresión destes reguladores epitranscritómicos. Gráficos de barras que mostran a expresión relativa de β -actina (ActB) (xene constitutivo ou “housekeeping;HK”), Mettl3, Mettl14 e Fto en células tratadas con shARNs dirixidos contra Fto (A), Mettl3 (B) e Mettl14 (C), en comparación co control (células tratadas con shLuci). A expresión foi normalizada ao xene de referencia Actb (HK) e Luci, que non deberían variar os seus niveis de expresión en ningunha das condicións. As barras representan a media \pm erro estándar da media dos replicados técnicos.

$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$	Actb (HK)	Mettl3	Mettl14	Fto
shLuci	1,02 \pm 0,22	1,12 \pm 0,55	1,01 \pm 0,15	1,05 \pm 0,39
shFto	1,00 \pm 0,04	0,91 \pm 0,18	0,80 \pm 0,03	0,14 \pm 0,05
shMettl3	1,00 \pm 0,04	0,77 \pm 0,02	1,56 \pm 0,10	2,08 \pm 0,14
shMettl14	1,00 \pm 0,09	1,30 \pm 0,13	0,70 \pm 0,02	1,79 \pm 0,19

Táboa 4: Niveis relativos de expresión xénica de Mettl3, Mettl14 e Fto, normalizados fronte a Actb (xene de referencia, HK) e Luci en células transducidas con shARNs dirixidos contra Luci (control), Fto, Mettl3 e Mettl14. Os valores de expresión foron calculados mediante o método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Os datos represéntanse como media \pm desviación estándar (D.V.).

5.5. Avaliación do impacto do silenciamento de Mettl3 en reprogramación celular somática

O papel do escritor de m⁶A Mettl3 en reprogramación celular somática é controvertido, con estudos nos que se mostra que o silenciamento reduce a eficiencia da reprogramación celular somática

e outros que non reportan cambios como consecuencia do seu silenciamento (Liu, L. et al., 2015; Aguilo, F. et al., 2015; Slobodin, B. et al., 2022). Para avaliar se os niveis de expresión de este “writer” afectan á eficiencia de este proceso no noso modelo experimental, realizouse un ensaio de reprogramación no que se silenciou *Mettl3* no día 0 da reprogramación. Para avaliar a eficiencia de reprogramación realizouse una inmunofluorescencia contra o marcador pluripotente *Nanog* a día 12 da reprogramación celular somática.

Os resultados obtidos do ensaio de inmunofluorescencia mediante microscopía foron consistentes e informativos:

No pocillo control (**figura 18A**), que non foi infectado cos factores de reprogramación OKSM, non se observou sinal significativa de *Nanog* (verde), indicando, como era esperado, a ausencia de expresión deste marcador de pluripotencia e, polo tanto, a falta de reprogramación celular. Esta ausencia de sinal tamén confirma a especificidade do anticorpo secundario, xa que non se detecta unión inespecífica.

No pocillo tratado con *shLuci* (**figura 18B**), que actúa como control negativo para interferencia é positivo para a formación de colonias, detectouse unha forte sinal verde en colonias, indicando que a reprogramación transcorre normalmente na ausencia de silenciamento dirixido.

No pocillo tratado con *shMettl3* (**figura 18C**), observouse un número reducido de colonias positivas para *Nanog*. Isto suxire que, malia a interferencia do *shMettl3*, a reprogramación segue sendo posible, aínda que menos efectiva, neste contexto.

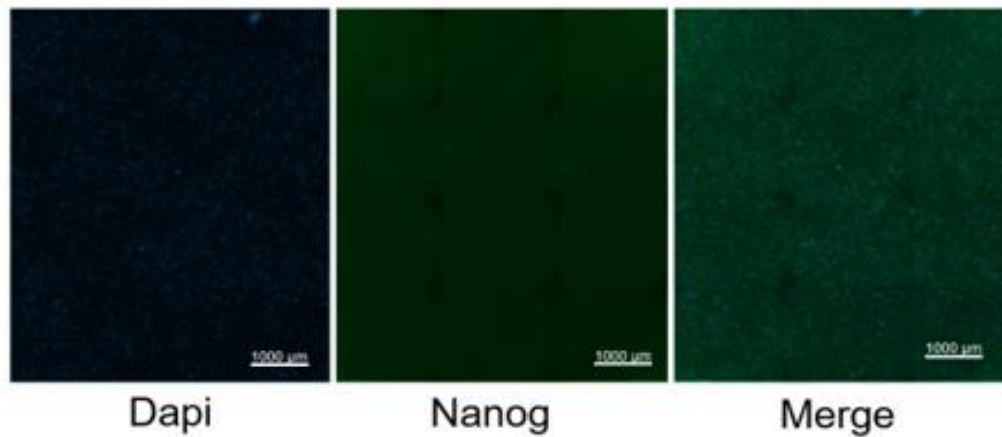
A análise cuantitativa dos resultados confirma as observacións morfolóxicas previamente descritas. Tal e como se reflicte na gráfica (**figura 18**), o número medio de colonias positivas para *Nanog* por pocillo foi maior na condición control *ShLuci* (56 ± 4.97) en comparación coa condición experimental *ShMettl3* (19.33 ± 5.56).

A presenza dun número menor de colonias en *ShMettl3* apoia a hipótese de que *Mettl3*, unha metiltransferase asociada á modificación epitranscritómica m⁶A, xoga un papel facilitador na adquisición do estado pluripotente.

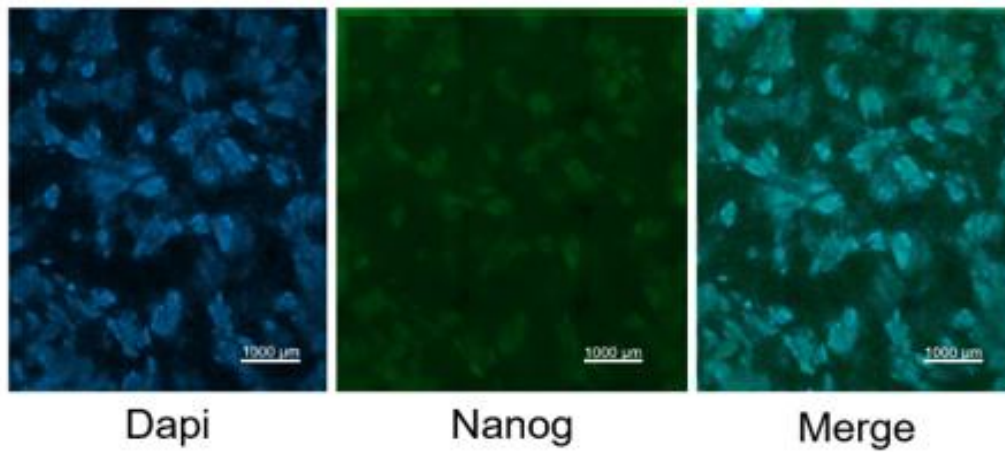
Estes resultados experimentais sitúanse dentro do marco dun debate aínda aberto na literatura sobre o papel de METTL3 e a modificación epitranscritómica m⁶A na reprogramación celular somática. Tal e como se recolle na introdución, existen estudos que apuntan a que o silenciamento de METTL3 reduce a eficiencia da reprogramación (Liu et al, 2015; Aguiló et al., 2015), mentres que outros non atopan diferenzas significativas (Slobodin et al., 2022). Os datos obtidos neste modelo experimental apoian a primeira destas visións, xa que o knockdown de *Mettl3* mediante shRNA deu lugar a unha diminución clara no número de colonias positivas para *Nanog*, marcador de pluripotencia, en comparación coa

condición control. Isto suxire que METTL3 podería exercer un papel facilitador durante a transición cara ao estado pluripotente, probablemente a través da regulación epitranscritómica de transcritos clave durante as fases iniciais da reprogramación. Estes resultados non só contribúen a clarificar a función de METTL3 no contexto da reprogramación en fibroblastos novos, senón que tamén establecen unha base sólida para explorar o seu papel en contextos de reprogramación menos eficientes, como no caso de fibroblastos derivados de individuos anciáns. Así, o seguinte paso lóxico será testar tanto o knockdown como a sobreexpresión de METTL3 en fibroblastos vellos, que caracterizadamente reprograman con menor eficiencia ca os seus homólogos novos. Este enfoque permitirá avaliar se a manipulación da maquinaria de modificación m⁶A pode mellorar a plasticidade celular en contextos asociados ao envellecemento.

A: (-) OKSM



B: *ShLuci*



C: *ShMettl3*

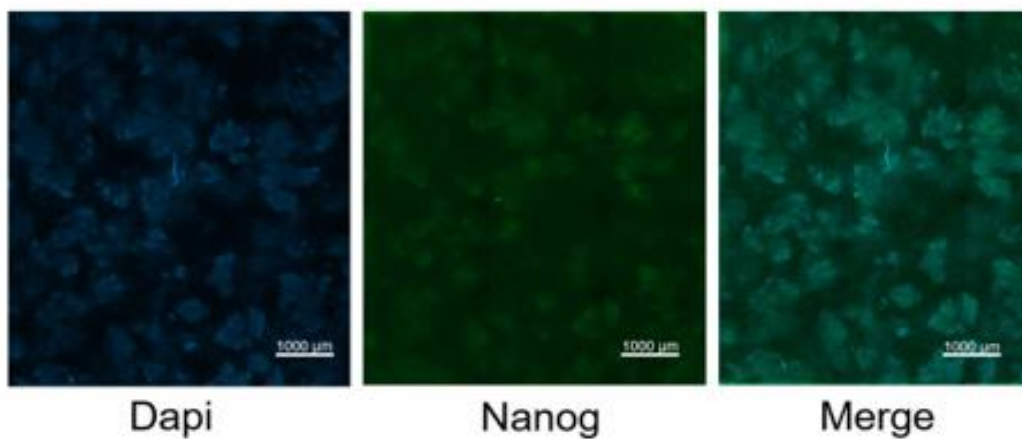


Figura 17: Imaxes representativas obtidas mediante microscopía de fluorescencia do ensaio de reprogramación celular somática en condicións de silenciamento de *Mettl3*. As células foron tinguidas con DAPI (azul) para visualizar os núcleos e Alexa Fluor 488 (verde) marca o marcador de pluripotencia *Nanog*. As imaxes foron adquiridas co microscopio ZEISS Celldiscoverer 7. Escala: 1,000 µm

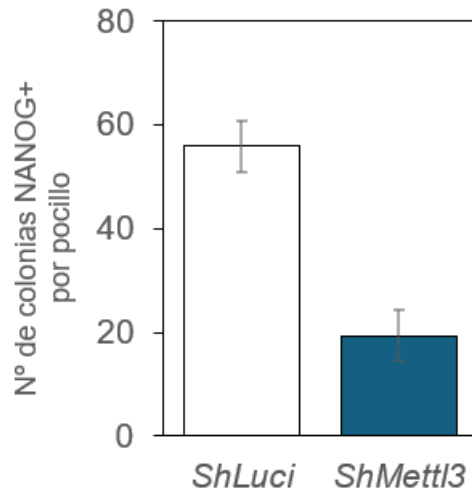


Figura 18: Análise cuantitativa do número de colonias Nanog⁺ tras reprogramación celular nas condicións ShLuci e ShMettl3. Móstrase a media e a desviación estándar do número de colonias positivas para o marcador de pluripotencia Nanog por pocillo.

	Nº colonias Nanog (+)/pocillo	Media	Desviación estándar	P-valor
ShLuci	60	56	4.97	-
	49			
	59			
ShMettl3	14	19.33	5.56	0.0022**
	17			
	27			

Táboa 5: Táboa cos datos obtidos de tres réplicas independentes por condición. Número de colonias Nanog positivas por pocillo en células tratadas con ShLuci ou ShMettl3. Os datos amósanse como media \pm desviación estándar ($n=3$).

6. Conclusións

Os resultados obtidos neste traballo permiten extraer varias conclusións relevantes respecto ao papel dos reguladores da metilación epitranscritómica m⁶A no contexto do envellecemento acelerado (HGPS) e do rexuvenecemento celular mediante reprogramación somática:

1. **Os reguladores da modificación epixenética m⁶A no ARN mensaxeiro non presentan cambios significativos nos seus niveis de expresión en células proxéricas de rato en comparación coas células control.** Este resultado suxire que a maquinaria encarga da deposición (*writers*), eliminación (*erasers*) e recoñecemento (*readers*) da m⁶A permanece amplamente conservada no contexto da progeria. Non obstante, isto non exclúe a posibilidade de que poidan existir alteracións a nivel post-transcricional ou funcional —por exemplo,

cambios na actividade enzimática ou na localización subcelular destas proteínas— que poderían influír na dinámica e distribución das marcas m⁶A.

2. **A encima escritora de m⁶A *Mettl3* é necesaria para a xeración de iPSCs:** Os experimentos *in vitro* con fibroblastos de rato mostraron que a interferencia de *Mettl3* mediante shARN reduce a eficiencia de reprogramación inducida por OKSM, medida polo número de colonias positivas para o marcador de pluripotencia *Nanog*. Estes resultados suxiren que *Mettl3* exerce un papel facilitador no proceso de reprogramación celular.

3. **A expresión dos reguladores epitranscritómicos da modificación m⁶A móstrase dinamicamente modulada durante o proceso de reprogramación celular somática, indicando unha potencial implicación funcional nestas transicións de identidade celular.** A análise de datos transcriptómicos publicados revelou variacións nos niveis de expresión de certas proteínas lectoras e escritoras de m⁶A en diferentes etapas do proceso de reprogramación. Estes cambios suxiren que a maquinaria epitranscritómica non só está presente senón activamente regulada durante a adquisición do estado pluripotente, o que reforza a hipótese de que a modificación m⁶A contribúe ao control temporal e funcional da reprogramación celular.

7. Bibliografía

1. Aguilo, F., Zhang, F., Sancho, A., Fidalgo, M., Di Cecilia, S., Vashisht, A., ... & Walsh, M. J. (2015). Deposition of 5-methylcytosine on enhancer RNAs enables the recruitment of transcriptional corepressors. *Cell Stem Cell*, 17(5), 571–584. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.005>
2. Batista, P. J., Molinie, B., Wang, J., Qu, K., Zhang, J., Li, L., ... & Chang, H. Y. (2014). m6A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 15(6), 707–719. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.019>
3. Beyret, E., Liao, H. K., Yamamoto, M., Hernández-Benítez, R., Fu, Y., Erikson, G., ... & Belmonte, J. C. I. (2019). Single-dose CRISPR-Cas9 therapy extends lifespan of mice with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature Medicine*, 25(3), 419–422. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0343-4>
4. Buganim, Y., Faddah, D. A., Cheng, A. W., Itskovich, E., Markoulaki, S., Ganz, K., ... & 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>
5. Cao, K., Capell, B. C., Erdos, M. R., Djabali, K., & Collins, F. S. (2007). A lamin A–protein interaction network mediates the response of human cells to DNA damage. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(3), 743–754. <https://doi.org/10.1172/JCI30535>
6. Chen, G.-F., Xu, T.-H., Yan, Y., Zhou, Y.-R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(9), 1205–1235. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>
7. Cisneros, B., García-Aguirre, I., De Ita, M., Arrieta-Cruz, I., Rosas-Vargas, H., (2023). Hutchinson-gilford progeria syndrome: cellular mechanisms and therapeutic perspectives. *Arch. Med. Res.*, 54, 102837. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2023.06.002>
8. De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., ... & Lévy, N. (2003). Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science*, 300(5628), 2055. <https://doi.org/10.1126/science.1084125>
9. Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., ... & Rechavi, G. (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, 485(7397), 201–206. <https://doi.org/10.1038/nature11112>
10. Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., ... & Collins, F. S. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, 423(6937), 293–298. <https://doi.org/10.1038/nature01629>
11. Fazio, A., Evangelisti, C., Cappellini, A., Mongiorgi, S., Koufi, F.-D., Neri, I., ... & Ratti, S. (2023). Emerging roles of phospholipase C beta isozymes as potential biomarkers in cardiac disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), 13096. <https://doi.org/10.3390/ijms241713096>
12. Gao, Y., Pei, G., Li, D., Ding, Y., Feng, Y., Li, H., ... & Liu, P. (2022). The role of N6-methyladenosine (m6A) modification in the regulation of cellular senescence and

- age-associated diseases. *Frontiers in Genetics*, 13, 827619. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.827619>
13. Geula, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Dominissini, D., Mansour, A. A., Kol, N., Salmon-Divon, M., ... & Hanna, J. H. (2015). m6A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science*, 347(6225), 1002–1006. <https://doi.org/10.1126/science.1261417>
 14. Goldman, R. D., Shumaker, D. K., Erdos, M. R., Eriksson, M., Goldman, A. E., Gordon, L. B., ... & Collins, F. S. (2004). Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *PNAS*, 101(24), 8963-8968. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402943101>
 15. Gonzalez, R. J., & Tarloff, J. B. (2011). Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar Blue and MTT reductase activity. *Toxicology in Vitro*, 25(3), 715–719. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.12.010>
 16. Gordon, L. B., Brown, W. T., & Collins, F. S. (2014). Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle.
 17. Gordon, L. B., Shappell, H., Massaro, J., D'Agostino, R. B., Brazier, J., Campbell, S. E., ... & Kieran, M. W. (2018). Association of lonafarnib treatment vs no treatment with mortality rate in patients with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *JAMA*, 319(16), 1687-1695. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.3264>
 18. Heurtier, V., Owens, N., Gonzalez, I. et al. (2019). The molecular logic of Nanog-induced self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature Communications*, 10, 1109. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09041-z>
 19. Hoetker, M. S., Tillo, E. S., Sedman, A. A., Dixit, S., Nag, A., Koche, R. P., Schmerer, M., & Hochedlinger, K. (2023). *H3K36 methylation maintains cell identity by regulating opposing lineage programmes*. *Nature Cell Biology*, 25(8), 1121–1134. <https://doi.org/10.1038/s41556-023-01191-z>
 20. Hong, J., Xu, K., & Lee, J. H. (2022). Biological roles of the RNA m⁶A modification and its implications in cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 54, 1822–1832. doi:10.1038/s12276-022-00897-8
 21. Ieda, M. (2013). Direct reprogramming of somatic cells into functional cardiomyocytes. *Circulation Journal*, 77(11), 2536-2541. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-13-1085>
 22. Imbriano, C., Moresi, V., Belluti, S., Renzini, A., Cavioli, G., Maretta, E., & Molinari, S. (2023). Epitranscriptomics as a new layer of regulation of gene expression in skeletal muscle: Known functions and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), 15161. doi:10.3390/ijms242015161
 23. Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., ... & He, C. (2011). N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature Chemical Biology*, 7(12), 885–887. <https://doi.org/10.1038/nchembio.687>
 24. Jiang, X., Liu, B., Nie, Z., Duan, L., Xiong, Q., Jin, Z., ... & Shi, Y. (2021). The role of m6A modification in the biological functions and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 74. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00450-x>
 25. Kubben, N., & Misteli, T. (2017). Shared molecular and cellular mechanisms of premature ageing and ageing-

- associated diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(10), 595–609.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.68>
26. Kulcenty, K., Wróblewska, J., Mazurek, S., Liszewska, E., & Jaworski, J. (2015). The use of induced pluripotent stem cells in regenerative medicine. *Postępy Biochemii*, 61(4), 426-432.
 27. Lammerding, J., Fong, L. G., Ji, J. Y., Reue, K., Stewart, C. L., Young, S. G., & Lee, R. T. (2006). Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(35), 25768–25780.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M513511200>
 28. Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., ... (2010). A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 7, 51-63.
 29. Li, Y., Zhou, G., Bruno, I. G., et al. (2019). Transient introduction of human telomerase mRNA improves hallmarks of progeria cells. *Aging Cell*, 18:e12979.
<https://doi.org/10.1111/ace1.12979>
 30. Linder, B., Grozhik, A. V., Olarerin-George, A. O., Meydan, C., Mason, C. E., & Jaffrey, S. R. (2016). m⁶A modification in mRNA is prevalent in 5'UTR, CDS and 3'UTR. *MDPI* (resumido).
 31. Liu, L., Luo, G.-Z., Yang, W., Zhao, X., Zheng, Q., Lv, Z., ... & Zhou, Q. (2015). Activation of the imprinted Dlk1–Dio3 region correlates with pluripotency levels of mouse stem cells. *Cell Stem Cell*, 16(5), 509–522.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.01.016>
 32. Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., ... & He, C. (2014). A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nature Chemical Biology*, 10(2), 93-95.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.1432>
 33. Liu, J., Gao, M., Xu, S., Chen, Y., Wu, K., Liu, H., Wang, J., Yang, X., Wang, J., Liu, W., Bao, X., & Chen, J. (2020). YTHDF2/3 are required for somatic reprogramming through different RNA deadenylation pathways. *Cell Reports*, 32(10), Article 108120. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108120>
 34. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
 35. Martín López, M. (2016). *Estudio de la función de p73 durante el proceso de reprogramación celular: Análisis de la auto-renovación y la pluripotencia de las células reprogramadas* [Tese de doutoramento, Universidad de León]. Universidad de León, Repositorio Institucional.
 36. Merideth, M. A., Gordon, L. B., Clauss, S., Sachdev, V., Smith, A. C., Perry, M. B., ... & Introne, W. J. (2008). Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *New England Journal of Medicine*, 358(6), 592-604.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706898>
 37. Ocampo, A., Reddy, P., Martinez-Redondo, P., Platero-Luengo, A., Hatanaka, F., Hishida, T., ... & 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>
 38. Ocana, O.H., & Nieto, M.A. (2010). Epithelial plasticity, stemness and pluripotency. *Cell Research*, 20, 1086-1088.

39. Okita, K., & Yamanaka, S. (2012). Induced pluripotent stem cells: Opportunities and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1575), 2198-2207. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0494>
40. Pendleton, K. E., Chen, B., Liu, K., Hunter, O. V., Xie, Y., Tu, B. P., & Conrad, N. K. (2017). The U6 snRNA m6A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention. *Cell*, 169(5), 824–835.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.003>
41. Samavarchi-Tehrani, P., Golipour, A., David, L., Sung, H.K., Beyer, T.A., Datti, A., ... & Wrana, J.L. (2010). Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, 7, 64–77.
42. Slobodin, B., Spiegel, I., & Agami, R. (2022). m6A modification of mRNA in pluripotency and reprogramming. *Journal of Cell Science*, 135(24), jcs259824. <https://doi.org/10.1242/jcs.259824>
43. 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>
44. The Progeria Research Foundation. (2022). About progeria. <https://www.progeriaresearch.org>
45. Thermo Fisher Scientific. (s.f.). Antibióticos de selección. Recuperado el 11 de abril de 2025, de <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-culture/transfection/transfection-reagents/selection-antibiotics.html#g418>
46. Tonge, P. D., Corso, A. J., Monetti, C., Hussein, S. M., Puri, M. C., Michael, I. P., ... & Nagy, A. (2014). Divergent reprogramming routes lead to alternative stem-cell states. *Nature*, 516(7530), 192-197. <https://doi.org/10.1038/nature14047>
47. Torre, D., Lachmann, A., & Ma'ayan, A. (2018). BioJupies: Automated generation of interactive notebooks for RNA-Seq data analysis in the cloud. *Cell Systems*, 7(5), 556–561.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.10.007>
48. UniProt Consortium. (2025). Transforming growth factor beta-2 proprotein (TGFB2_MOUSE). UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P27090/entry>
49. Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G. C., Yue, Y., Han, D., ... & He, C. (2014). N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 505(7481), 117-120. <https://doi.org/10.1038/nature12730>
50. Wang, Y., Li, Y., Wang, Y., & Zhang, Y. (2015). Establishment of leukemia inhibitory factor (LIF). *Journal of Advanced Research*, 6(4), 525–532. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.003>
51. Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y. H., Li, H., Lau, F., ... & Daley, G. Q. (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>
52. Wilmut, I. (2007). The first direct reprogramming of adult human fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 1(6), 593-594. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.013>
53. Zhao, B. S., Roundtree, I. A., & He, C. (2017). Post-transcriptional gene regulation by m⁶A RNA modification. *Cell*, descripción.
54. Zhu, S., Li, W., Zhou, H., Wei, W., Ambasadhan, R., Lin, T., ... & Ding, S. (2010). Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell*, 7(6), 651-655. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.11.015>

000.

55. Zhu, W., Wang, J., Xu, Z., Cao, M., Hu, Q., Pan, C., Guo, M., Wei, J.-F., & Yang, H. (2019). Detection of N6 methyladenosine modification residues (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 43, 2267–2278. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4169>

8. Material suplementario

Nome do xen	WT_rep1	WT_rep2	HGPS_rep1	HGPS_rep2	WT media	WT desv.	HGPS media	HGPS desv.
Mettl3	9,757	9,785	9,715	9,808	9,771	0,019	9,762	0,065
Mettl14	9,187	9,275	9,195	9,317	9,231	0,062	9,256	0,086
Mettl16	10,059	9,965	9,809	10,075	10,012	0,067	9,942	0,188
Fto	12,164	12,059	12,111	12,303	12,111	0,074	12,207	0,136
Alkbh5	11,324	11,146	11,423	11,383	11,235	0,126	11,403	0,028

Figura Suplementaria 1: Niveis de expresión dos xenes *Mettl3*, *Mettl14*, *Mettl16*, *Fto* e *Alkbh5* en individuos con xenotipo salvaxe (WT) e en individuos homocigotos para a expresión de proxeirina (HGPS). Inclúese na táboa a media e a desviación estándar (desv.) dos datos. Estes niveis de expresión empráronse para realizar a gráfica de barras da figura 9.

Nome do xen	d0	d2	d4	d6	d8	iPSCs
<i>Ythdf2</i>	1881,62	2752,34	2302,13	2249,04	2155,33	2315,84
<i>Ythdc1</i>	2154,85	2552,31	2500,07	2390,53	2573,28	4177,56
<i>Ythdc2</i>	712,69	927,85	639,66	641,26	697,55	842,24
<i>Ythdf1</i>	2226,39	2777,06	2375,17	2330,16	2268,10	3042,32
<i>Ythdf3</i>	3415,88	3251,85	3240,59	3083,70	2724,16	2699,19
<i>Mettl3</i>	839,21	958,54	1004,36	967,85	1142,97	1084,56
<i>Mettl14</i>	517,78	982,14	764,27	772,53	854,47	1234,53
<i>Mettl16</i>	1268,27	2191,21	1749,91	1797,60	1999,51	1996,32
<i>Alkbh5</i>	2783,97	2524,97	2191,83	2202,07	2323,85	5035,97
<i>Fto</i>	2146,04	1610,36	1786,95	1831,00	1658,52	1975,01

Figura Suplementaria 2: Niveis de expresión dos xenes *Mettl3*, *Mettl14*, *Mettl16*, *Fto*, *Alkbh5* e *Ythdf2* en distintos días do proceso de reprogramación celular somática (d0 a d8) e en células iPSC. Estes niveis de expresión empráronse para realizar o mapa de calor da figura 12.