

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

“Perfil transcriptómico de células epiteliales primarias de próstata humana inducidas a senescencia por estrés (SIPS)”

Que para obtener el grado de

Maestro en Biología Experimental

P R E S E N T A

Q.F.B. Kevin Samael Olascoaga Del Angel

Comité tutorial:

Co-directora: Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero

Co-director: Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

Asesora: Dra. Mina Konigsberg Fainstein

11/2019

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología del Departamento de Sistemas Biológicos de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, en el Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, y en el Departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 637722

Este trabajo estuvo apoyado por el proyecto CONACyT 255591 a cargo de la Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero.

MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

.

Presidente: Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Secretaria: Dra. Rebeca López Marure

Vocal: Dr. Héctor Fernando Serrano

Comité Tutorial:

Codirectora: Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero

Adscripción: Profesor-Investigador titular C, Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular, Departamento de Ciencias de la Salud, UAM Iztapalapa.

Teléfono de oficina: (5255) 5804-4732

Teléfono celular: 5524937625

Correo Electrónico: norm@xanum.uam.mx

Codirector: Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

Adscripción: Profesor-Investigador titular D, Laboratorio de Inmunología, Departamento de Sistemas Biológicos, UAM Xochimilco.

Teléfono de oficina: 54837000 ext 2803

Teléfono celular: (5255) 14520220

Correo Electrónico: jcastanedas@correo.xoc.uam.mx

Asesora:

Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Adscripción: Profesor-Investigador titular C, Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular, Departamento de Ciencias de la Salud, UAM Iztapalapa.

Teléfono: (5255) 5804-4732

Correo electrónico: mkf@xanum.uam.mx

Agradecimientos

A mis padres, Maura Evelia Del Angel Flores y Catalino Olascoaga Reynoso. Sin su valiosa guía no habría podido lograrlo, pues en los momentos de flaqueza su incansable apoyo me ánimo a continuar. Gracias por su comprensión, atinados consejos y atención que siempre me han brindado. Por el apoyo incondicional en cada proyecto emprendido, todos mis triunfos se los dedico y dedicaré, los amo para siempre.

A mi abuelo, Agapito Olascoaga Casas. Mi principal inspiración para estudiar el envejecimiento, pues a sus 101 años es la persona más sana que he conocido.

A mis tutores, Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero, Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez, Dra. Mina Konigsberg Fainstein. Gracias por aceptarme como su alumno, creer en mis ideas y por la libertad de poder investigar lo que me gusta.

A los amigos que siempre estuvieron ahí, Araceli Paredes, por tantos consejos y ayuda, Manuel Rosario, por acompañarme en los momentos más críticos.

A la mujer cuyo apoyo ha sido incondicional, Grecia Sánchez Evangelista. Desde que te conozco has creído en mi capacidad y me has animado a dar lo mejor de mí, siempre serás especial.

A la Dra. Rebeca López Marure. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y por tantas consideraciones.

A mi gato, Gordo. Mi mejor amigo, que cada noche de estudio y desvelo sin falta estuvo a mi lado.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, mi segunda casa.

A todos los que colaboraron e hicieron posible este proyecto.

Abreviaturas

15-LOX2: Lipooxigenasa

ATM: proteína ataxia telangiectasia mutada

ATR: proteína ataxia telangiectasia relacionada con rad3

BPH: Hiperplasia benigna de próstata

c-MET: tirosina-proteína quinasa Met

CAP: Caperuza RNA

CCL3: Quimiocina ligando 3

CD44: Glicoproteína de superficie celular

CD57: Glicoproteína de superficie celular

CDK2/ciclina E: quinasa dependiente de ciclina 2

CDK4/6/ciclina D: quinasa dependiente de ciclina 4 células

NE: Células neuroendocrinas

células NK: (del inglés Natural Killer), asesina natural o célula asesina es un linfocito

CHK1: serina/treonina quinasa 1

CHK2: serina/treonina quinasa 2

CircRNA: RNA circulares

CK14: Citoqueratina 14

CK18: Citoqueratina 18

CK5: Citoqueratina 5

CK8: Citoqueratina 8

CS: Células senescentes

CSF: Factor estimulante de colonias 1

DGE: Perfil de expresión diferencial génica

DNA: Ácido desoxirribonucleico

E2F: factor de transcripción

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

ERO: Especies reactivas del oxígeno

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos

GCP-2: Proteína quimio atrayente de monocitos 2

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

HPEC: Células epiteliales de próstata humana

HUVEC: Células umbilicales endoteliales

IGF: Factor de crecimiento similar a la insulina

IGF1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1

IL-1 α : Interleucina-1

IL-6: Interleucina-6

IL-8: Interleucina-8

IL- β : Interleucina- β

Ki-67: Marcador de proliferación

LncRNA: RNA largo no codificante

MCP 1: Proteína quimio atrayente de monocitos 1

MCP 4: Proteína quimio atrayente de monocitos 4

MIP 1 α : Proteína inflamatoria de macrófagos 1 α

MIP 3 α : Proteína inflamatoria de macrófagos 3 α

miRNA: MicroRNA mRNA: RNA mensajero

OIS: Senescencia inducida por oncogén

p21: inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina

p53: proteína supresora de tumores

p63: Proteína supresora de tumores

PAP: fosfatasa ácida prostática

PF-4: Factor plaquetario 4

PGE2: Dinoprostona

piRNA: Ácido ribonucleico asociado a piwi

pRB: proteína del retinoblastoma

PRC2: Complejo policomb dos pre-mRNA: Ácido ribonucleico mensajero sin madurar

PSA: antígeno específico prostático

RNA: Ácido ribonucleico rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal

SASP: Fenotipo Secretor asociado a la senescencia

SC: Senescencia celular

SDF-1: Factor estromal derivado 1

SIPS: Senescencia inducida por estrés prematuro

snRNA: Ácido ribonucleico pequeño nuclear

SR: Senescencia replicativa

TGF-a: Factor de crecimiento epidérmico

TGF: Factor de crecimiento tumoral

tRNA: Ácido ribonucleico de transferencia

TrxG: Grupo Tritorax

VEGF-A: factor de crecimiento endotelial vascular

WI-38: Fibroblastos de pulmón humano

Resumen

La célula senescente se caracteriza por encontrarse detenida en las fases iniciales del ciclo celular, presentar resistencia ante la apoptosis y por diversas alteraciones en la expresión génica. Poco se conoce acerca de las aberraciones transcriptómicas ocasionadas por la senescencia en células epiteliales de próstata, existe evidencia parcial de que estas perturbaciones podrían contribuir con la aparición y progresión de diversas enfermedades prostáticas. En este trabajo se analizó el transcriptoma de las células HPEC inducidas a senescencia por SIPS con el objetivo de determinar cuáles son las alteraciones en los patrones de expresión de diversos transcritos como mRNA, lncRNA, circRNA y miRNA. Una vez determinados los análisis de expresión diferencial génica se realizaron análisis de enriquecimiento de vías de señalización y términos ontológicos para conocer las funciones moleculares, biológicas y los componentes celulares que resultan afectados por las alteraciones en la expresión génica. Los resultados de esos enriquecimientos mostraron afectaciones en vías de señalización como como NRF2, TGF- β , VEGFA-VEGFR e IFN γ , ErbB, Hippo, MAPK, PI3K-Akt y Wnt. Asimismo, en las células HPEC inducidas SIPS se confirmó la presencia de 20 genes que ya han sido reportados en otros modelos como parte del núcleo de genes asociados a la senescencia. De ellos, 9 genes presentan la mayor cantidad de interacciones proteína – proteína y patrones de co-expresión. Además, se realizaron redes de interacción mRNA – miRNA y mRNA – miRNA – CircRNA para tratar de encontrar los mecanismos de regulación que rigen la expresión de estos genes.

Las alteraciones presentes en el transcriptoma de HPEC provocadas por la senescencia se asocian con procesos como carcinogénesis, metástasis, aparición y progresión de neoplasias, disminución de la respuesta inmunológica y aumento de resistencia a la apoptosis

Abstract

The senescent cell is characterized by being arrested in the cell cycle, presenting resistance to apoptosis, and having various alterations in gene expression. Little is known about transcriptomic aberrations caused by senescence in prostate epithelial cells, there is partial evidence that these disturbances could contribute to the appearance and progression of multiple prostate diseases. In this work, the HPEC transcriptome was analyzed after SIPS induction in order to determine the alterations in the expression patterns of various transcripts such as mRNA, lncRNA, circRNA, and miRNA. Once the differential gene expression (DGE) analysis was determined, enrichment analysis of signaling pathways and ontological terms were performed to find the molecular, biological functions, and cellular components that are affected by alterations in gene expression. The results of these enrichments showed effects on signaling pathways such as Nrf2, TGF- β , VEGFA-VEGFR and IFN γ , ErbB, Hippo, MAPK, PI3K-Akt, and Wnt. These alterations are associated with processes such as carcinogenesis, metastasis, neoplasms onset and progression, decreased immune response and increased apoptotic resistance. Also, in HPEC induced to SIPS, the presence of 20 genes that have already been reported in other models as part of the nucleus of genes associated with senescence, was confirmed; and 9 genes of the 20 present the highest number of interactions and co-expression patterns. Besides, mRNA-miRNA and mRNA-miRNA-circRNA interaction networks were made to try to find the regulatory mechanisms that govern the expression of these genes.

The alterations present in the HPEC transcriptome caused by senescence are associated with processes such as carcinogenesis, metastasis, onset and progression of neoplasms, decreased immune response and increased resistance to apoptosis.

Índice

1. Introducción	13
1.1. Envejecimiento	13
1.2. Senescencia celular	14
1.2.1 Mecanismo de establecimiento de la senescencia	15
1.2.2 Fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP)	16
1.2.3 Senescencia celular y su relación en patologías como cáncer	18
1.3 Morfofisiología de la próstata	19
1.3.1 Epitelio prostático	20
1.3.2 Células Basales	20
1.3.3 Células Intermedias	20
1.3.4 Células Luminales	20
1.3.5 Células Neuroendocrinas	21
1.3.6 Diferenciación de células prostáticas	21
1.4 Senescencia y patologías de la próstata	22
1.4.1 Hiperplasia prostática benigna	22
1.4.2 Prostatitis	22
1.4.3 Cáncer de próstata	23
1.5 Transcriptoma	23
1.5.1 RNA mensajero (mRNA)	24
1.5.2 Adición del CAP y Poliadenilación	24
1.5.3 RNA largos no codificantes (lncRNA)	24
1.5.4 Regulación de la cromatina	25
1.5.5 Regulación Transcripcional	25
1.5.6 Regulación Post-transcripcional	25
1.5.7 Micro RNA (mirRNA)	25
1.5.7.1 Biogénesis de miRNAs	26

	1.5.7.2 Mecanismos de acción de miRNAs	26
	1.5.8 Análisis de datos transcriptómicos	26
2	Antecedentes	28
3	Justificación	30
4	Pregunta de investigación	30
5	Hipótesis	30
6	Objetivo General	31
7	Objetivos Particulares	31
8	Materiales y métodos	32
	8.1 Cultivo primario de células epiteliales de próstata humana (HPEC)	32
	8.2 Inducción de senescencia prematura por estrés (SIPS)	32
	8.3 Expresión de marcadores de senescencia	32
	8.4 Extracción de RNA total	33
	8.5 Microarreglos	33
	8.6 Análisis de expresión diferencial	34
	8.7 Análisis de enriquecimiento	34
	8.8 Análisis de redes	35
9	Resultados	36
	9.1 Expresión marcadores de senescencia	36
	9.2 Análisis de expresión diferencial	37
	9.3 Redes de interacción proteína-proteína	40
	9.4 Redes de interacción mRNA-MiRNA	57
	9.5 Presencia del núcleo de genes asociados a la senescencia	64
10	Discusión	71
11	Conclusión	76
12	Perspectivas	76
13	Referencias Bibliográficas	77

Introducción

1.1 Envejecimiento

El envejecimiento es un fenómeno biológico caracterizado por el deterioro y la pérdida de las capacidades fisiológicas y metabólicas de un organismo que inevitablemente conducen a la muerte. Este deterioro progresivo disminuye la capacidad de respuesta del organismo a estímulos ambientales, lo que provoca que éste sea susceptible a padecimientos crónicos como síndrome metabólico, desórdenes neurodegenerativos, cáncer y trastornos cardiovasculares entre otros [1].

Se han encontrado algunos procesos asociados con el envejecimiento (Figura 1) como el incremento del estrés oxidante, mutaciones, acortamiento de telómeros, disminución de respuesta al estrés, disminución de los sistemas de protección y reparación de daño, etc. Sin embargo, no se comprenden del todo los mecanismos moleculares que desencadenan el envejecimiento y que contribuyen a su progresión, aunque algunas evidencias apuntan a que el daño a biomoléculas ocasionado por estrés oxidante y exposición a xenobióticos podría desencadenar una respuesta en la célula conocida como senescencia celular. Se sabe que la acumulación de células senescentes (CS) contribuye al deterioro del organismo y la aparición de patologías asociadas con la edad [2, 3].

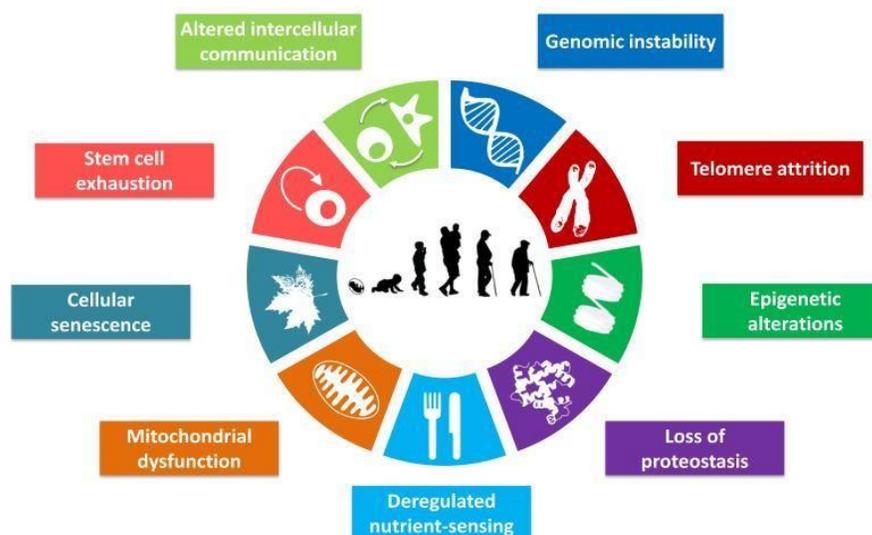


Figura 1. Marcadores asociados al envejecimiento. Tomado de López-Otín et al., 2017

1.2 Senescencia celular (SC)

Hace más de cinco décadas Hayflick y colaboradores descubrieron que los cultivos primarios de fibroblastos cesaban de replicarse después de un número finito de divisiones celulares, y a este fenómeno le llamaron senescencia celular replicativa (SR) [4]. Años después se descubrió que el acortamiento de los telómeros en cada división celular era el responsable de la detención del ciclo celular. Sin embargo, en años recientes se ha observado que diferentes estímulos también pueden inducir la entrada de la senescencia celular de manera prematura (Figura 2), es decir sin llegar al límite máximo de las duplicaciones celulares, y por lo tanto sin acortar los telómeros. Algunos de estresores pueden ser los estímulos oncogénicos, en cuyo caso se conoce como senescencia inducida por oncogén (OIS) [5]. Otra forma de llegar al estado senescente de manera prematura es por daño al DNA induciendo lo que se conoce como respuesta de daño al DNA (DDR del inglés DNA damage response) que puede ser fomentada por distintos agentes estresores como quimioterapéuticos, radiación y estrés oxidante, y se denomina senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) [6, 7].

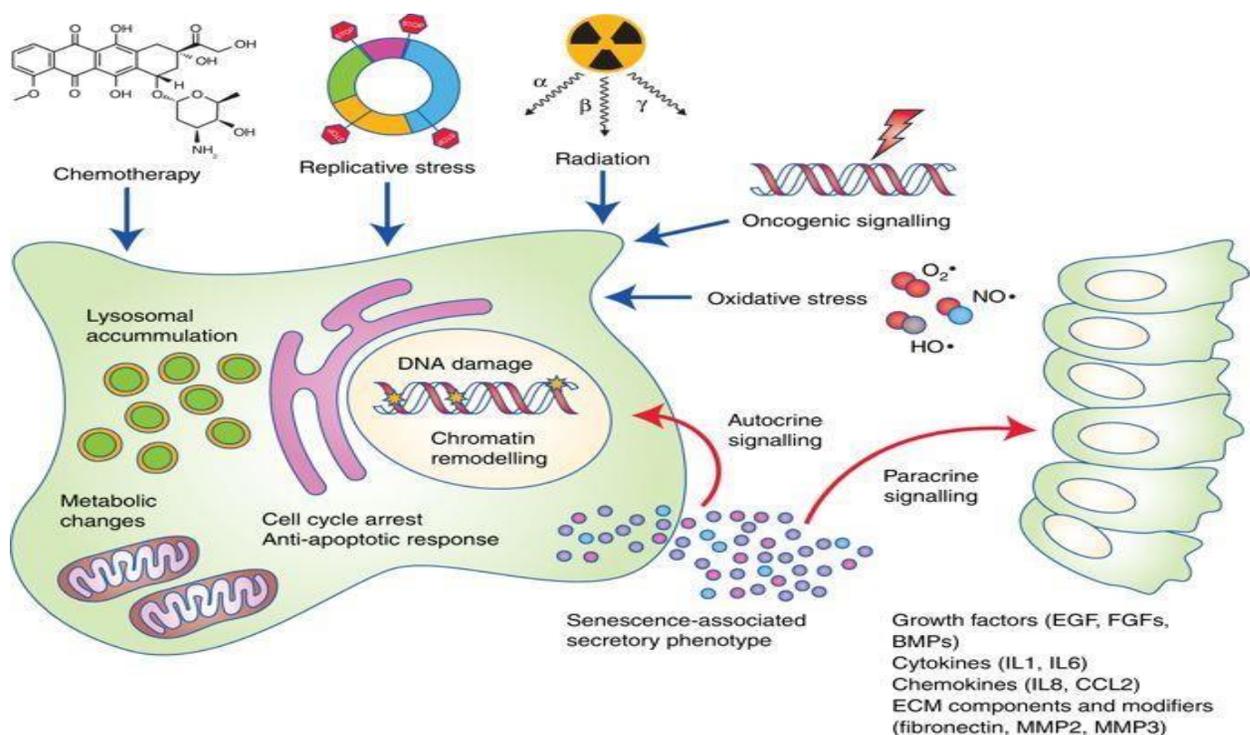


Figura 2. Fenómeno de la senescencia celular. Tomado de Gonzales-Meljem et al., 2018

Las células senescentes (CS) presentan una morfología distinta de las células que proliferan, poseen un gran tamaño, son alargadas y aplanadas. También se ha observado la presencia de múltiples núcleos, estructuras vacuoladas y mitocondrias elongadas, lo que contribuye al aumento de la granularidad celular. Además, las CS exhiben distintos cambios en el fenotipo como alteraciones metabólicas, remodelación de la cromatina, alteración en la expresión y regulación génica, disminución de la proteostasis, alteraciones de la dinámica mitocondrial y alteraciones en la autofagia. Así mismo, las CS son capaces de modificar el microambiente celular en el que se encuentran gracias a la secreción de distintos factores que en conjunto se conocen como el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). Este secretoma característico de las CS está compuesto por citocinas pro y antiinflamatorias, quimiocinas, metaloproteasas, factores de crecimiento y otras moléculas que poseen tanto actividad paracrina como autocrina. Todos estos elementos en conjunto generan un microambiente inflamatorio que podría promover eventos desfavorables en la proliferación y la migración de células tumorales. También se ha visto que el SASP está asociado con otros padecimientos relacionados con la inflamación, como los que se observan en las enfermedades crónico-degenerativas [8].

1.2.1 Mecanismo de establecimiento de la senescencia como respuesta al daño al DNA (DDR).

Aunque no todos los tipos de senescencia son ocasionados necesariamente por daño persistente al DNA como en OIS y RS, es un mecanismo muy importante en SIPS. Esta respuesta al daño persistente al DNA inicia por la fosforilación de la histona H2AX mediada por la proteína ataxia telangiectasia mutada (ATM), esta fosforilación es crítica ya que se necesita para reclutar a otras proteínas de respuesta ante ruptura de doble cadena y reparación como la proteína ataxia telangiectasia relacionada con rad3 (ATR) que es activada por medio de la proteína de replicación A. Ambas proteínas activadas se unen a sus respectivos blancos CHK1 y CHK2 los cuales a su vez activan al factor de transcripción p53 que detiene el ciclo celular a través de la inducción de la expresión de la proteína p21 [9], que

es un inhibidor de las cinasas dependientes de ciclina CDK2. Además, p53 puede activar a la proteína p16 que inhibe al complejo CDK4/6/ciclina D lo que evita la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRB), e impide la liberación del factor de transcripción E2F requerido para la expresión de genes encargados de la progresión del ciclo celular. Las proteínas de las vías p53/p21 y p16/pRB son usadas como proteínas marcadoras del estado senescente [10].

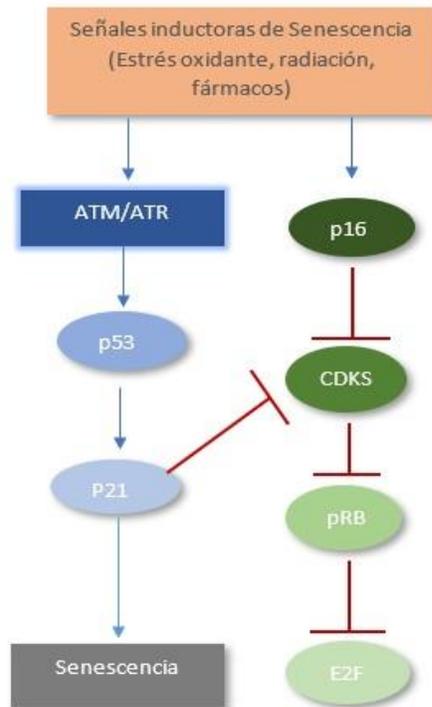


Figura 3. Mecanismo de establecimiento de la senescencia Modificado de Campisi et al., 2007

1.2.2 Fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP)

Aunque la célula senescente es incapaz de proliferar, presenta un metabolismo muy activo que le permite sintetizar y secretar alrededor de 40 a 80 factores solubles e insolubles que conforman al SASP. Los factores solubles pueden ser o no de carácter proteico y su función principal es la de señalización. Además, estos factores son capaces de modular el comportamiento de las células vecinas [11]. Las interleucinas son los principales componentes solubles del SASP, dentro de las

cuales se encuentran: IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-8. La producción de citocinas inflamatorias está regulada por la expresión de IL-1 α , lo que sugiere un mecanismo de regulación maestro del fenómeno de la inflamación. Dentro de la familia de las quimiocinas se encuentran frecuentemente sobreexpresadas MCP 1-4, MIP 1 α y 3 α , eotaxina-3, GCP-2, PF-4 y SDF-1. Algunos otros componentes solubles son las metaloproteinasas (MMP-1, 3, 10), factores de crecimiento (IGF1, IGFBP-1,3, 5, CSF, G-CSF y GM-CSF) y prostaglandinas (PGE2). Entre los componentes insolubles destaca la fibronectina, que es una glicoproteína que interactúa con diversas moléculas de la superficie celular. Algunas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno se cuentan entre los componentes insolubles del SASP [12, 13]. Pese a que los genes y componentes del SASP son los elementos más conservados de la senescencia, la composición puede variar dependiendo el tipo celular, vía de inducción o estadio de la senescencia [14, 15].

Una de las principales funciones del SASP es reclutar células del sistema inmunológico, principalmente macrófagos y células NK para eliminar a las células senescentes, una vez que han terminada su función y evitar el crecimiento y proliferación de tumores [16, 17], sin embargo y de manera contraria, también pueden promover la proliferación, la migración y la invasión de células protumorigénicas en tejidos epiteliales especialmente de mama y próstata, así como la degradación y la remodelación de la matriz extracelular [13, 18].

El SASP también está involucrado en la reparación y renovación de tejidos gracias a los diversos factores de crecimiento secretados, además de limitar la fibrosis durante la reparación [19]. Adicionalmente, algunos componentes del SASP están involucrados en etapas tempranas del desarrollo embrionario contribuyendo a la formación de la cresta ectodérmica apical y la placa del techo neuronal en ratones y pollos [20].

Debido al microambiente inflamatorio generado por algunos componentes del SASP, el organismo pierde la homeostasis, lo que contribuye a la aparición de enfermedades relacionadas con la senescencia. Por ejemplo, la IL-6 y la MCP-1 están involucradas en la progresión de la insuficiencia renal crónica, la IL-8 está

relacionada con la inflamación del páncreas y la progresión de la diabetes. También se ha relacionado a las metaloproteasas con la capacidad de remodelar la matriz extracelular, lo cual favorece la migración y proliferación de células malignas [21, 22].

1.2.3 Senescencia celular y su relación en patologías como cáncer

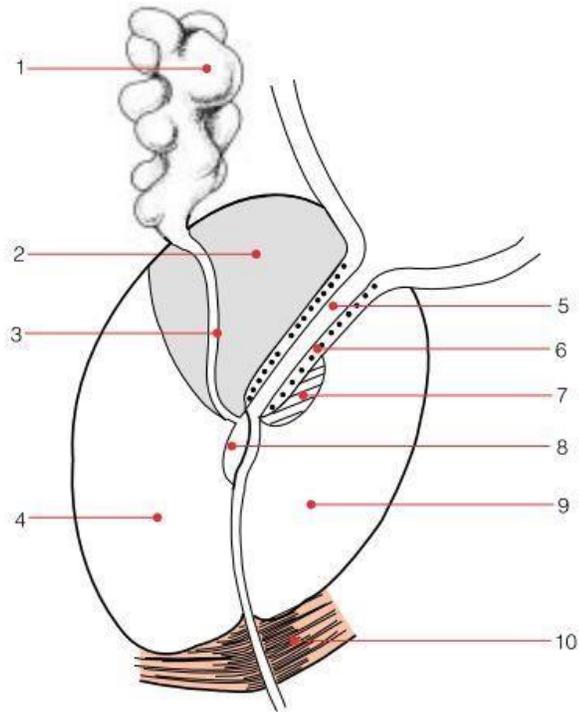
Aunque las células senescentes desempeñan un papel importante durante el desarrollo, la remodelación de tejidos y la supresión de tumores, su capacidad de secretar componentes proinflamatorios propicia la creación de un microambiente en donde las células protumorigénicas pueden proliferar y crecer libremente [18]. La inflamación es una de las características principales del cáncer, ya que se estima que el 20% de tumores malignos son ocasionados por inflamación crónica. es interesante mencionar que un gran porcentaje de los tipos de cáncer son de origen epitelial. La inestabilidad genómica y el desgaste de los telómeros, además de altas tasas de proliferación, podrían ser la causa de la elevada susceptibilidad al cáncer por parte de las células epiteliales [23].

Las citocinas IL-6 e IL-8, son capaces de propagar la senescencia entre células vecinas y propiciar un ambiente proinflamatorio. Ambas citocinas son reguladas por la expresión de IL-1 α la cual funciona como regulador y activador maestro del SASP. IL-6 e IL-8 a través de la estimulación paracrina promueven el crecimiento de tumores en próstata y vejiga [24, 25].

En 2016, Revandkar y colaboradores reportaron que el tamaño de los tumores de próstata disminuía cuándo la respuesta de senescencia aumentaba por inhibición de la vía de señalización Notch, esto lo constataron midiendo el aumento de p27 como marcador de senescencia, y disminución de Ki-67 que es un marcador de crecimiento celular sobre-expresado en tumores [26]. Por otra parte, en 2017 Blut y colaboradores encontraron que la terapia de privación de andrógenos inducía senescencia en las células cancerosas de próstata, lo que contribuye a la persistencia del cáncer en este tipo de células [27].

1.3 Morfofisiología de la próstata

La próstata es un órgano glandular que forma parte del aparato reproductor masculino. Está conformada por la zona central, zona de transición formada por dos lóbulos ubicados a cada lado de la uretra prostática, zona fibromuscular anterior, zona uretral en el centro de la glándula y zona periférica, en la cual se ubican los elementos glandulares además de ser el lugar en donde se originan la mayor parte de cánceres prostáticos [28].



1 Anatomía zonal de la próstata (modelo de McNeal).
1. Vesícula seminal; 2. Zona central; 3. Conducto eyaculador; 4. Zona periférica; 5. Uretra; 6. Esfínter preprostático; 7. Zona de transición; 8. Colículo seminal; 9. Estroma fibromuscular anterior; 10. Esfínter estriado.

Figura 4. Anatomía de la próstata. Tomado de Hermabessière, et al., 2002

El tejido prostático está constituido por epitelio glandular distribuido en dos capas histológicamente distintas, incrustadas en el estroma fibromuscular. Las células columnares altas forman parte de la capa luminal y tienen la capacidad de secretar fosfatasa ácida prostática (*PAP*), calicreína humana-2 y antígeno específico prostático (*PSA*), constituyentes primarios del líquido seminal. La capa luminal secretora está reforzada por células epiteliales cuboidales que forman la capa basal, la membrana de esta capa está revestida de matriz extracelular que divide a las células basales del estroma.

1.3.1 Epitelio prostático

El epitelio prostático está conformado por células basales, células intermedias, células luminales y células neuroendocrinas.

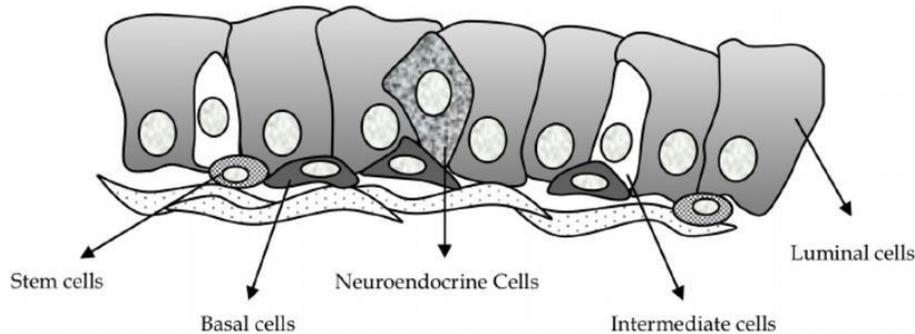


Figura 5. Tipos celulares que componen el tejido epitelial prostático. Tomado de Albanese et al., 2011

1.3.2 Células Basales

Las células basales son células no diferenciadas sin actividad secretora, pero con capacidad proliferativa, son las células progenitoras de las células luminales. Antes de diferenciarse, este tipo celular presenta a *CD44* como marcador de superficie además de *CK5* y *CK14* componentes principales del citoesqueleto. Otras moléculas presentes en este tipo celular son: p63, el factor de crecimiento de hepatocitos (*HGF*), el factor de crecimiento epidérmico (*EGF*) y elevados niveles de la proteína antiapoptótica *Bcl-2*.

1.3.3 Células Intermedias

En el tejido epitelial se han identificado células que poseen marcadores específicos de células basales y luminales que además se encuentran en un estado de proliferación activo, por lo que se piensa son células transitorias.

1.3.4 Células Luminales

La capa luminal está formada por células dependientes de andrógenos y si son privadas de ellos mueren por apoptosis. Se caracterizan por expresar a las proteínas del citoesqueleto *CK8* y *CK18*, así como el marcador de superficie celular

CD57. También presentan receptores androgénicos que modulan la producción y secreción de *PAP*, *PSA* y *15-lipooxigenasa 2 (15-LOX2)*.

1.3.5 Células Neuroendocrinas

Las células neuroendócrinas (NE) son independientes de andrógenos, sin capacidad proliferativa, totalmente diferenciadas y no expresan receptores androgénicos ni para el oncogén antiapoptótico *Bcl-2*. Algunas moléculas que la expresan son: cromogranina A, calcitonina, péptido intestinal vasoactivo (VIP), bombasina y serotonina. Existe evidencia parcial de que las células NE juegan un papel importante en el crecimiento y diferenciación de la próstata, aunque se encuentran escasamente dispersas entre la capa basal y luminal. Además, se les ha asociado también con la carcinogénesis [29]

1.3.6 Diferenciación de células prostáticas

Para mantener el equilibrio entre los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis se generan complejas interacciones entre el epitelio y la matriz estromal. El principal andrógeno presente en la próstata es la 5α -dihidrotestosterona (DHT) esencial para la producción de factores de crecimiento estromal, la liberación de dichos factores es mediada por la unión de DHT a receptores de andrógenos estromales que actúan sobre las células epiteliales estimulando la secreción de *PAP* y *PSA* que son factores prostáticos que contribuyen al proceso de diferenciación.

El colágeno tipo IV es el constituyente principal de la matriz extracelular de la próstata cuyos componentes son el proteoglicano sulfato de heparina y la laminina. La formación de dominios celulares es la principal función de la matriz extracelular, acción mediada por la adhesión celular a la matriz extracelular que ocasiona rearrreglos en el citoesqueleto. El estroma prostático produce al menos ocho familias de factores de crecimiento que están involucradas en la regulación de la proliferación y la diferenciación del epitelio; Entre ellos están: el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento tumoral (TGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). El IGF funciona como mitógeno

e induce la proliferación de las células epiteliales, mientras que el EGF estimula el crecimiento y la diferenciación del epitelio a través del efector TGF- α . Por otra parte, el factor de dispersión c-MET puede inhibir la proliferación y ocasionar la diferenciación de las células epiteliales [30].

1.4 Senescencia y patologías de la próstata

El microambiente proinflamatorio generado por el SASP, además de la secreción de factores de crecimiento, se ha asociado a la senescencia con la aparición y progresión de enfermedades de la próstata como la hiperplasia benigna, la prostatitis y el cáncer de próstata, como se describe a continuación [31, 32].

1.4.1 Hiperplasia prostática benigna

La hiperplasia benigna de próstata (BPH) se caracteriza por un incremento del tejido en la zona de transición de la próstata, lo que ocasiona la obstrucción del flujo urinario. Esta hiperplasia es un factor de riesgo que aumenta la morbilidad en adultos mayores y que directamente se asocia con la acumulación de células senescentes en el tejido epitelial. Se ha reportado el incremento de diversas citocinas asociadas al SASP durante la BPH, incluyendo la IL-8, IL-4 e IL-1 α , además del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Estudios *in vitro* y con ratones, han mostrado que la acumulación de células senescentes en el epitelio prostático genera la sobreproducción de IL-1 α , y el exceso de esta citocina genera aumento del tamaño prostático. También se ha encontrado una fuerte correlación entre el aumento de las citocinas y la expresión elevada de catepsina D, una proteína asociada con el peso de la próstata, por lo que se ha propuesto como marcador de senescencia en tejidos prostáticos [31].

1.4.2 Prostatitis

La prostatitis es un conjunto de enfermedades y trastornos funcionales que afectan al área perineal y a la próstata produciendo inflamación. La principal causa de inflamación en la próstata es la infiltración de macrófagos que producen el ambiente proinflamatorio a través de la secreción de citocinas y quimiocinas que incluyen *CCL3*, *IL-1 α* y *osteopontina*. Estas citocinas son potentes mediadores capaces de

activar diferencialmente vías como *ERK* y *Akt*, aumentando de esta manera la proliferación celular y reforzando al ambiente proinflamatorio [32].

1.4.3 Cáncer de próstata

La acumulación de mutaciones en las células epiteliales por causa del envejecimiento es uno de los principales factores para el desarrollo de tumores. La próstata tiene un componente hormonal muy importante. Aunado a esto, el ambiente proinflamatorio generado por las citocinas, quimiocinas y metaloproteínas secretadas por el SASP ayuda a la progresión, crecimiento y vascularización de los tumores en el tejido epitelial de próstata, principalmente de la zona periférica que es rica en células luminales. Además, la secreción de factores de crecimiento y proliferación que regulan a las células vecinas de manera paracrina podrían jugar un papel importante en la tumorigénesis. Las citocinas proinflamatorias y angiogénicas que se han encontrado son *IL-6*, *IL-8*, *VEGF-A*, *MMP3* y *MMP2* bien caracterizadas como parte del SASP de fibroblastos de próstata. Se ha propuesto que estas moléculas contribuyen a la transición epitelio–mesénquima, la migración y la diferenciación de macrófagos, generando inflamación y angiogénesis [33].

1.5 Transcriptoma

El transcriptoma es el conjunto de moléculas de RNA codificantes y no codificantes (también llamadas transcritos) presentes en una célula en un momento determinado. Las moléculas de RNA que forman parte del transcriptoma incluyen al mRNA, miRNA, piRNA, LncRNA, rRNA, circRNA, snRNA y tRNA. El estudio del transcriptoma ha contribuido a la identificación de diversos marcadores asociados a distintas patologías, además de elucidar posibles mecanismos de regulación en la expresión génica, identificación de nuevos genes, estudio de corte y empalme alternativo, traslapamiento y fusión de transcritos [34].

1.5.1 RNA mensajero (mRNA)

El RNA mensajero es el ácido nucleico encargado de transferir la información genética almacenada en el DNA a un ribosoma para su posterior traducción en una proteína. Es de carácter monocatenario y la mayoría son monocistrónicos, es decir codifican una sola cadena polipeptídica [35].

Procesamiento del mRNA. El mRNA obtenido en la transcripción se conoce como mRNA primario (pre-mRNA) y antes de ejercer su función tiene que pasar por varias modificaciones.

1.5.2 Adición del CAP y Poliadenilación

La primera modificación post-transcripcional del mRNA es la adición del casquete o caperuza (CAP). La 7-metilguanosina trifosfato es un nucleótido modificado de guanina que se añade mediante un enlace trifosfato 5'-5' al extremo 5' del premRNA, esto sucede dentro del núcleo, la adición de este CAP dota de estabilidad al mRNA y es necesario para su transporte hacia el ribosoma. La poliadenilación es cuando posteriormente se adiciona al extremo 3' una cola de poli-A, una secuencia larga de poliadenilato, una cadena de únicamente adenina. Esta adición está mediada por una señal (AAUAAA) situada a 11-30 nucleótidos río abajo del extremo 3'. La adición de esta cola protege al mRNA de la degradación y aumenta su vida media en el citosol [36].

1.5.3 RNA largos no codificantes (lncRNA)

Los RNA largos no codificantes (lncRNA) son transcritos cuyo tamaño va de 200 pb a 100 kb. Su procesamiento es parecido al del mRNA, aunque carecen de marcos abiertos de lectura. Se cree que probablemente este tipo de RNA es transcrito por la RNA polimerasa II y que también se encuentran poliadenilados. Los niveles de expresión de los lncRNAs son mucho menores que el de los genes capaces de codificar proteínas y su expresión tiene alta especificidad de tejido o tipo celular. Aunque la función de muchos lncRNAs recientemente caracterizados es aún desconocida, algunos estudios sugieren que un rol importante de estos transcritos en la regulación de la expresión génica a nivel transcripcional y post-transcripcional,

procesos de desarrollo y diferenciación, además de estar involucrados en distintas enfermedades humanas, así como participar como reguladores del proceso de envejecimiento [37].

1.5.4 Regulación de la cromatina

Los lncRNAs a menudo funcionan como elementos cis y trans, actuando como moduladores de la expresión de genes que codifican para proteínas. Los lncRNAs son capaces de mediar modificaciones epigenéticas mediante el reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina, ya que presentan sitios de unión a complejos polycomb (PRC2). Algunos otros lncRNAs son capaces de unirse a complejos trithorax (TrxG) funcionando como puentes que estabilizan a los complejos remodeladores.

1.5.5 Regulación Transcripcional

Los lncRNAs actúan como cofactores que modifican la actividad de los factores de transcripción, funcionando como amplificadores que inducen la expresión de genes adyacentes que codifican proteínas. También pueden modificar la actividad de la RNA polimerasa II mediante interacciones con el complejo de iniciación [38].

1.5.6 Regulación Post-transcripcional

Los lncRNAs son capaces de reconocer sitios complementarios de secuencias específicas relacionadas con el procesamiento del mRNA como la adición de la caperuza, corte y empalme (ayudando al ensamble del complejo de corte y empalme) transporte, degradación y estabilidad [38].

1.5.7 Micro RNA (miRNA)

Los microRNAs (miRNAs) son una clase de pequeños RNA monocatenarios con un tamaño de 21 a 25 nucleótidos. Tienen una importante función en la regulación de la expresión génica en animales y plantas debido a que son capaces de degradar o reprimir la traducción de mRNAs. Están implicados en una gran variedad de procesos biológicos y patológicos como: desarrollo embrionario, respuesta inmune, apoptosis, y participación en enfermedades como cáncer, entre otros [39].

1.5.7.1 Biogénesis de miRNAs

La biogénesis de los miRNAs comienza con la transcripción por medio de la polimerasa II de un miRNA primario el cual contiene una caperuza en 5' y una cola de poli-A en 3'. Su procesamiento ocurre en el núcleo celular por un complejo proteico llamado Microprocesador, compuesto por la nucleasa DROSHA y la proteína de unión PASHA. Los pre-micro-RNA después son procesados a microRNA maduros en el citoplasma mediante la interacción con DICER, una ribonucleasa que a su vez inicia la formación del complejo RISC (RNA-induced silencing complex) el cuál es responsable del silenciamiento de genes ocasionado por la expresión de miRNAs [40].

1.5.7.2 Mecanismos de acción de miRNAs

Hasta la fecha se conocen cinco mecanismos por los cuales los miRNAs regulan la expresión génica [41].

- Inhibición de la elongación durante la traducción.
- Disgregación de los ribosomas, lo que lleva a la terminación prematura de la traducción.
- Inhibición de iniciación de la traducción.
- Degradación de la proteína durante la traducción.
- Los miRNA también pueden regular la expresión génica mediante la degradación parcial o total de los mRNA mediante la eliminación de la caperuza en 5' o la cola de poli-A en 3'.

1.5.8 Análisis de datos transcriptómicos

El análisis de expresión génica diferencial (DGE) es una técnica para analizar e interpretar las diferencias de abundancia entre distintos transcritos contenidos en un transcriptoma [42]. Usualmente se realiza entre listas de genes que difieren entre dos muestras. Estos datos pueden ser obtenidos de experimentos de secuenciación de RNA, microarreglos o bases de datos. A causa de la gran cantidad de genes presentes en el genoma humano (más de 20,000) es necesario realizar múltiples correcciones estadísticas sobre estos datos. Debido a que el número de genes

diferencialmente expresado entre dos muestras usualmente es elevado, es necesario ocupar un método para interpretar y entender por qué esos genes han cambiado su patrón de expresión. Este método es conocido como "análisis de enriquecimiento" (GSEA) [43], en el que se agrupan los genes en categorías particulares que son enriquecidas en una muestra comparada con otra. La agrupación de estos genes puede estar basada en diversas fuentes como la Enciclopedia de grupos génicos Kyoto (KEGG). La ontología de genes (GO) es otro método para agrupar y anotar genes. Estas ontologías son un vocabulario estructurado de manera jerárquica [44].

Una red de co-expresión es un grupo de genes con similares patrones de expresión en distintas muestras y condiciones. Este tipo de redes permiten reconocer comportamientos similares entre genes desde la perspectiva de la abundancia, además de identificar e inferir la función de esos genes en procesos biológicos. El uso de redes de co-expresión implica generar mediciones de correlación, para ello se puede utilizar el coeficiente de correlación de Pearson. Una de las aplicaciones de las redes de co-expresión es determinar la correlación existente entre el aumento en los niveles de miRNAs y la disminución en los niveles de mRNA [45].

La hipótesis ceRNA propone una complicada e intrincada red de regulación a nivel postranscripcional, este tipo de redes describen como lncRNAs, mRNAs y otros RNAs pueden competir con miRNAs, actuando como esponjas naturales de los miRNA que comparten más de un elemento de respuesta de miRNA (MRE). Estos RNAs no codificantes (ncRNA) actúan como ceRNAs para modular la expresión de mRNA y regular los niveles de proteína, lo que a su vez contribuye a la aparición y progresión de distintas enfermedades. Diversos estudios han demostrado que los miRNA pueden regular la expresión de cientos de proteínas, y cada mRNA contiene diferentes MRE por lo que pueden ser objetivo de múltiples miRNA [46].

2. Antecedentes

En el laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular de la UAM Iztapalapa se han realizado diversos estudios sobre la senescencia prematura inducida por estrés (SIPS). Uno de estos estudios logró la inducción de senescencia por SIPS de células epiteliales de próstata humana y la caracterización del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). La inducción de senescencia se estableció con H₂O₂ a una concentración de 12 µm. Además, la adición de medio condicionado proveniente de HPEC bajo SIPS del día 9 a cultivos no senescentes, mostró una clara disminución en la proliferación.

En 2010, Hetzl y colaboradores caracterizaron las propiedades estructurales y proliferativas de las enfermedades prostáticas asociadas a la senescencia. Sus resultados mostraron que las células del estroma y los organelos de las células lumbinales habían sufrido daños morfológicos que inducían perturbaciones en la proporción proliferación/apoptosis, desencadenando un aumento en el proceso proliferativo que ocasionaba cambios estructurales en el epitelio prostático asociados al desarrollo y progresión del cáncer de próstata [47]. Posteriormente este mismo grupo caracterizó el microambiente prostático durante la senescencia. Sus resultados mostraron disminución en los niveles de testosterona sérica, disminución de moléculas de adhesión como distroglicano, presencia de células y moléculas inflamatorias (IL-6 e IL-8), hipertrofia estromal y desbalance hormonal. Todos estos cambios en conjunto podrían contribuir a la aparición y progresión de patologías prostáticas como prostatitis e hiperplasia benigna [48].

En 2017, una investigación encabezada por Hernández-Segura propuso la existencia de un núcleo de 55 genes asociados a la senescencia en humanos; estos genes se encontraron expresados en astrocitos, queratinocitos, melanocitos y fibroblastos bajo diferentes estímulos inductores de senescencia y diferentes temporalidades. Mediante el análisis ontológico se determinó la participación de los genes sobre-expresados en la detención y regulación del ciclo celular en G1. Los genes sub-expresados tenían una variedad más amplia de funciones como factores de unión a DNA y RNA, activadores transcripcionales, regulación de procesos

biosintéticos y modificación del DNA [49]. Posteriormente un grupo de investigadores analizó el transcriptoma de diversos tipos celulares inducidos a senescencia por SIPS o por SR, identificando la proteína RRAD como un regulador negativo de senescencia mediante la disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) [50]. Además, Casella y su grupo de investigación encontraron la firma génica asociada a la SC presente en las células WI-38 y HUVEC bajo diversos estímulos inductores de senescencia. Hallaron 68 transcritos, de los cuales 50 eran mRNA y 18 lncRNA. Mediante algoritmos de aprendizaje automático, encontraron que la cantidad mínima de genes que podrían ser utilizados para identificar a las CS eran *SLCO2B1*, *CLSTN2*, *PTCHD4*, *LINC02154* y *PURPL* que están involucrados en la regulación positiva de señalización y comunicación celular, además de la vía de receptores nucleares [51].

Mediante análisis bioinformáticos de diversos conjuntos de datos provenientes de experimentos de células inducidas a senescencia, Zhu y colaboradores pudieron identificar disminuciones y alteraciones en los patrones de expresión de miRNAs, lo anterior los llevó a la conclusión de que dichas alteraciones podrían ser la causa de la acumulación de proteínas en el citoplasma, característica de la célula senescente [52].

3. Justificación

Durante el envejecimiento se producen diversos cambios morfológicos y bioquímicos en la próstata que conducen a la aparición de patologías. Estas alteraciones se han relacionado con la acumulación de CS en el epitelio prostático. Las CS a través de diversos factores de proliferación, migración e inflamación ayudan a la aparición y progresión de enfermedades prostáticas como el cáncer.

En México el cáncer es la tercera causa de muerte (INEGI, 2017), siendo de origen epitelial la mayor parte de ellos. En especial el cáncer de próstata representa el 21.4% de todos los tipos de cáncer. Se ha sugerido que las células luminales, constituyentes principales del tejido epitelial son el punto de origen del cáncer prostático y la prostatitis. Los mecanismos exactos por el que se desarrollan estas patologías en la próstata aún no se conocen, pero la evidencia experimental sugiere que las CS presentes en el tejido tienen diversas aberraciones transcriptómicas que podrían estar contribuyendo a estas alteraciones.

4. Pregunta de investigación

¿Cuáles son las aberraciones transcriptómicas presentes en las células epiteliales de próstata senescentes que podrían contribuir con la aparición y progresión de enfermedades de la próstata?

5. Hipótesis

La senescencia inducida por estrés prematuro causa aberraciones a nivel transcripcional que promueven la aparición y progresión de diversas patologías prostáticas

6. Objetivo General

- Caracterizar el perfil transcriptómico de células epiteliales de próstata humana inducidas a senescencia por SIPS e identificar los genes y transcritos asociados a la senescencia.

7. Objetivos Particulares

- Evaluar los marcadores de senescencia en cultivos de células epiteliales inducidas a senescencia por SIPS
- Determinar la presencia del núcleo de genes asociados a la senescencia previamente reportados en diversos modelos celulares en células epiteliales de próstata inducidas a senescencia por SIPS
- Identificar genes y transcritos característicos de la senescencia que sirvan como posibles marcadores de diagnóstico y progresión de patologías prostáticas.
- Identificar aberraciones transcriptómicas ocurridas durante la senescencia a través del análisis de redes.

8. Materiales y métodos

8.1 Cultivo primario de células epiteliales de próstata humana (HPEC)

Se realizaron cultivos primarios de células de próstata Primary Prostate Epithelial Cells; Normal, Human (ATCC® PCS-440-010™) en cajas petri de 10 cm con medio de cultivo Prostate Epithelial Cell Basal Medium (ATCC® PCS-440-030™) libre de suero fetal bovino y rojo de fenol, suplementado con Prostate Epithelial Cell Growth Kit (ATCC® PCS-440-040™) y penicilina/estreptomicina al 1%. Pasadas 48 horas se retiró el medio, se realizaron dos lavados con buffer salino de fosfatos dulbeco (DPBS) y se renovó el medio. Los parámetros a los que se mantuvieron los cultivos dentro de la incubadora fueron 5% de CO₂ y 37°C.

8.2 Inducción de senescencia prematura por estrés (SIPS)

Para generar la senescencia por daño oxidante se utilizó el modelo de senescencia prematura inducida por estrés (SIPS). Se sembraron 2.8×10^6 células en placas Petri de 10 cm que fueron expuestas a una concentración de 12 μ M de H₂O₂ durante 2 horas en total oscuridad, se realizaron tres lavados con DPBS y posteriormente se cambió el medio y se dejaron transcurrir 48 horas para instaurar completamente la senescencia, los cultivos se mantuvieron bajo este estado durante 12 días con cambio de medio cada 48 horas.

Se tuvieron los siguientes grupos:

Células epiteliales de próstata

Células epiteliales de próstata + H₂O₂

8.3 Expresión de marcadores de senescencia

Se utilizó la técnica de Western blot para evaluar la expresión de marcadores característicos de las células senescentes como p53, GLB1, p38, γ H2AX. La extracción de las proteínas se hizo con un kit comercial de la marca Sigma Aldrich siguiendo las instrucciones del fabricante, mientras que la cuantificación de proteína total se realizó en el equipo Nanodrop 2000 leyendo las muestras a una longitud de onda de 280 nm. Para cada determinación se utilizaron 30 μ g de proteínas totales,

mismas que fueron separadas en geles de SDS-Poliacrilamida (10-12%) mediante electroforesis, y posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF por electrotransferencia húmeda. Una vez transferidas las proteínas, se bloqueó la membrana durante 60 minutos con Tween-TBS 0.05%. después de bloquear la membrana, se incubó durante 24 horas cada una con anticuerpo primario para cada proteína arriba mencionada en TBS-Tween 20 (0.05%) a una concentración de 1:1000. Transcurrido el tiempo las membranas se lavaron con solución de TBSTween 20 (0.05%) y se volvieron a incubar con anticuerpos secundarios anti-cabra y anti-conejo para cada anticuerpo primario durante 4 horas, de nuevo se lavaron las membranas con TBS-Tween 20 (0.05%) y se identificaron los anticuerpos con quimioluminiscencia. Para revelar las membranas se usó una cámara sensible a luminiscencia adaptada a un foto documentador. La intensidad relativa de las bandas se cuantificó mediante el software Image Studio 5.2.

8.5 Extracción de RNA total

Se extrajo el RNA total de 8 muestras, 4 de células control y 4 de células inducidas a SIPS al día 12 (replicados biológicos) mediante el uso del kit RNeasy Mini Kit de Quiagen siguiendo las indicaciones del vendedor. La cuantificación y determinación de la calidad se realizó con el equipo Nanodrop 2000 cargando 1 μ l de RNA, tomando en consideración la relación 260/280 para determinar la pureza.

8.6 Microarreglos

Para medir los niveles de expresión de mRNA, LncRNA y circRNA se utilizó el microarreglo Affymetrix Clariom™ D Assay, human. Se tuvieron 8 muestras en total, 4 replicados de células control y 4 de células inducidas a SIPS al día 12 (replicados biológicos) para cada chip se utilizaron 10 μ L de RNA total a una concentración de 100 ng/ μ l, el RNA se diluyó en agua grado biología molecular libre de RNAsas e inhibidores enzimáticos. La expresión de miRNA se cuantificó con el chip Affymetrix GeneChip™ miRNA 4.0 Array para cada chip se utilizaron 15 μ L de RNA total a una concentración de 100 ng/ μ l, el RNA se diluyó en agua grado biología molecular libre

de RNAsas e inhibidores enzimáticos. Todos los microarreglos fueron procesados en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

8.7 Análisis de expresión diferencial

Se procesaron los archivos CEL derivados de los microarreglos para realizar un DGE. Se utilizó el software Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0.2 con los siguientes parámetros.

Microarreglo Clariom™ D Assay, human
Librería: Clariom_D_Human versión 2
Tipo de análisis: Expresión (Gene)
Algoritmo: Gene level SST-RMA
Gene-Level Fold Change < -2 o > 2
Gene-Level P-value < 0.05
Gene-Level Use FDR: True
Gene-Level FDR < 0.05
Limma - Método Anova: eBayes

Microarreglo GeneChip™ miRNA 4.0
Librería: miRNA-4_0 versión 1
Tipo de análisis: Expresión (Gene)
Algoritmo: RMA + DABG (Human Only)
Gene-Level Fold Change < -1.5 o > 1.5
Gene-Level P-value < 0.05
Gene-Level Use FDR: True
Gene-Level FDR < 0.05
Limma - Método Anova: eBayes

8.8 Análisis de enriquecimiento

Para el análisis de enriquecimiento de vías y términos ontológicos se utilizó la lista filtrada de mRNA proveniente del DGE, dicha lista se mapeo en el servidor Enrichr <https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/> que es un servidor web para análisis de enriquecimiento. Entre las funciones de Enrichr se encuentran el enriquecimiento de vías (Wikipathways y KEGG), análisis ontológicos en términos de función molecular, componentes celulares y procesos biológicos. Además, contiene otras colecciones de herramientas como asociación con enfermedades basada en perfiles de expresión (DiGeNet), determinación de tipo celular basado en perfil de expresión (Human Atlas Gene) y expresión proteica (Human Protein Map) [53]. Para el enriquecimiento de vías de mirRNA se utilizó la herramienta mirPATH v.3 <http://snf-515788.vm.oceanos.grnet.gr> [54].

8.9 Análisis de redes

Para el análisis y construcción de redes de co-expresión y competencia endógena (ceRNA) se utilizaron dos herramientas libres, Gene Multiple Association Network Integration Algorithm (GeneMANIA) <https://genemania.org/>, que provee interacciones físicas entre proteínas contenidas en BioGRID, predicción interacción proteína-proteína provenientes de I2D, co-localización, y STRING database <https://string-db.org/> para determinar la existencia de dominios proteicos compartidos e información ontológica [55, 56, 57]. Para el análisis y extracción de módulos, que son conjuntos de proteínas con alta interconexión, se utilizó el plugin NCmine <http://apps.cytoscape.org/apps/ncmine> de Cytoscape <https://cytoscape.org> [58].

9. Resultados

9.1 Expresión marcadores de senescencia

Se realizó un ensayo de Western Blot para determinar la expresión de proteínas asociadas al estado senescente. Como se observa en la figura 8 se midió el aumento de la expresión de marcadores clásicos como p38 que aumentó su expresión 2.38 veces ($p = 0.008$), p53 aumentando 1.75 veces su expresión ($p < 0.00001$), gamma H2Ax que sufrió el aumento más notable en la expresión de 15 veces ($p = 0.000072$), GLB1 un cambio de 6.2 veces ($p = 0.0032$), además de la disminución de la expresión de la proteína laminina B1 en 0.75 veces ($p = 0.0037$). Los resultados obtenidos (Figura 9) nos confirman que el tratamiento durante 2 horas con H_2O_2 a una concentración de 12 μM es capaz de inducir senescencia en HPEC.

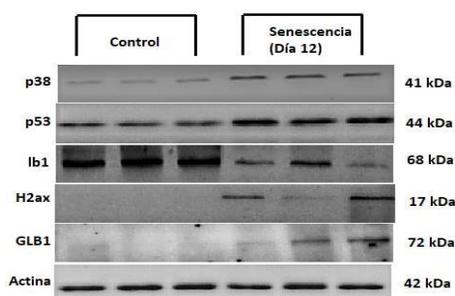


Figura 8. Expresión de marcadores de senescencia obtenidos por Western Blot. Cada membrana contiene dos grupos (control y experimental) con tres experimentos independientes.

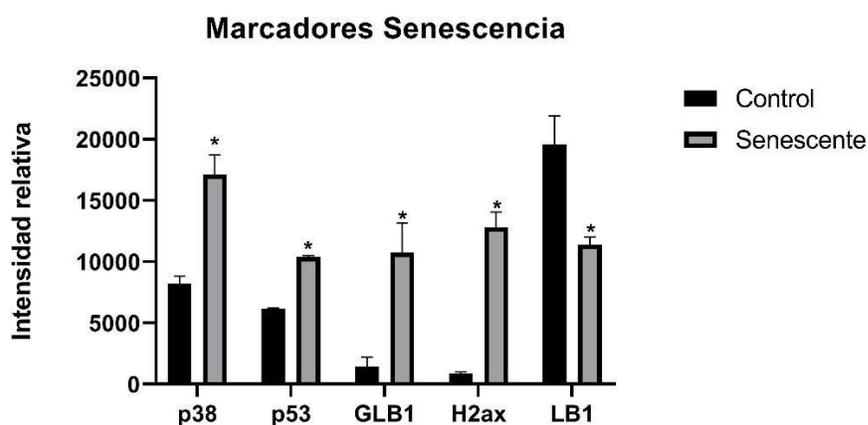


Figura 9. Análisis densitométrico de las bandas obtenidas, La gráfica muestra el resultado de tres experimentos independientes. Cada valor corresponde a la media \pm DE de la intensidad relativa normalizada respecto al control, se realizó un análisis de t de student para cada proteína.

9.2 Análisis de expresión diferencial

Se utilizó el microarreglo Clariom™ D Assay, human para obtener el perfil de expresión diferencial de mRNA, LncRNA y CircRNA con los parámetros descritos en materiales y métodos. Se obtuvo la expresión diferencial de las células senescentes respecto al control no tratado obteniendo 3560 genes de los cuales 1618 aumentaron su expresión y 1942 la disminuyeron (Figura 10). Para obtener el DGE de miRNAS se analizó el microarreglo GeneChip™ miRNA 4.0, obteniendo en total 131 transcritos diferenciados, 85 sobre-expresados y 46 sub-expresados (Figura 11).

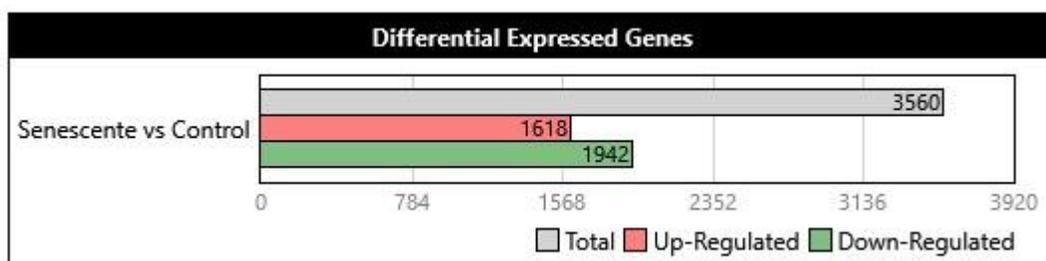


Figura 10. Resumen DGE Clariom™ D Assay, human, se muestran los genes sobreexpresados en rojo y los sub-expresados en verde. Se realizaron 4 experimentos independientes.



Figura 11. Resumen DGE GeneChip™ miRNA 4, se muestran los miRNA sobre-expresados en rojo y sub-expresados en verde. Se realizaron 3 experimentos independientes.

Debido a que los microarreglos contienen sondas que reconocen múltiples transcritos, se realizó un filtrado para obtener únicamente la expresión diferencial de mRNA, lncRNA y miRNA. Este filtrado también eliminó hibridaciones inespecíficas. Los datos filtrados indican que 987 mRNA aumentaron su expresión y que 1317 la disminuyeron (Figura 12). En el caso de los lncRNA hay 109 genes sobre-expresados y 112 sub-expresados (Figura 13). Mientras que para los microRNA hubo 68 genes sobre-expresados y 46 sub-expresados (Figura 14).

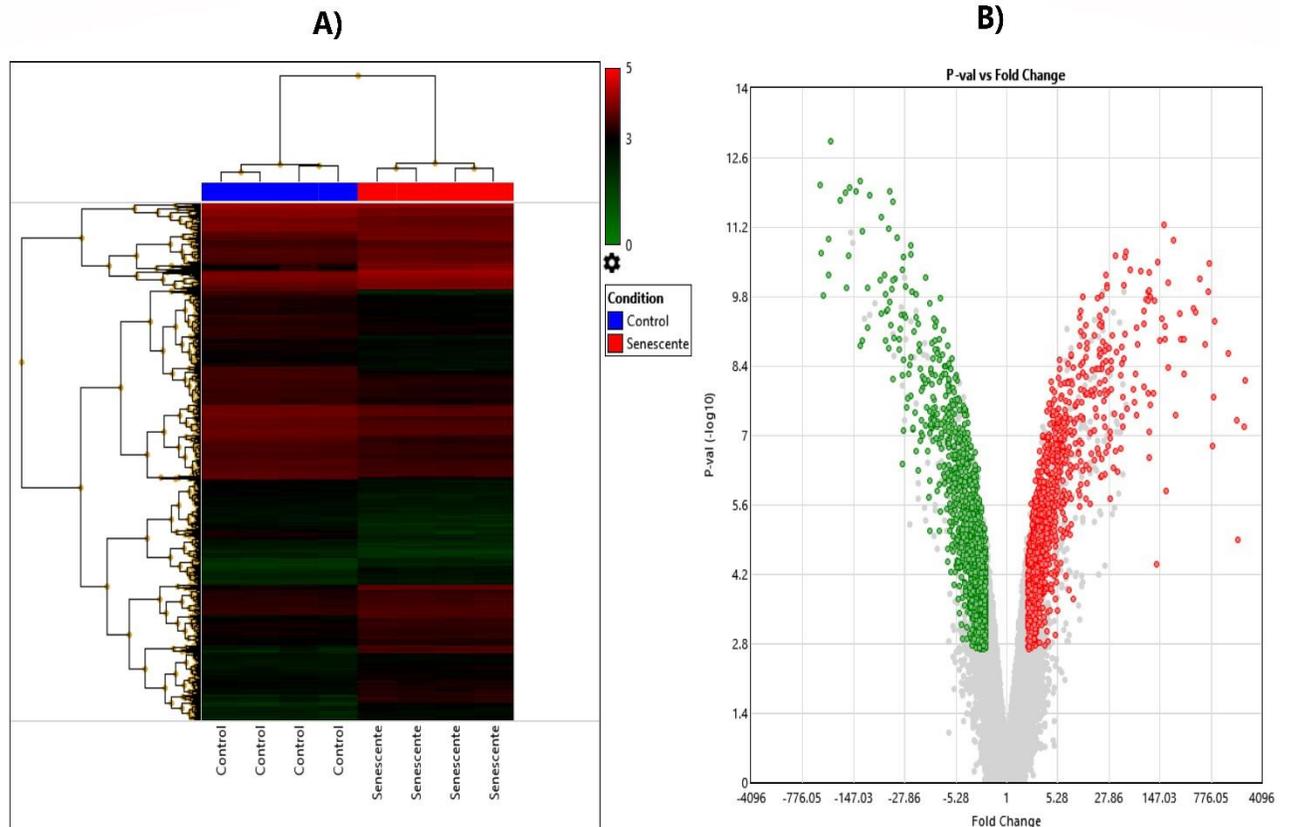


Figura 12. A) Mapa térmico de la expresión diferencial de mRNA. La señal se transformó mediante logaritmo base 2. **B)** Gráfica de volcán de la expresión diferencial de mRNA. Se grafica el P-val < 0.05 contra las veces de cambio en el nivel de expresión frente al control (Fold change).

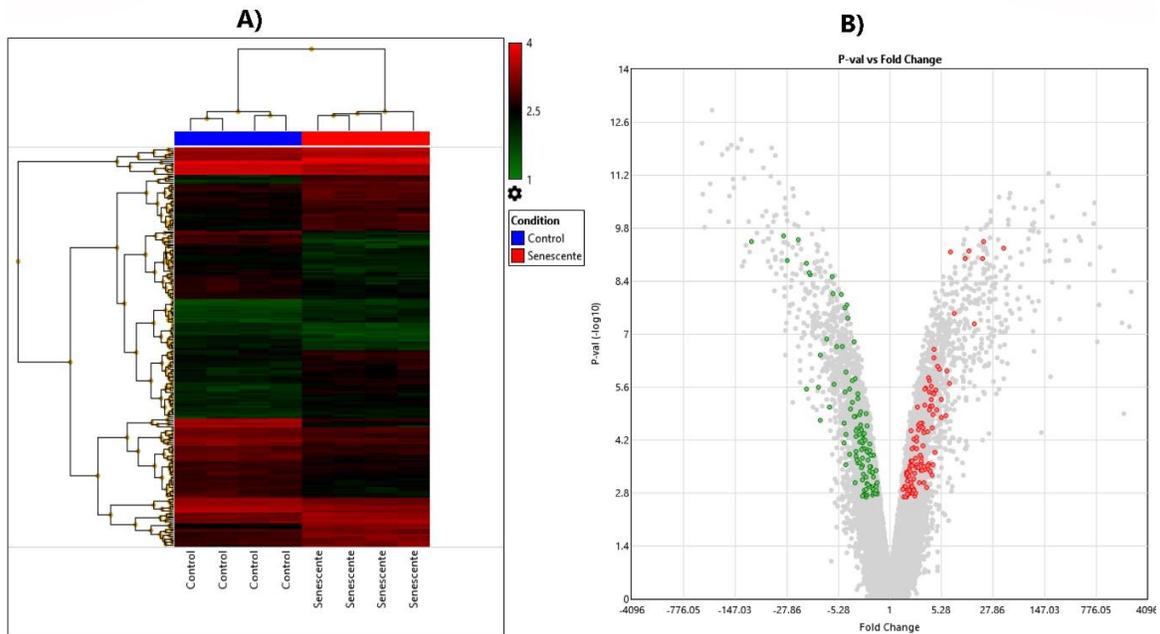


Figura 13. A) Mapa térmico de la expresión diferencial de lncRNA. La señal se transformó mediante logaritmo base 2. **B)** Gráfica de volcán de la expresión diferencial de lncRNA. Se grafica el P-val < 0.05 contra las veces de cambio en el nivel de expresión frente al control (Fold change).

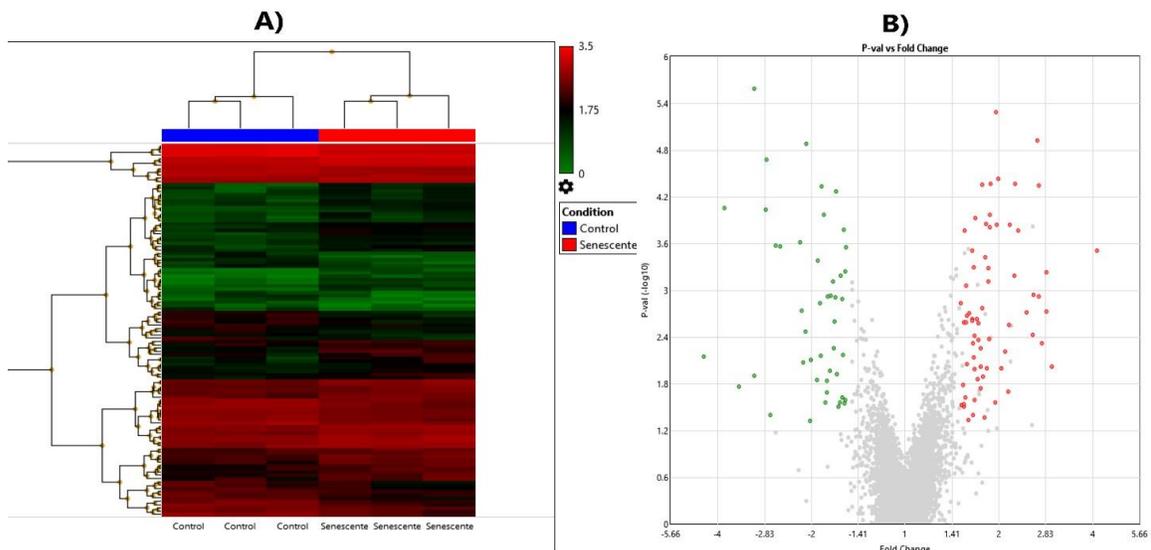


Figura 14. A) Mapa térmico de la expresión diferencial de miRNA. La señal se transformó mediante logaritmo base 2. **B)** Gráfica de volcán de la expresión diferencial de miRNA. Se grafica el P-val < 0.05 contra las veces de cambio en el nivel de expresión frente al control (Fold change).

9.3 Redes de interacción proteína – proteína

Se construyó la red de expresión diferencial e interacción proteína – proteína de 987 mRNA sobre-expresados y 1317 mRNA sub-expresados con el plugin STRING de Cytoscape (Figura 15). Para dar sentido a esta red se realizó un análisis de enriquecimiento de vías KEGG (Figura 16). Rutas de señalización como la de receptores nucleares, Nrf2 y VEGFA resultaron afectadas, también hubo afectaciones en rutas metabólicas como el metabolismo del folato, vitamina B12, biosíntesis de colesterol y prostaglandinas. La ontología de los procesos biológicos muestra alteraciones en el desarrollo de epidermis, señalización mediada por citocinas e interferón y migración celular (Figura 17). En términos de función molecular hubo disrupciones en la actividad homodimerizadora de proteínas, unión a cadherina, unión a metales, actividad de peptidasas y factores de transcripción (Figura 18). Las alteraciones en funciones biológicas y moleculares ocasionaron disfunción en componentes celulares como el lumen del retículo endoplásmico, la adhesión focal, lumen vacuolar y lisosomal (Figura 19). Profundizando en la función de los genes alterados, se realizó la extracción de las proteínas con mayor conexión e interacciones, el análisis sugirió la presencia de un módulo funcional de 42 genes (Figura 20). Las vías de señalización con importancia dentro de la red estarían relacionadas con la señalización del sistema inmunológico mediada por citocinas e interferón (Figura 21). Los procesos que más cambios sufren son la respuesta a citocinas y estímulos químicos que son mediados por receptores de superficie (Figura 22). En términos de componentes biológicos, los que tienen más alteraciones son el espacio extracelular, las vesículas y el citoplasma (Figura 23). Todas estas alteraciones generaron cambios en los patrones de expresión génica y ahora las células epiteliales de próstata se parecen más a otros tipos celulares según el Human Gene Atlas (Figura 24), por lo que estas aberraciones podrían estar dando lugar a diversas enfermedades de tipo neoplásico y contribuyendo a la metástasis de acuerdo con DisGeNet (Figura 25).

Con el objetivo de entender un poco más la función de los genes diferencialmente expresados, se construyeron por separado las redes de los mRNA sobre-expresados (Figura 25) y sub-expresados (Figura 26). El análisis de enriquecimiento reveló que la sobre-expresión de mRNA afectó a varias vías de señalización importantes como la vía de los receptores nucleares, Nrf2, TGF- β , VEGFA, probablemente sobre-activandolas y propiciando fenómenos como la diferenciación y transición epitelio – mesénquima (Figura 27). En cuanto a las vías afectadas por la disminución de la expresión hubo un gran impacto en vías metabólicas y de absorción de nutrientes como: metabolismo del folato, biosíntesis de colesterol, metabolismo de la vitamina B12 y la vía del mevalonato, las vías de señalización afectadas fueron la respuesta a proteínas mal plegadas y señalización mediada por interferón (Figura 28). En términos funcionales los genes que aumentaron su expresión contribuyen con procesos de diferenciación, regulación de la migración y activación de neutrófilos (Figura 29), mientras que los que disminuyeron fueron: respuesta al interferón y citocinas, biosíntesis de esteroides y respuesta a proteínas mal plegadas (Figura 30). Las modificaciones en las funciones biológicas tienen origen en alteraciones de los componentes celulares, la sobre-expresión de estos genes llevo a interrupciones en el funcionamiento del citoesqueleto, gránulos y uniones celulares (Figura 31); mientras que la disminución de la expresión génica ocasiono alteraciones en el retículo endoplásmico, lisosomas, aparato de Golgi y mitocondria (Figura 32). Para conocer cuáles de los genes podrían estar dirigiendo la alteración de estos procesos se realizó de nuevo la identificación y extracción de módulos funcionales. Para los genes sobreexpresados, el módulo enriquecido resultó contener 21 genes que participan en las vías de señalización de la relaxina y apelina, proteoglicanos en cáncer, TGF- β , TNF y uniones comunicantes (Figura 33); mientras que el módulo de los genes subexpresados está conformado por 23 genes relacionados con la señalización mediada por citocinas, modificación post-traducciona de proteínas, transducción de señales y organización de la matriz extracelular (Figura 34). Las funciones biológicas afectadas en el módulo de los genes sobre-expresados son el desarrollo del tubo neural, osificación, cicatrización, actividad peptidasa y respuesta a hipoxia

(Figura 35) en tanto los genes a la baja en general afectaron procesos relacionados con la señalización mediada por citocinas e interferón gamma, control de la angiogénesis y adhesión focal (Figura 36).

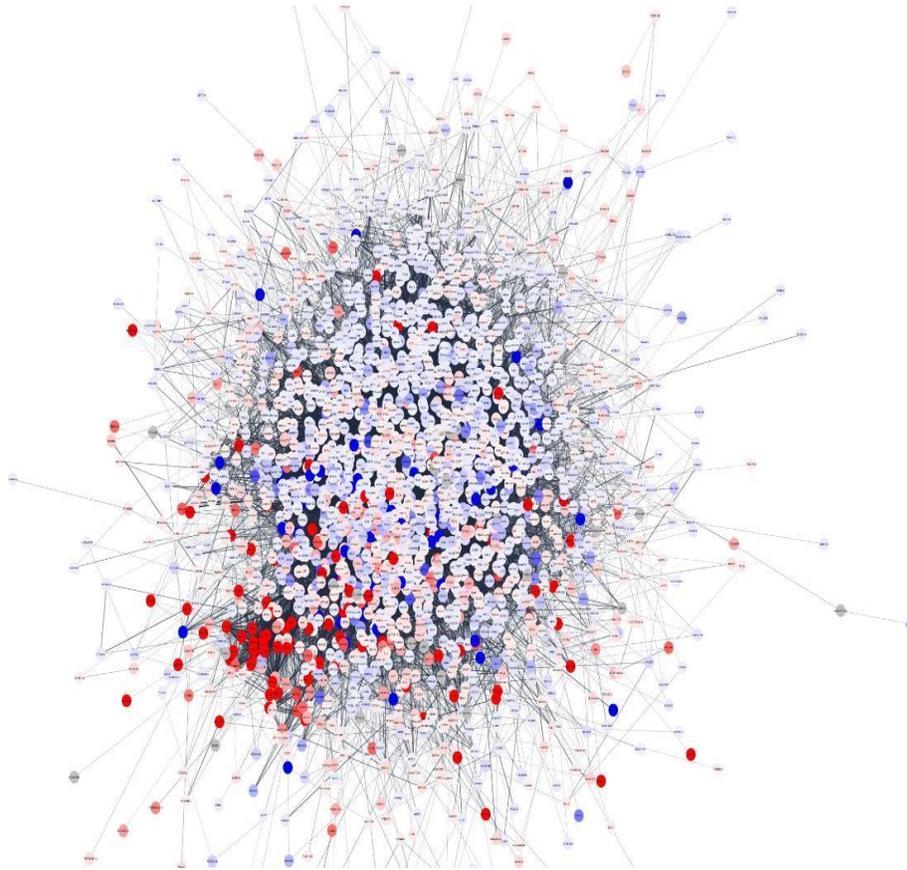


Figura 15. Red de expresión diferencial e interacción proteína-proteína. Los círculos rojos representan genes que elevaron su expresión, mientras que los azules genes que la disminuyeron.

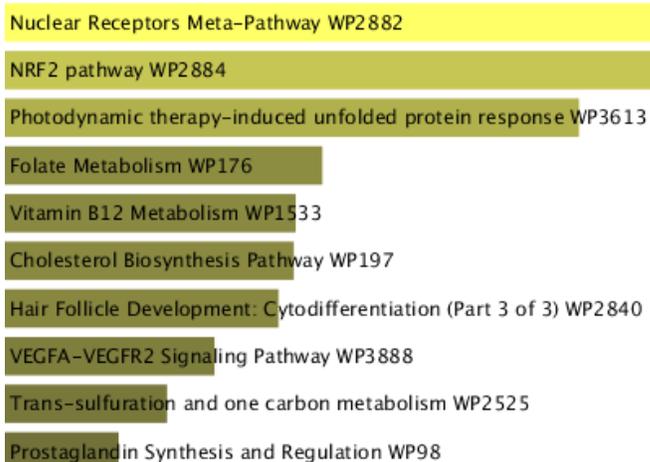


Figura 16. Análisis de enriquecimiento de vías (KEGG). El tamaño de las barras indica la cantidad de genes.

epidermis development (GO:0008544)

cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221)

cellular response to type I interferon (GO:0071357)

type I interferon signaling pathway (GO:0060337)

regulation of cell migration (GO:0030334)

cellular protein modification process (GO:0006464)

epidermal cell differentiation (GO:0009913)

keratinocyte differentiation (GO:0030216)

positive regulation of cell migration (GO:0030335)

neutrophil mediated immunity (GO:0002446)

Figura 17. Análisis ontológico de procesos biológicos.

protein homodimerization activity (GO:0042803)

cadherin binding (GO:0045296)

metal ion binding (GO:0046872)

peptidase activity, acting on L-amino acid peptides (GO:0070011)

2-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase activity (GO:0047144)

serine-type endopeptidase inhibitor activity (GO:0004867)

transcription factor activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding (GO:0000982)

CXCR chemokine receptor binding (GO:0045236)

endopeptidase inhibitor activity (GO:0004866)

transcriptional activator activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding (GO:00010

Figura 18. Análisis ontológico de funciones moleculares

endoplasmic reticulum lumen (GO:0005788)

focal adhesion (GO:0005925)

vacuolar lumen (GO:0005775)

lysosomal lumen (GO:0043202)

lysosome (GO:0005764)

azurophil granule (GO:0042582)

secretory granule lumen (GO:0034774)

tertiary granule (GO:0070820)

polymeric cytoskeletal fiber (GO:0099513)

COPII-coated ER to Golgi transport vesicle (GO:0030134)

Figura 19. Análisis ontológico de componentes celulares

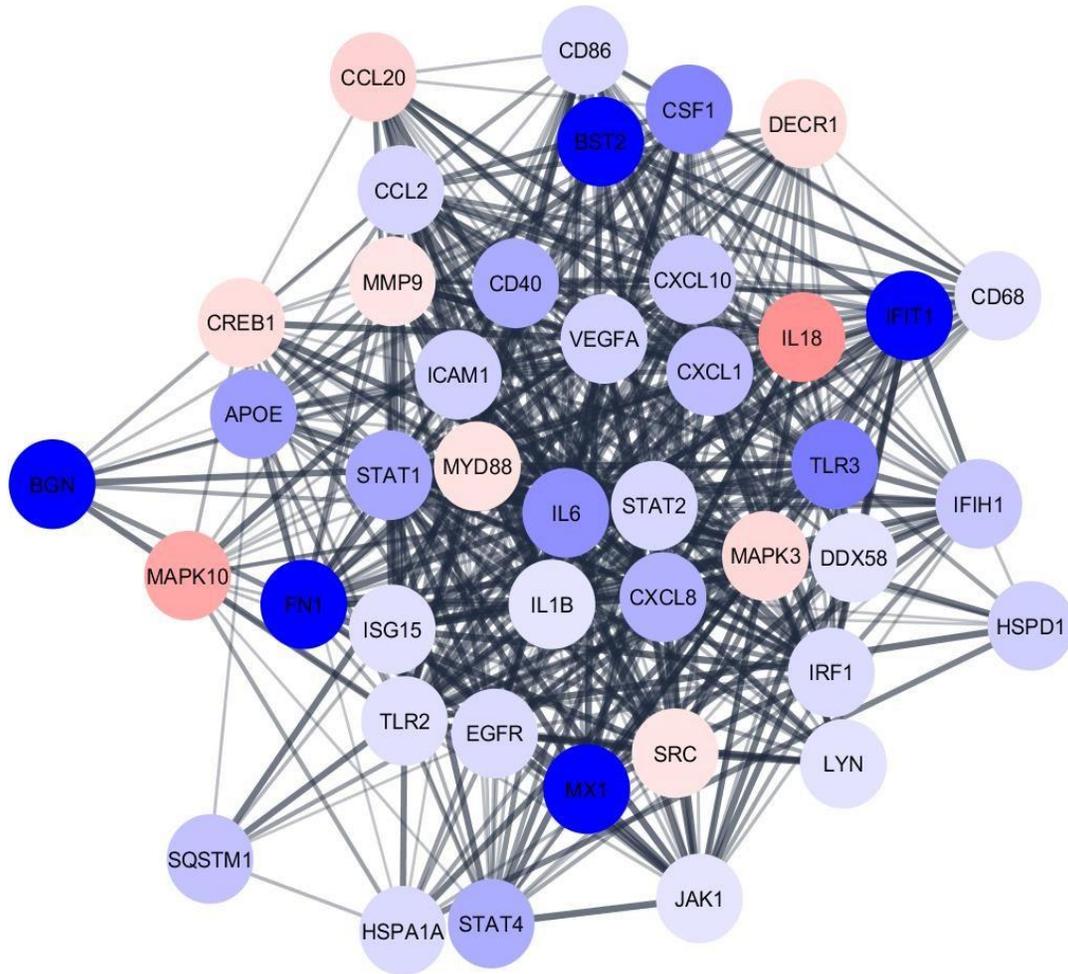


Figura 20. Módulo funcional con mayor cantidad de interconexiones e interacciones. Los círculos color rojo significan genes que aumentan su expresión mientras que los azules la disminuyen.

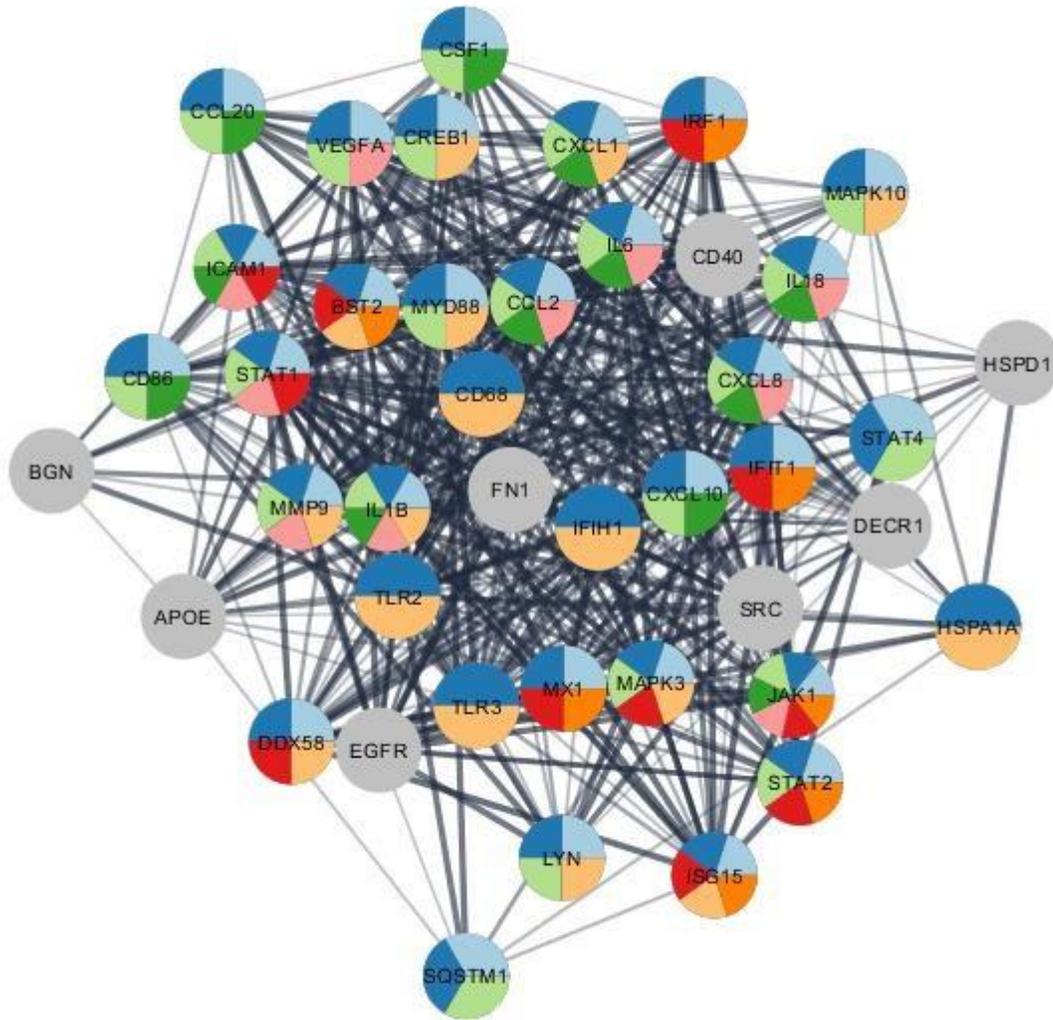


chart color	term name	description	FDR value	# genes
	HSA-1280215	Cytokine Signaling in Immune system	2.02E-30	29
	HSA-168256	Immune System	8.2E-25	34
	HSA-449147	Signaling by Interleukins	8.64E-25	23
	HSA-6783783	Interleukin-10 signaling	1.13E-19	12
	HSA-6785807	Interleukin-4 and Interleukin-13 sign...	3.68E-12	10
	HSA-913531	Interferon Signaling	2.12E-11	11
	HSA-168249	Innate Immune System	7.89E-9	16
	HSA-909733	Interferon alpha/beta signaling	9.31E-9	7

Figura 21. Vías de señalización (KEGG) en las que participa el módulo con mayor importancia dentro de la red.

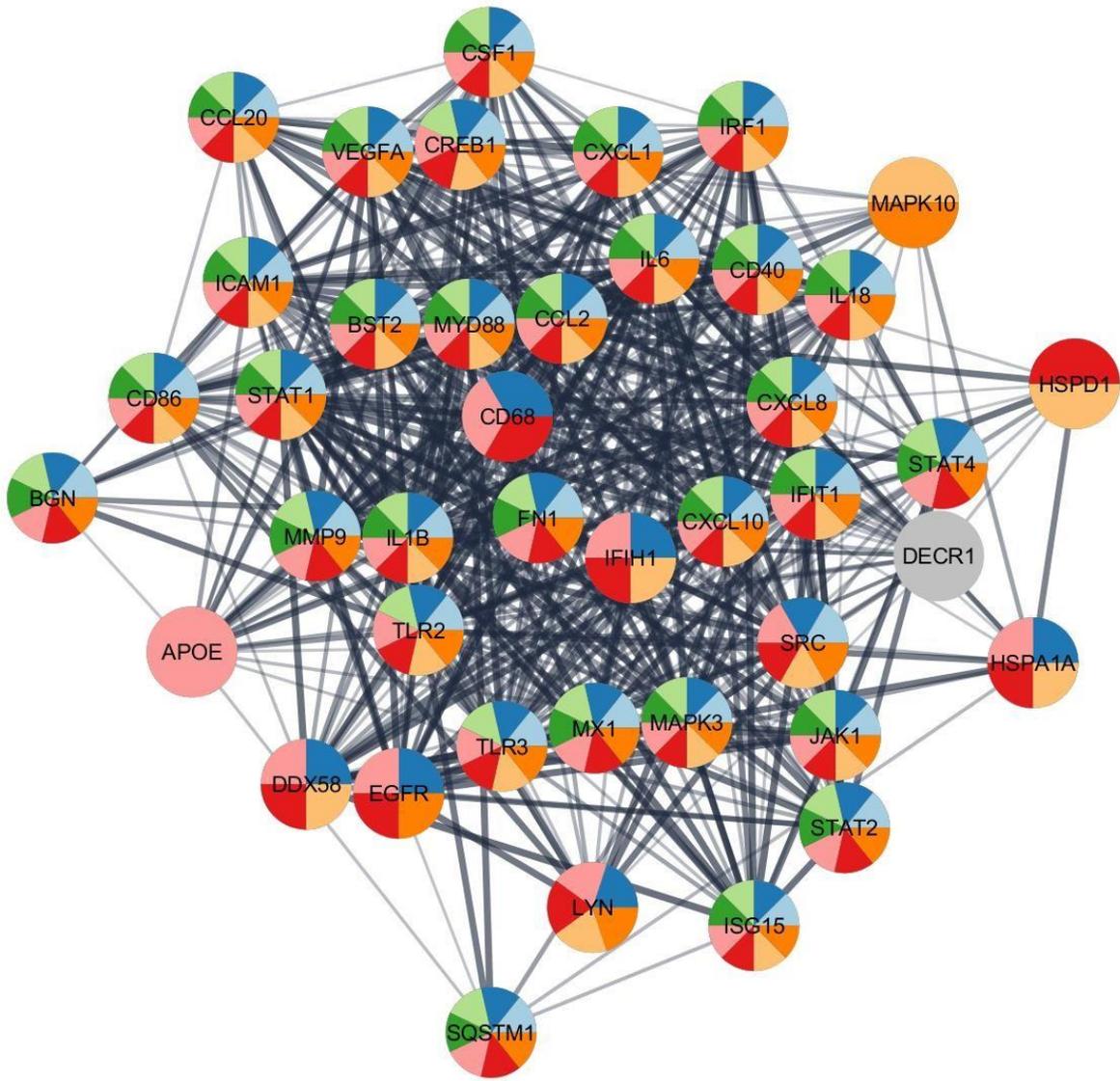


chart color	term name	description	FDR value	# genes
	GO.0034097	response to cytokine	5.67E-29	32
	GO.0071310	cellular response to organic substance	1.21E-28	38
	GO.0071345	cellular response to cytokine stimulus	1.21E-28	31
	GO.0019221	cytokine-mediated signaling pathway	2.12E-28	28
	GO.0070887	cellular response to chemical stimulus	1.05E-27	39
	GO.0010033	response to organic substance	6.45E-27	39
	GO.0002682	regulation of immune system process	2.83E-24	31
	GO.0007166	cell surface receptor signaling pathway	3.26E-24	35
	GO.0002376	immune system process	3.7E-23	35

Figura 22. Análisis ontológico de procesos biológicos

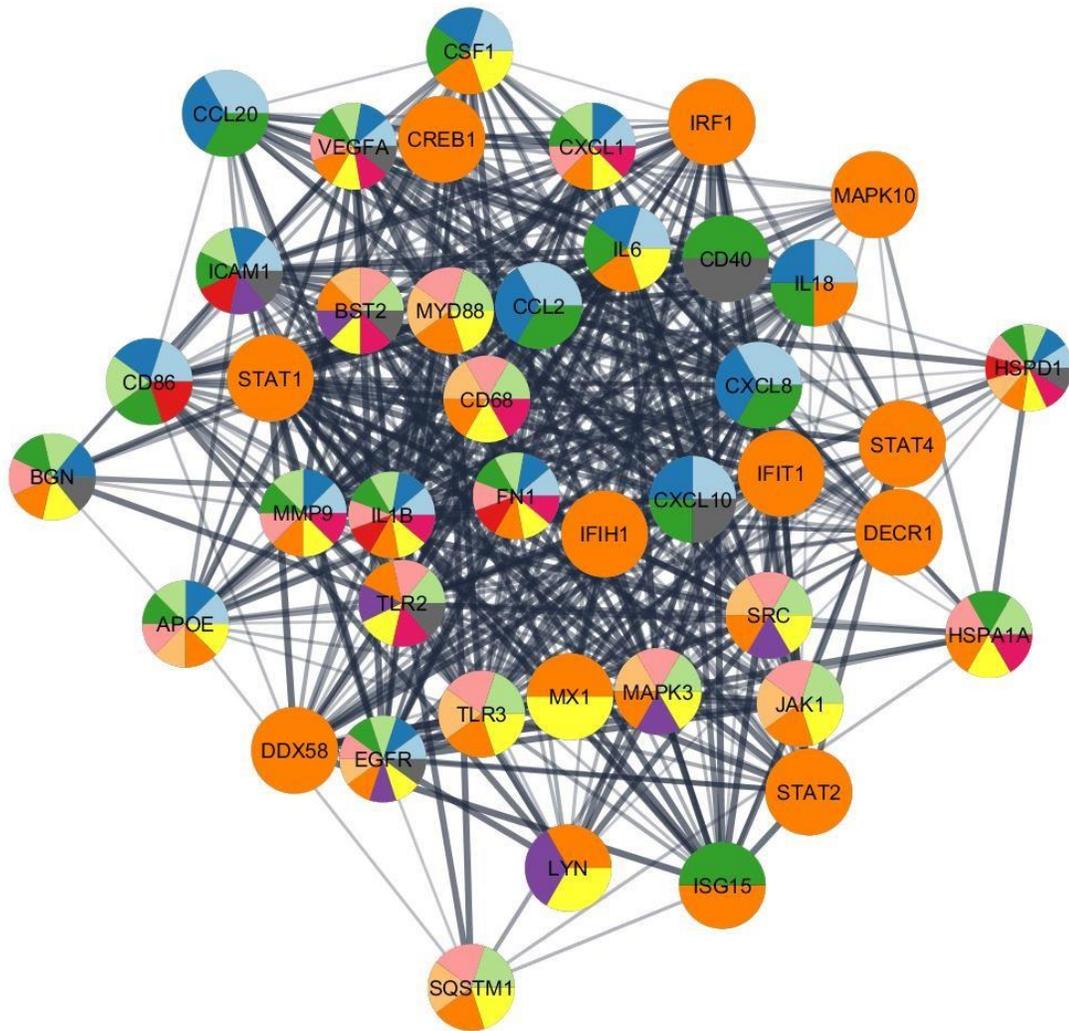


chart color	term name	description	FDR value	# genes
	GO.0005615	extracellular space	1.78E-8	17
	GO.0044421	extracellular region part	1.78E-8	18
	GO.0031982	vesicle	1.49E-7	21
	GO.0005576	extracellular region	4.56E-7	21
	GO.0031410	cytoplasmic vesicle	2.17E-6	19
	GO.0070062	extracellular exosome	3.97E-5	5
	GO.0005768	endosome	6.05E-5	11
	GO.0044444	cytoplasmic part	6.05E-5	35
	GO.0045121	membrane raft	8.26E-5	7
	GO.0012505	endomembrane system	8.93E-5	23
	GO.0030141	secretory granule	1.4E-4	10

Figura 23. Análisis ontológico de componentes biológicos

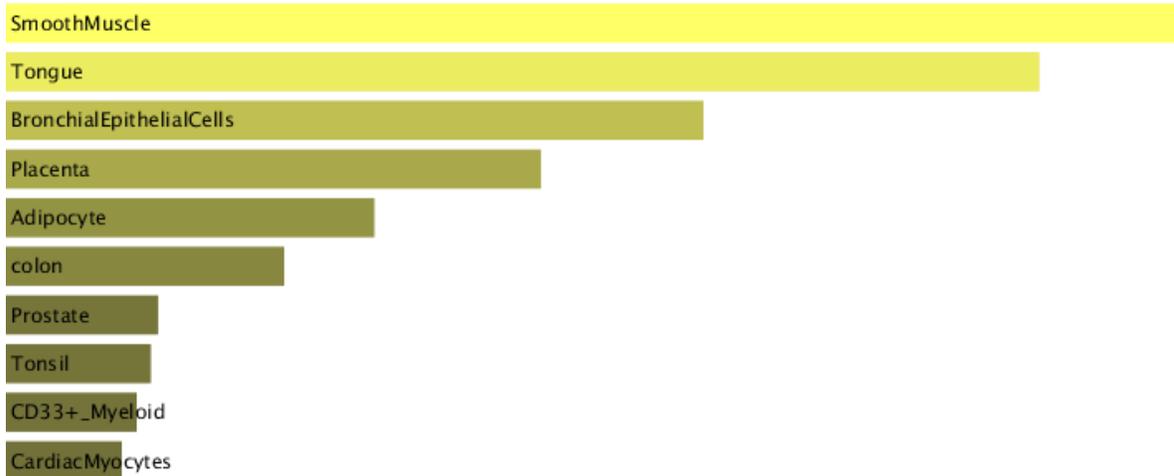


Figura 24. Patrón de expresión génica reconocido por el Human Gen Atlas

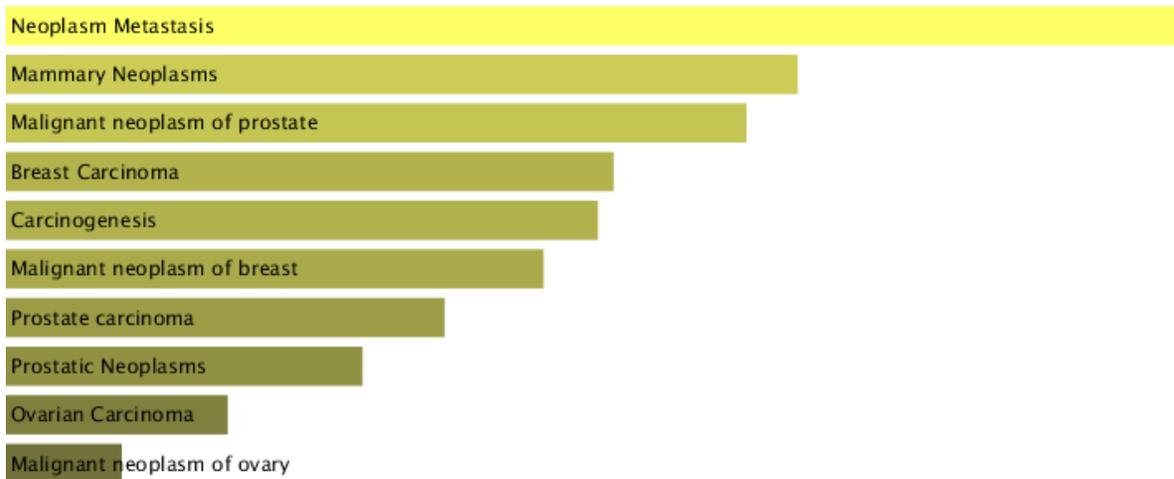


Figura 25. Enfermedades asociadas con las aberraciones en el patrón de expresión génica, obtenidas de la base de datos DisGeNet

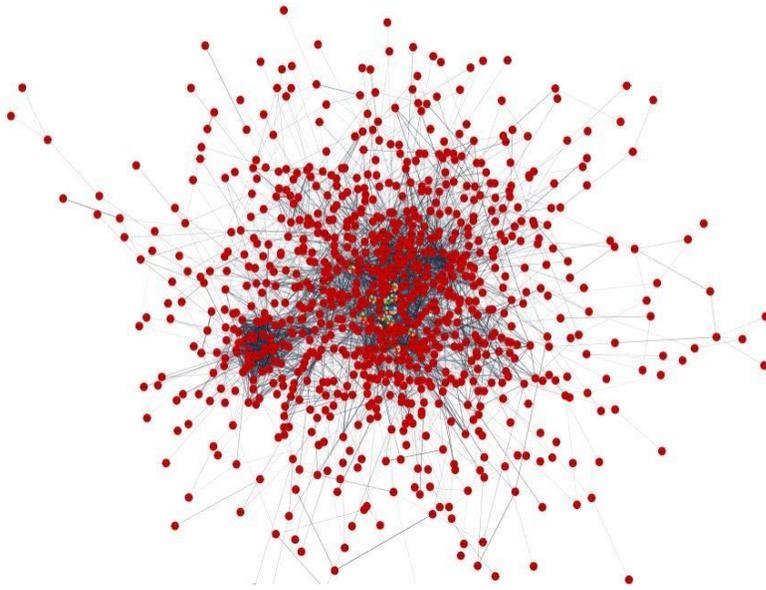


Figura 25. Red de interacciones proteína – proteína de genes sobre-expresados

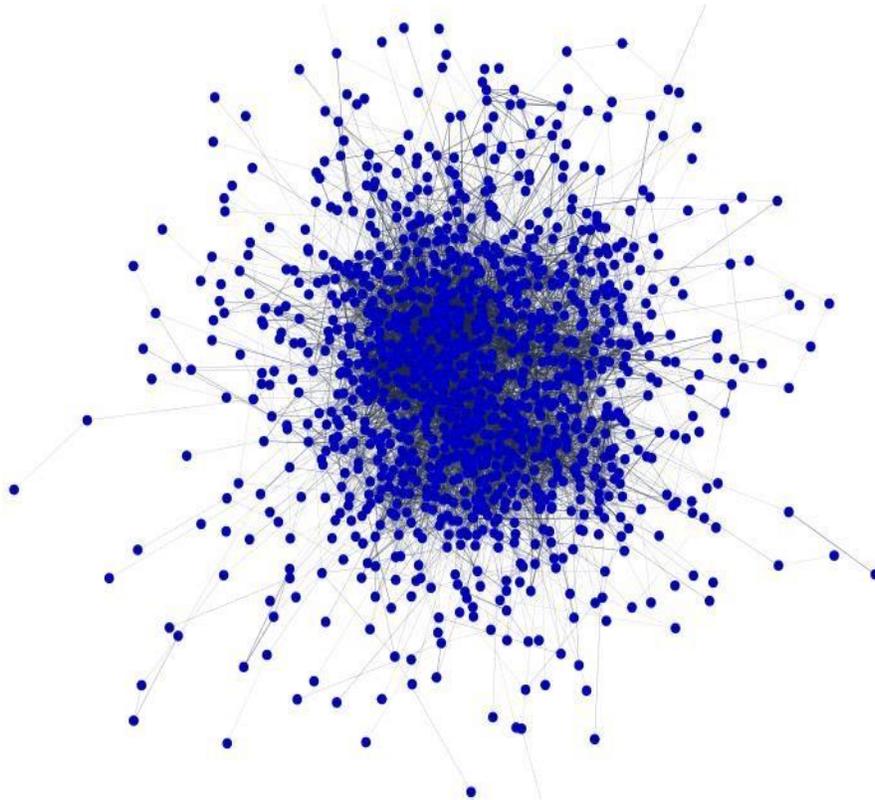


Figura 26. Red de interacción proteína – proteína de genes sub-expresado

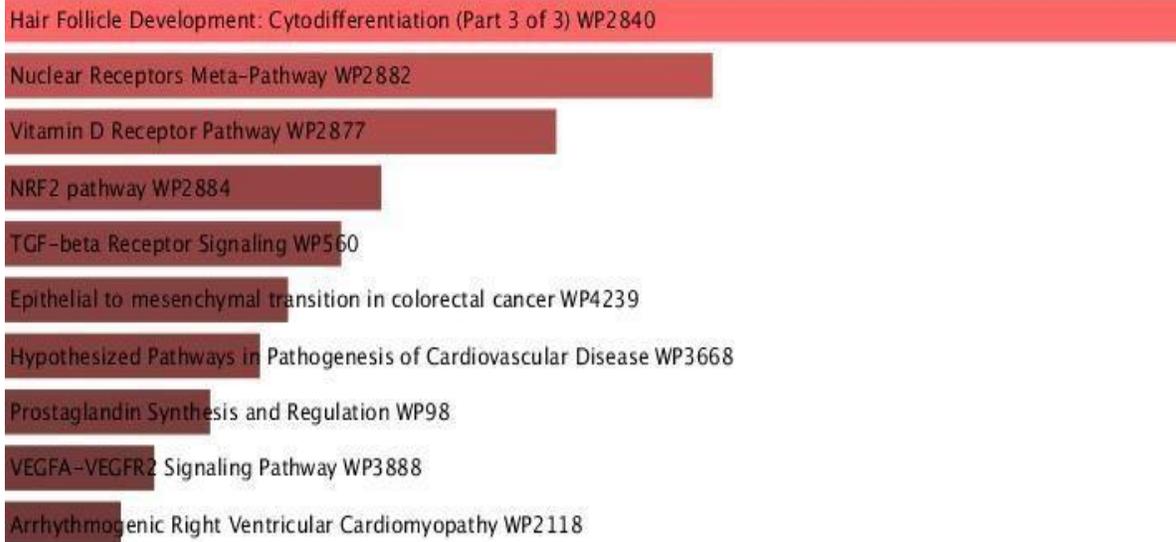


Figura 27. Vías de señalización afectadas por la sobre-expresión de mRNAs, obtenidas de KEGG.

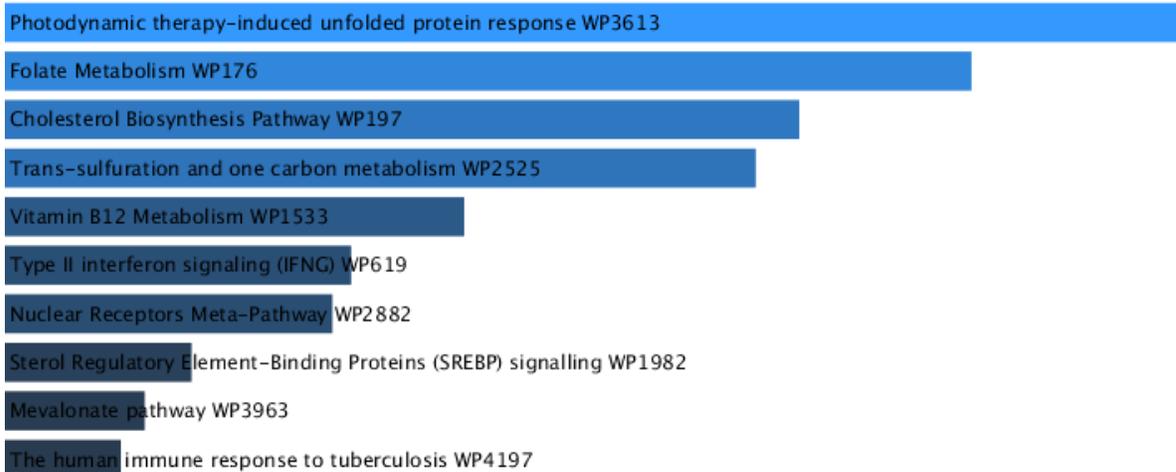


Figura 28. Vías de señalización afectadas por la sub-expresión de mRNAs, obtenidas de KEGG.

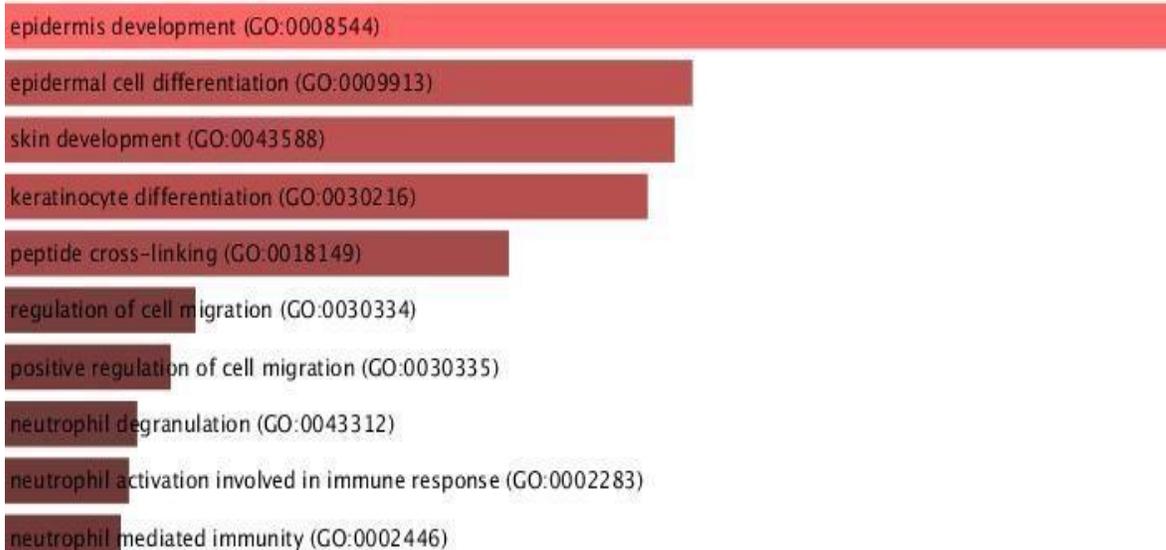


Figura 29. Análisis ontológico de los procesos biológicos asociadas a los mRNA sobre-expresados.

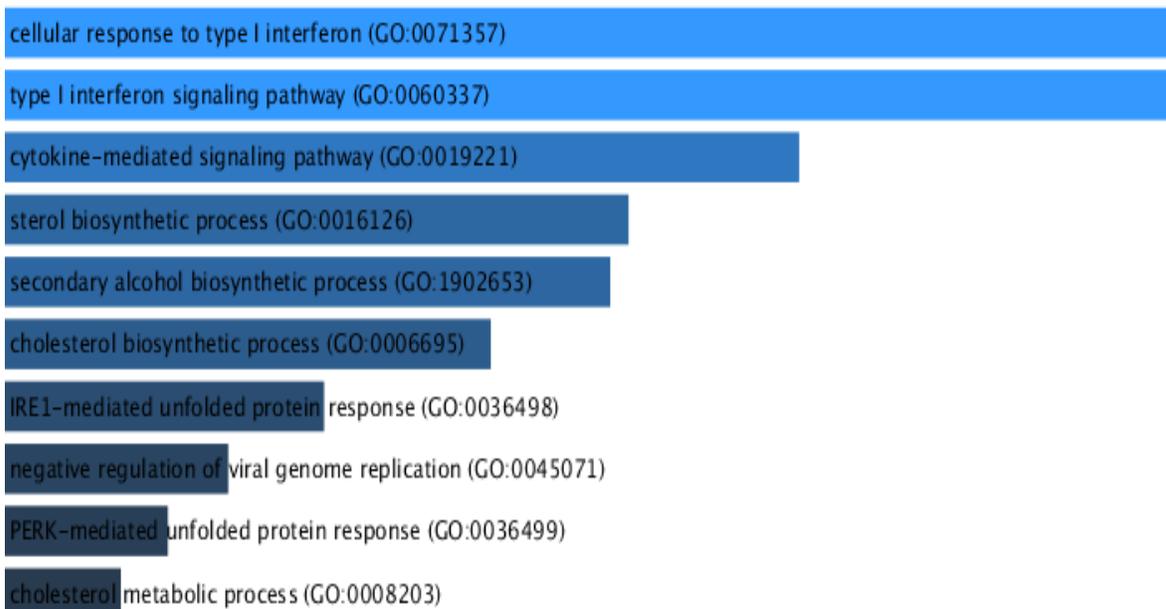


Figura 30. Análisis ontológico de los procesos biológicos asociadas a los mRNA sub-expresados

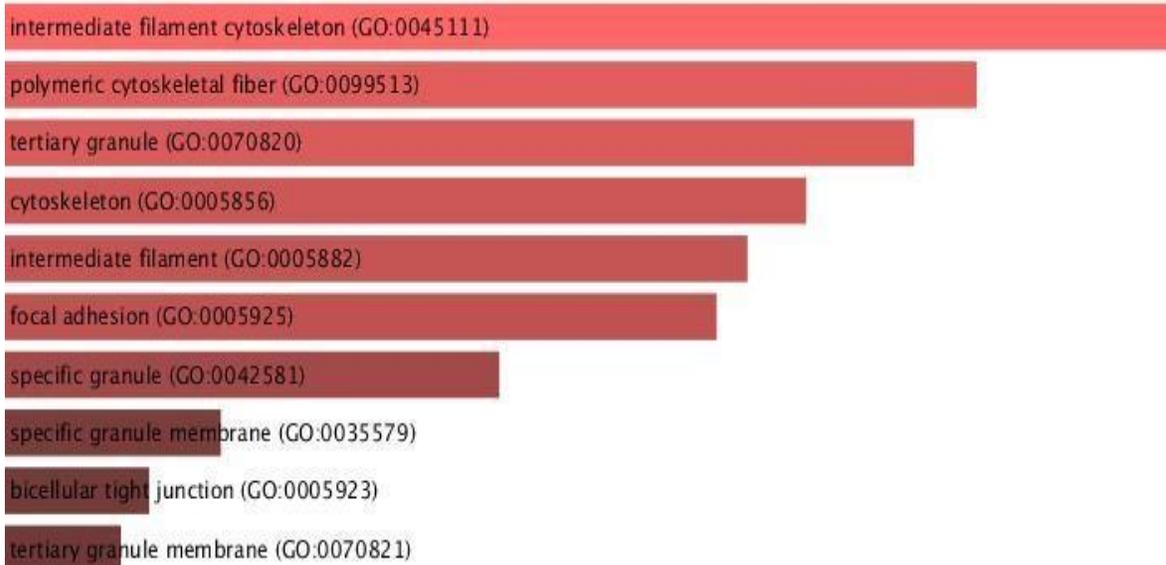


Figura 31. Análisis ontológico de las componentes celulares asociadas a los mRNA sobre-expresados.

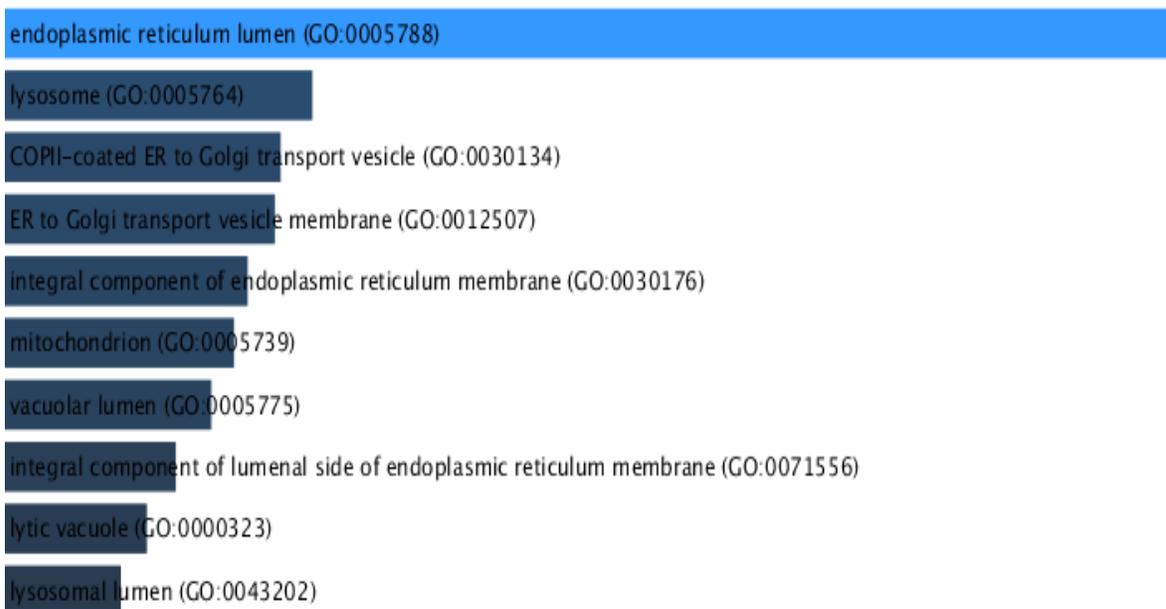


Figura 32. Análisis ontológico de las componentes celulares asociadas a los mRNA sobre-expresados.

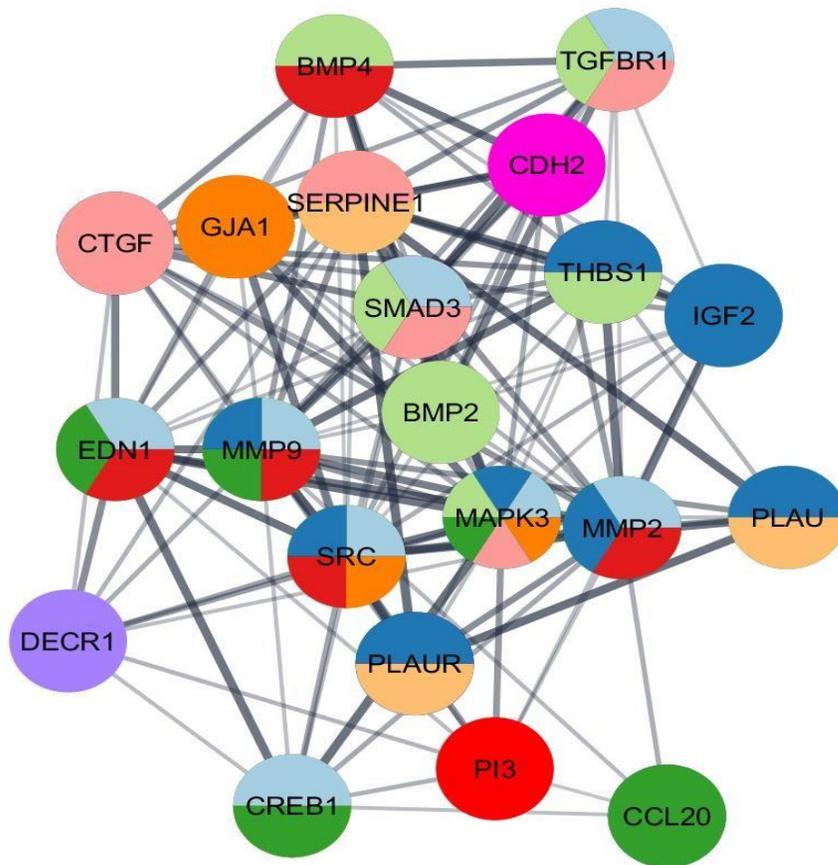


chart color	term name	description	FDR value	# genes
	hsa04926	Relaxin signaling pathway	1.34E-10	8
	hsa05205	Proteoglycans in cancer	1.51E-9	8
	hsa04350	TGF-beta signaling pathway	1.83E-8	6
	hsa04668	TNF signaling pathway	1.77E-6	5
	hsa04371	Apelin signaling pathway	4.32E-6	5
	hsa05418	Fluid shear stress and atherosclerosis	4.32E-6	5
	hsa04610	Complement and coagulation cascades	5.9E-4	3
	hsa04540	Gap junction	7.4E-4	3

Figura 33. Enriquecimiento de vías (KEGG) modulo principal de los genes sobre-expresados

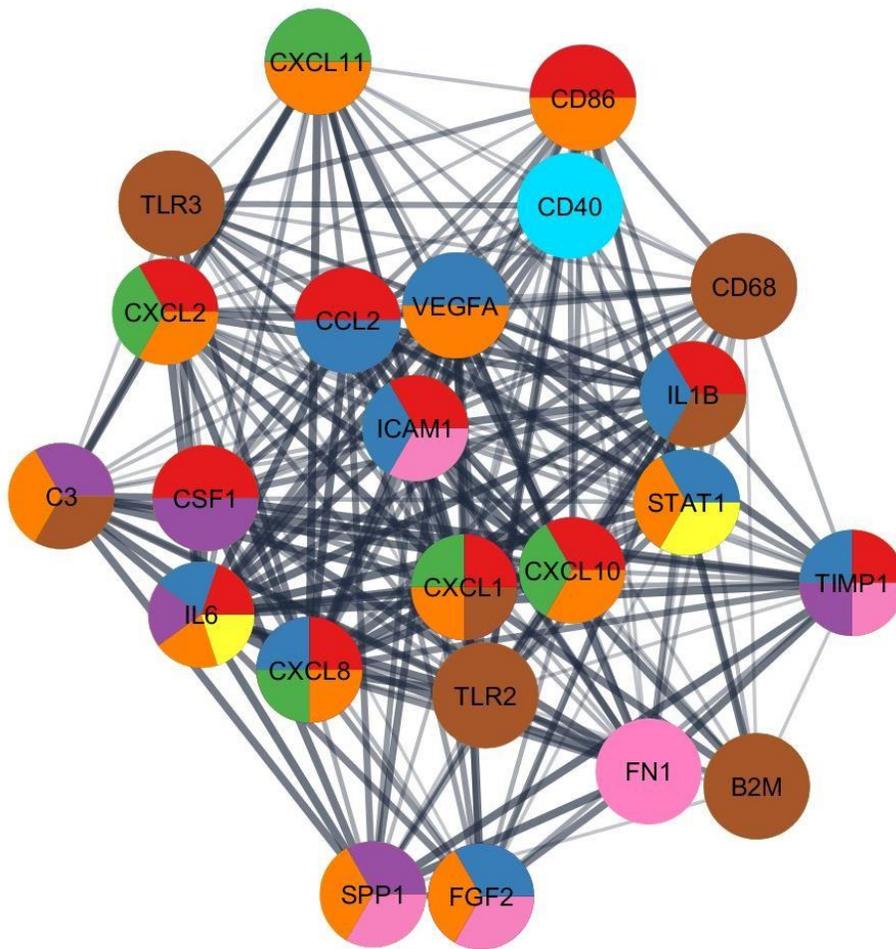


chart color	term name	description	FDR value	# genes
Red	HSA-6783783	Interleukin-10 signaling	1.04E-20	11
Blue	HSA-6785807	Interleukin-4 and Interleukin-13 signaling	1.98E-13	9
Green	HSA-380108	Chemokine receptors bind chemokines	1.39E-7	5
Purple	HSA-8957275	Post-translational protein phosphorylation	4.45E-6	5
Orange	HSA-162582	Signal Transduction	1.8E-4	12
Yellow	HSA-1059683	Interleukin-6 signaling	0.0016	2
Brown	HSA-168249	Innate Immune System	0.0017	7
Pink	HSA-1474244	Extracellular matrix organization	0.0049	4

Figura 34. Enriquecimiento de vías (KEGG) modulo principal de los genes sub-expresados

9.4 Redes de interacción mRNA – miRNA

Se realizó el análisis de enriquecimiento de vías para los miRNA diferencialmente expresados. Los 68 miRNA sobre-expresados podrían estar modificando la actividad de las vías de señalización del receptor de interacción de la matriz extracelular, TGF-beta, ErbB e Hippo, además de algunos procesos metabólicos como la síntesis de ácidos grasos, proteoglicanos y la degradación de lisina. Todo esto podría estar contribuyendo con procesos como la activación de vías de señalización en cáncer de próstata (Figura 37). Entre tanto las alteraciones por la disminución en la expresión de 46 miRNA afectó la vía de señalización de MAPK, PI3K-AKT y Wnt y procesos como la endocitosis, adhesión focal y diferenciación (Figura 38).

Para profundizar en el posible papel regulatorio de los miRNA, se construyeron redes de interacción mRNA – miRNA de los módulos con mayor importancia. El módulo con mayores interconexiones en la red general (Figura 20) presentó interacciones con 8 miRNA de los cuales 7 elevaron su expresión (Figura 39), esto podría sugerir que la sobre-expresión de estos miRNA (Tabla 1) tendría algún efecto regulatorio sobre las proteínas con mayor actividad durante la senescencia, pero además la expresión de este núcleo de miRNA tiene una fuerte relación con diversos tipos de cáncer (Figura 40). En cuanto al módulo principal de los genes sobre-expresados se obtuvo una red de interacción con 9 miRNA sobre-expresados (Figura 41) mientras que para el módulo de los genes sub-expresado se obtuvieron 7 interacciones con miRNA (Figura 42).

Otros análisis de enriquecimiento de vías (Wikipathways) fueron realizados para LncRNA mostrando las alteraciones ocasionadas por la sobre-expresión de 109 transcritos y la sub-expresión de 112 (Figura 43) y para circRNA, revelando la disminución en la función de múltiples vías por la sobre-expresión de 9 RNAs circulares y la disminución en la expresión de 16 de estos transcritos (Figura 44).

#	KEGG pathway	p-value
1.	ECM-receptor interaction (hsa04512)	1.6505809502e-10
2.	Proteoglycans in cancer (hsa05205)	1.6505809502e-10
3.	TGF-beta signaling pathway (hsa04350)	6.1339518568e-07
4.	ErbB signaling pathway (hsa04012)	1.05646395428e-06
5.	Fatty acid biosynthesis (hsa00061)	1.97676919964e-06
6.	Glioma (hsa05214)	2.09323802478e-06
7.	Hippo signaling pathway (hsa04390)	2.5153347687e-06
8.	Lysine degradation (hsa00310)	5.78990779764e-06
9.	Pathways in cancer (hsa05200)	1.26195172154e-05
10.	Prostate cancer (hsa05215)	1.32258900687e-05

Figura 37. Análisis de vías (KEGG) en las que genes regulados por miRNA sobre-expresados presentan alteraciones

#	KEGG pathway	p-value
1.	Fc gamma R-mediated phagocytosis (hsa04666)	3.101829e-24
2.	Axon guidance (hsa04360)	5.852571e-18
3.	Focal adhesion (hsa04510)	5.852571e-18
4.	Endocytosis (hsa04144)	4.621798e-17
5.	MAPK signaling pathway (hsa04010)	7.416407e-15
6.	Long-term potentiation (hsa04720)	1.108462e-14
7.	Pathways in cancer (hsa05200)	1.457972e-13
8.	Glutamatergic synapse (hsa04724)	8.487483e-13
9.	PI3K-Akt signaling pathway (hsa04151)	9.718647e-13
10.	Wnt signaling pathway (hsa04310)	1.237781e-12

Figura 38. Análisis de vías en las que genes regulados por miRNA sub-expresados presentan alteraciones

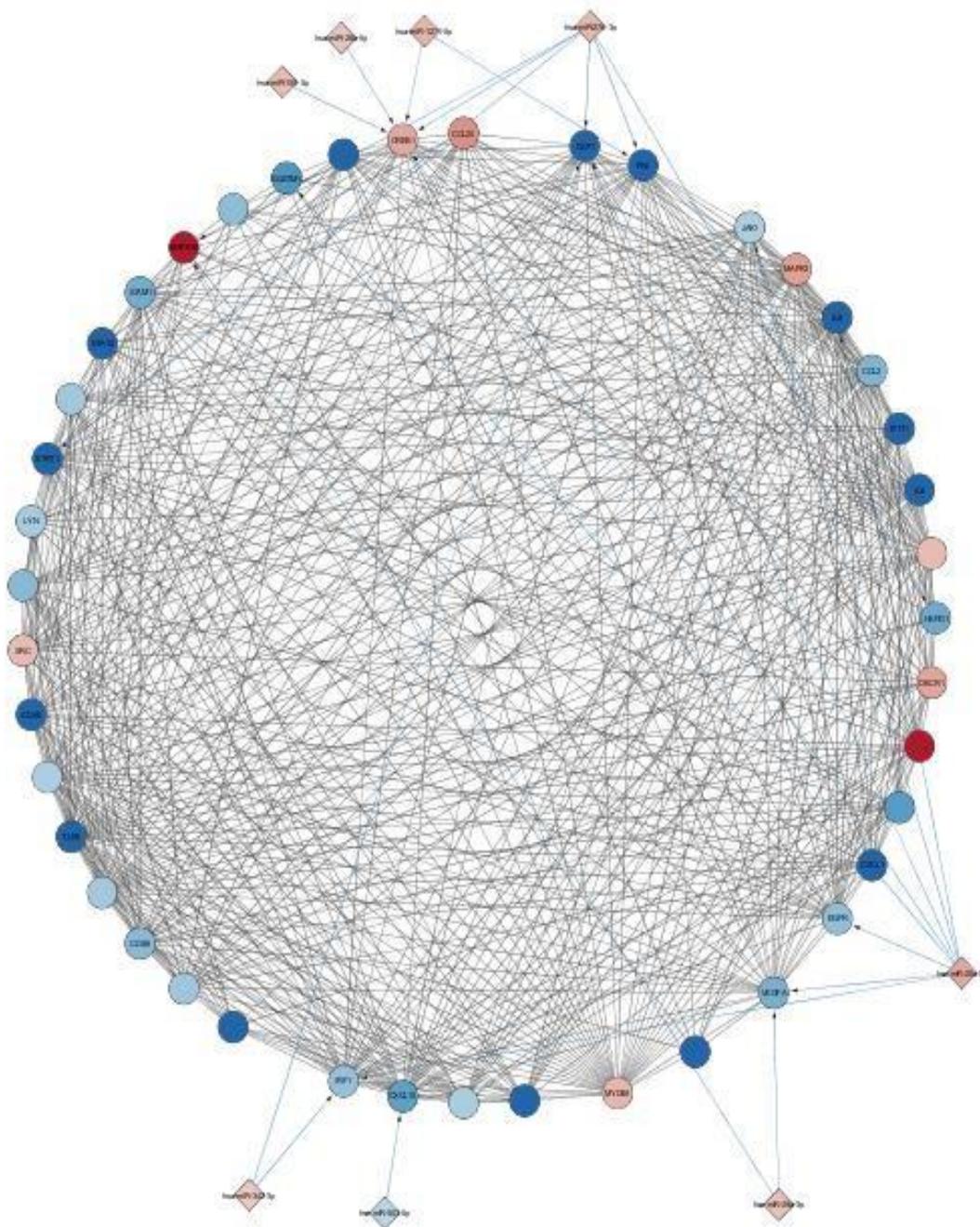


Figura 39. Red de interacción mRNA – miRNA dentro del módulo de la red principal, muestra interacciones con algunos elementos del módulo. Los círculos representan genes mientras que los rombos representan miRNA.

miRNA	Fold Change	FDR P-val
hsa-miR-342-3p	1.55	0.0002
hsa-miR-26a-5p	1.76	0.0274
hsa-miR-20a-5p	2.68	0.0274
hsa-miR-1271-5p	2.25	0.0274
hsa-miR-155-5p	1.99	0.0274
hsa-miR-27b-3p	2.17	0.0448
hsa-miR-29a-3p	1.87	0.0439
hsa-miR-503-5p	-1.66	0.0297

Tabla 1. Núcleo de miRNA diferencialmente expresados asociados al módulo principal de proteínas diferencialmente expresadas.

#	KEGG pathway	p-value
1.	<u>Pathways in cancer</u> (mmu05200)	9.381119e-21
2.	<u>Colorectal cancer</u> (hsa05210)	1.426662e-15
3.	<u>Hepatitis B</u> (hsa05161)	5.085425e-15
4.	<u>Endometrial cancer</u> (hsa05213)	2.119722e-12
5.	<u>Bladder cancer</u> (hsa05219)	2.290031e-12
6.	<u>Pancreatic cancer</u> (hsa05212)	6.871157e-12
7.	<u>Cell cycle</u> (hsa04110)	8.637604e-11
8.	<u>Prostate cancer</u> (hsa05215)	2.289994e-10
9.	<u>Melanoma</u> (hsa05218)	2.554588e-10
10.	<u>Chronic myeloid leukemia</u> (hsa05220)	2.554588e-10

Figura 40. Enriquecimiento de vías (KEGG) del núcleo de miRNA asociados con el módulo principal de proteínas diferencialmente expresadas.

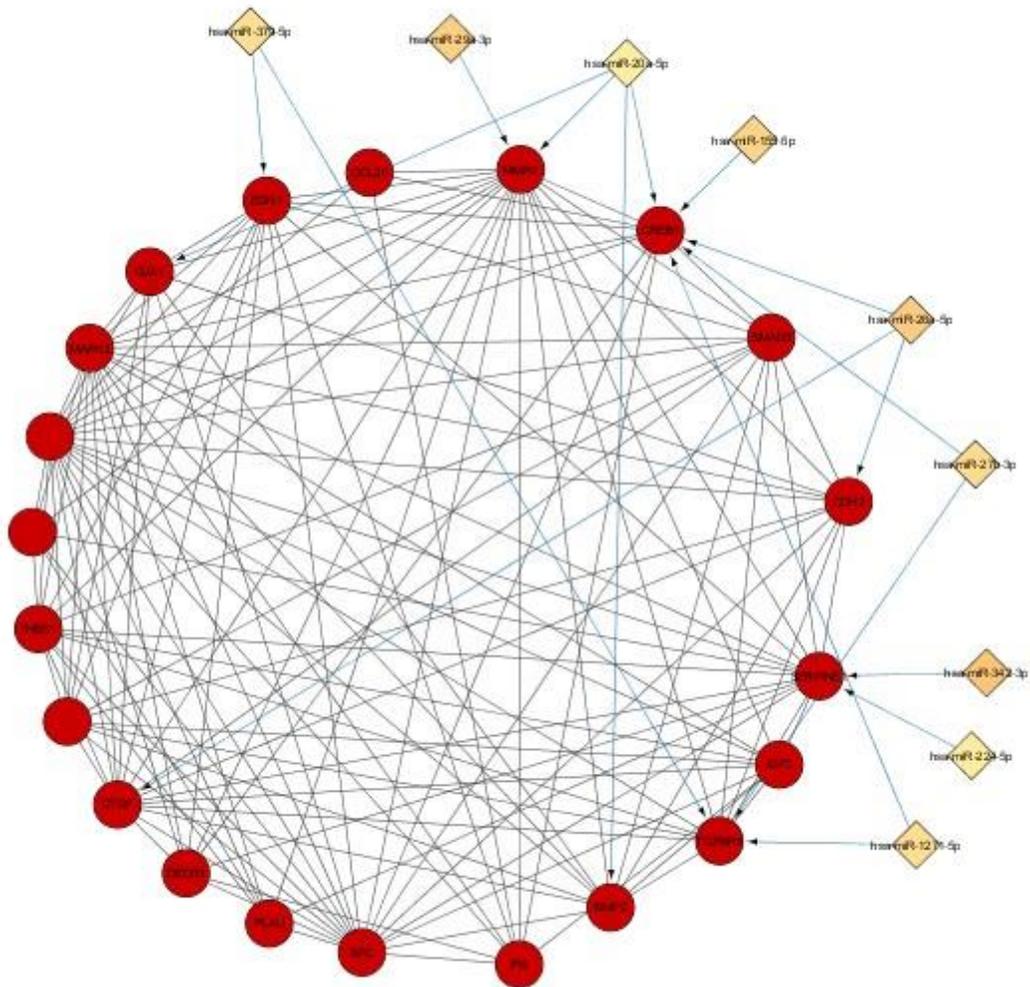


Figura 41. Red de interacción mRNA – miRNA dentro del módulo de la red de genes sobre-expresados, muestra interacciones con algunos elementos del módulo. Los círculos representan genes mientras que los rombos representan miRNA.

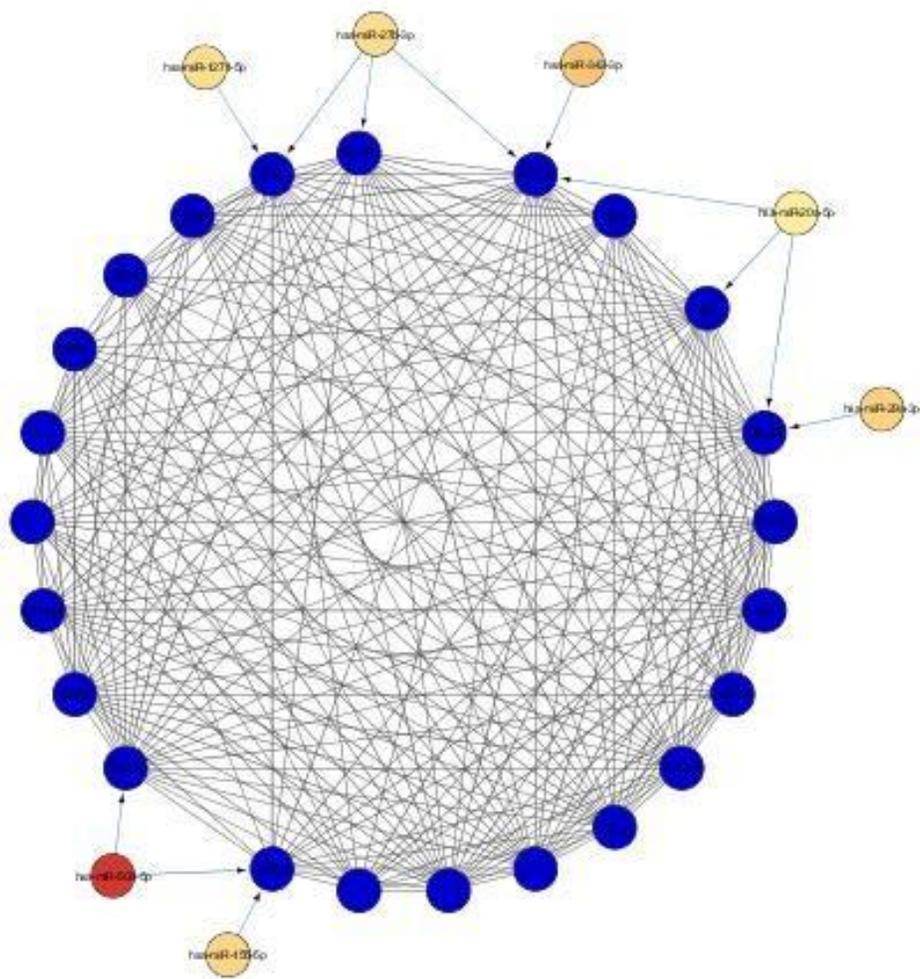


Figura 42. Red de interacción mRNA – miRNA dentro del módulo de la red de genes sub-expresados, muestra interacciones con algunos elementos del módulo. Los círculos representan genes mientras que los rombos representan miRNA.

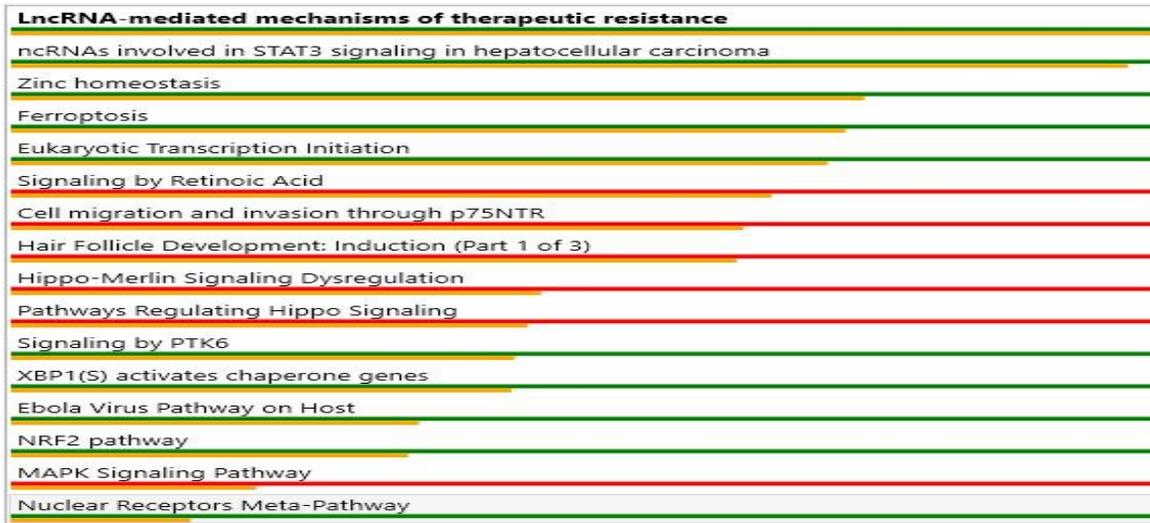


Figura 43. Enriquecimiento de las vías de señalización alteradas por la expresión diferencial de lncRNA. Verde significa disminución de función, rojo significa aumento.



Figura 44. Enriquecimiento de las vías de señalización alteradas por la expresión diferencial de circRNA, se observa una disminución en la regulación de muchos procesos metabólicos y de señalización.

9.5 Presencia de los genes asociados al núcleo de la senescencia en HPEC

Se comparó la expresión génica de HPEC bajo SIPS con los genes previamente reportados del núcleo génico asociados a la senescencia de Hernández-Segura [49] y Casella [50]. Se determinó la presencia de 20 de estos genes (Figura 45) y las vías en las que están involucrados de acuerdo con KEGG (Figura 46) y Wikipathways (Figura 47). Además, se realizó el análisis en términos ontológicos (Figuras 48, 49 y 50).

Se realizó un análisis de redes mediante el uso del plugin Genemania de Cytoscape de los genes asociados al núcleo de la senescencia presentes en HPEC, revelando una estrecha relación entre estos genes en términos de co-expresión además de otros genes presentes en HPEC que exhiben patrones de co-expresión junto con este núcleo (Figura 51). Para tratar de elucidar un posible mecanismo de regulación transcripcional se construyó una red de co-expresión miRNA – mRNA, interesantemente se encontró que la sobre-expresión de 4 miRNA podrían regular la expresión de 12 de los componentes del núcleo génico (Figura 52).

Para investigar un poco más la función de la red de co-expresión de los componentes del núcleo se realizó un análisis de extracción de módulos para determinar qué elementos son los más interconectados e importantes dentro de la red (Figura 53). Son 9 los elementos del núcleo que presentan mayor interacción con otros genes diferencialmente expresados durante la senescencia. Para tratar de inferir un mecanismo de regulación, se construyó una red ceRNA MRNA – miRNA – circRNA (Figura 54). Esta red identificó 10 miRNA como potenciales reguladores de genes asociados al núcleo además de identificar asociaciones miRNA – circRNA que podrían estar regulando la expresión de estos genes.

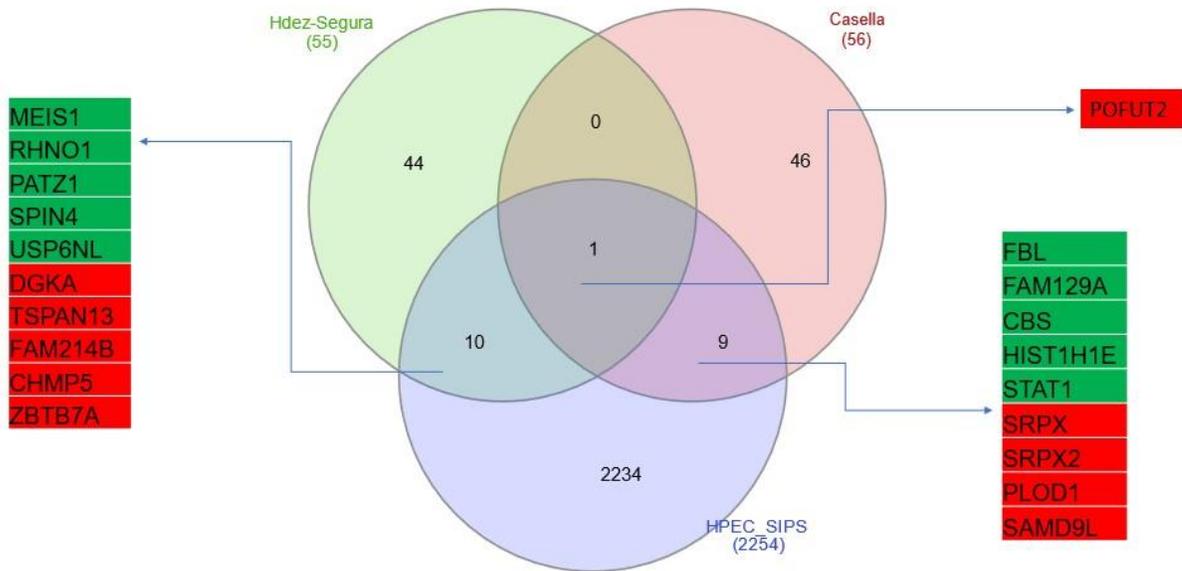


Figura 45. Presencia de los genes asociados al núcleo de la senescencia en HPEC bajo SIPS, genes en verde = sub-expresados, genes en rojo = sobre-expresados.

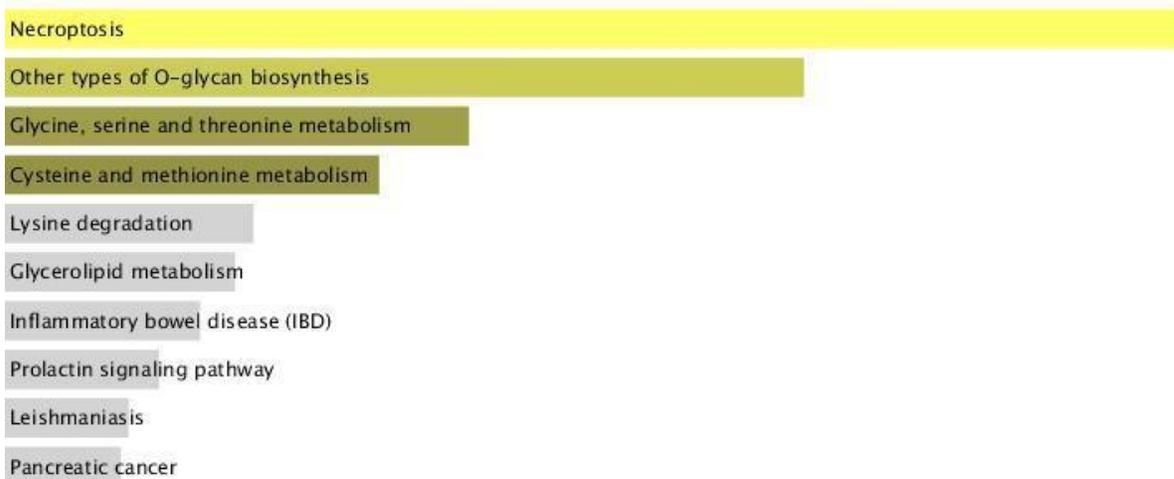


Figura 46. Vías de señalización en las que participan los genes asociados al núcleo de la senescencia presentes en HPEC, enriquecimiento obtenido de KEGG.

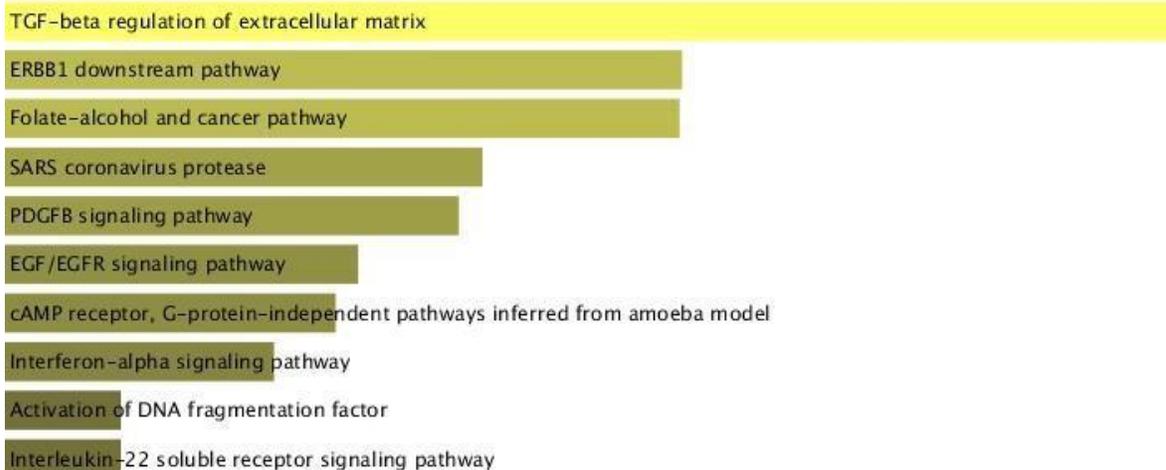


Figura 47. Vías de señalización en las que participan los genes asociados al núcleo de la senescencia presentes en HPEC, enriquecimiento obtenido de Wikipathways.

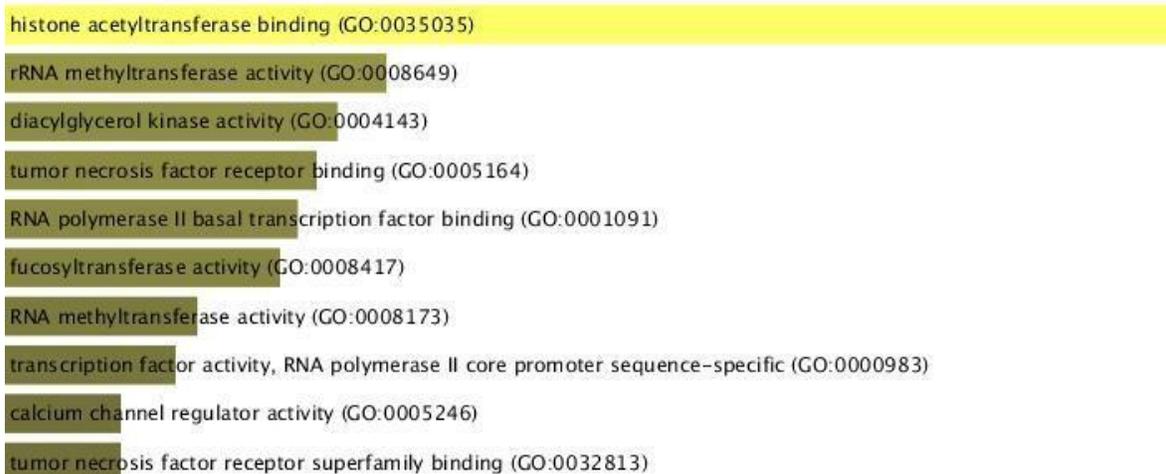


Figura 48. Análisis ontológico de las funciones moleculares de los genes asociados al núcleo de la senescencia presentes en HPEC.

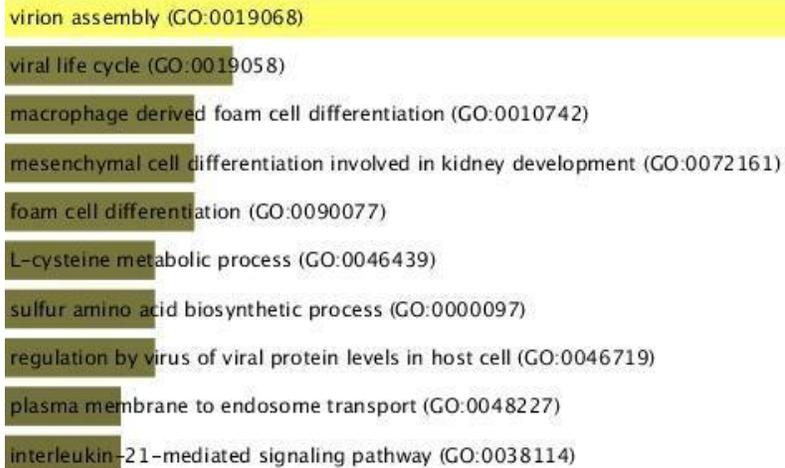


Figura 49. Análisis ontológico de los procesos biológicos de los genes asociados al núcleo de la senescencia presentes en HPEC.

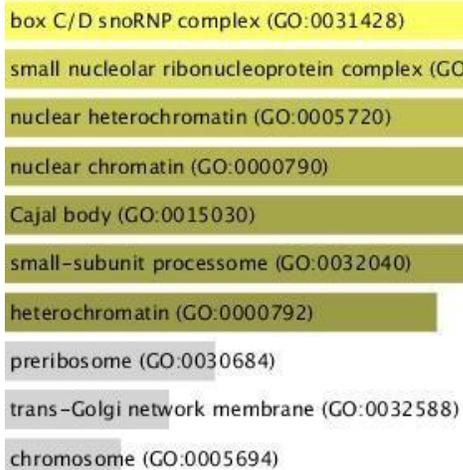


Figura 50. Análisis ontológico de los componentes celulares de los genes asociados al núcleo de la senescencia presentes en HPEC.

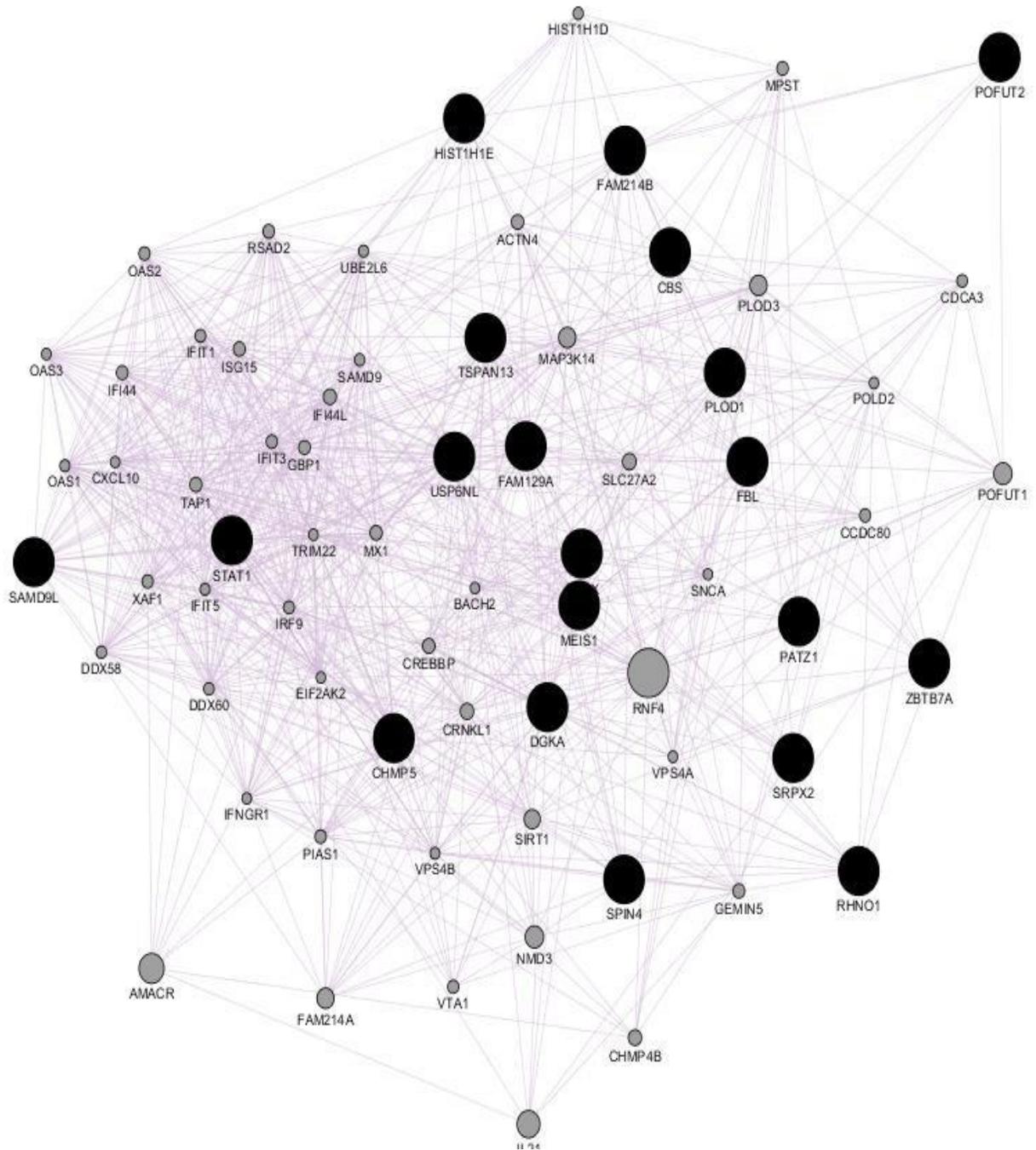


Figura 51. Red de co-expresión de genes asociados al núcleo de la senescencia presentes en HPEC. En negro los genes pertenecientes al núcleo, en gris genes presentes en el perfil de expresión diferencial que exhiben patrones de co-expresión junto con el núcleo.

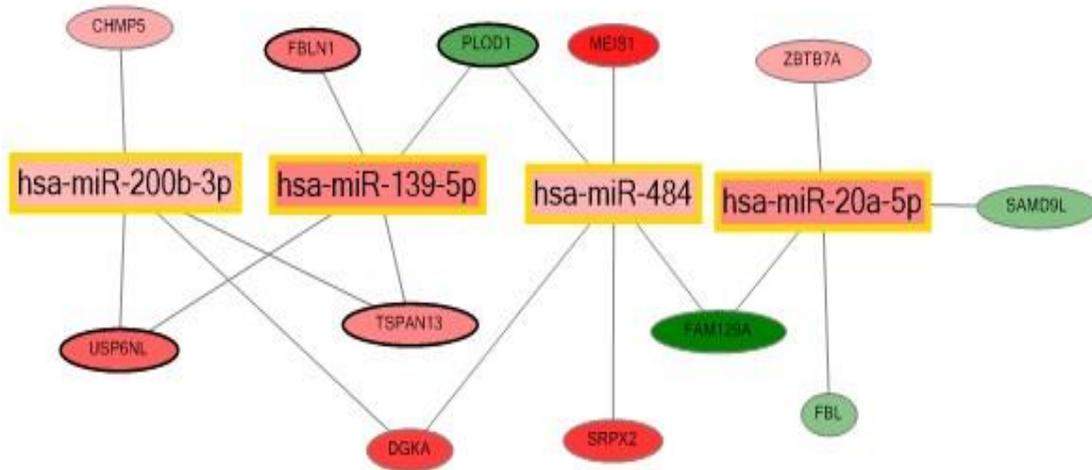


Figura 52. Red de co-expresión miRNA – mRNA

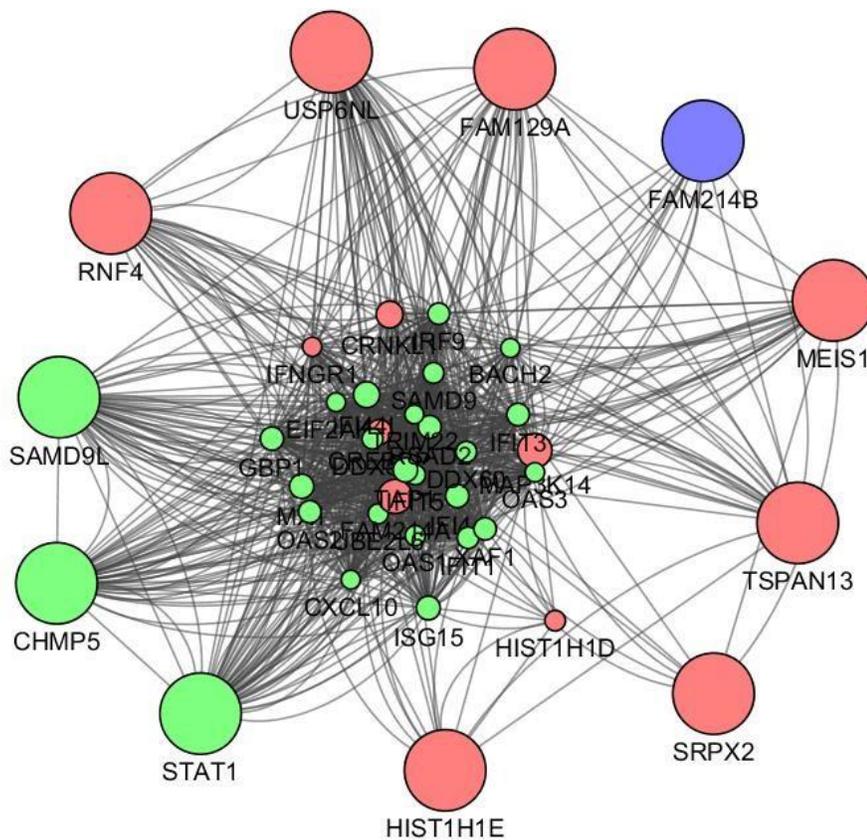


Figura 53. Módulo con mayor importancia dentro de la red de genes asociados al núcleo de la senescencia presentes en HPEC. Los colores agrupan por funciones similares a los genes.

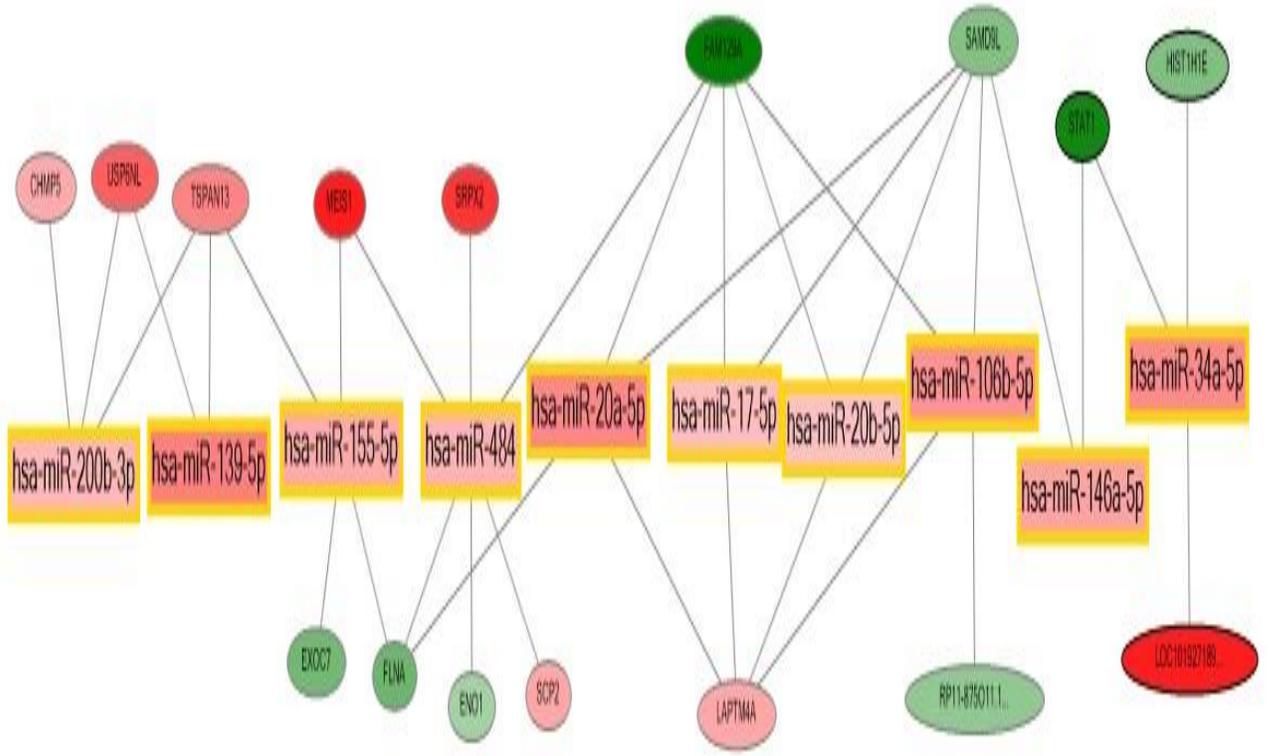


Figura 54. Red de competencia endógena (CeRNA). Interacciones mRNA – miRNA – circRNA. Óvalos superiores mRNA, rectángulos medios miRNA, Óvalos inferiores circRNA.

10. Discusión

Durante la senescencia celular se originan múltiples aberraciones en la expresión génica que se cree podrían colaborar en la patogénesis de diversas enfermedades crónico-degenerativas. Este fenómeno ha sido estudiado en múltiples tipos celulares, pero poco se conoce de los mecanismos transcripcionales que gobiernan estos procesos en células epiteliales de próstata.

En este trabajo se analizaron diversas alteraciones a nivel transcriptómico ocurridas durante la senescencia celular inducida por estrés oxidante en células epiteliales de próstata. Para analizar estas aberraciones transcriptómicas lo primero que se hizo fue corroborar que las células fueron inducidas a senescencia, para tal propósito se realizaron curvas de proliferación y determinación de la expresión de proteínas asociadas con la senescencia como p38 (respuesta a estímulos estresores), p53 (detención del ciclo celular), Laminina B1 (Componente de la envoltura nuclear), gamma-H2AX (Histona fosforilada en respuesta a la ruptura de la doble cadena del DNA) y GLB1 (aumento de la actividad lisosomal) por medio de Western blot. Una vez corroborada la inducción del estado senescente se utilizaron microarreglos para determinar el perfil de expresión diferencial de mRNA, lncRNA, circRNA y miRNA. Los resultados obtenidos muestran que alteraciones en los patrones de expresión de mRNA conducen a desregulaciones en vías de señalización como Nrf2, TGFbeta, VEGFA-VEGFR e IFN γ que podrían estar promoviendo procesos como la diferenciación celular, transición epitelio-mesénquima, migración celular, inflamación y angiogénesis mediada por prostaglandinas, alteraciones en el metabolismo de fármacos, alteraciones del citoesqueleto, síntesis de proteoglicanos, carcinogénesis, disminución de la respuesta inmunológica, aberraciones en el metabolismo y modificación de las proteínas. Estas modificaciones en los patrones de expresión génica podrían estar desencadenando procesos de dediferenciación – diferenciación, pues la expresión génica y proteica ya no son específicos de próstata, algo interesante es que parece ser que los patrones de expresión corresponden con células de músculo liso y lengua. Todas estas alteraciones podrían estar contribuyendo a la aparición de neoplasias

benignas y malignas, carcinoma y cáncer de próstata, además de colaborar en el inicio y la progresión de procesos tumorales y metastásicos.

Para tratar de entender un poco más los mecanismos y genes que contribuyen a la desregulación de los procesos arriba descritos se construyeron redes de interacción proteína – proteína y se extrajeron módulos funcionales. Un módulo funcional es un conjunto de proteínas con un alto grado de conexión. El módulo que se extrajo de la red de expresión diferencial de los mRNA sobre-expresados y sub-expresados arrojó 42 genes, esto quiere decir que esos genes interactúan entre ellos y que posiblemente sean los genes más importantes dentro de la red y del estado senescente debido a su elevada interconexión. Estos 42 genes están involucrados en procesos inmunológicos especialmente de señalización mediada por citocinas e interferón dirigidos principalmente por componentes de la región extracelular. Un hecho interesante de este módulo es la presencia y aumento en la expresión de genes asociados con resistencia anti-apoptótica como *Myd88* [59], *SRC* [60] y *CREB1* [61] lo que podría indicar que la célula senescente activa múltiples vías de resistencia anti-apoptótica y sobrevivencia. Haciendo una disección de la red en genes que aumentan y disminuyen su expresión se puede determinar mediante un análisis de enriquecimiento de vías la participación de los genes sobre-expresados en vías de señalización como Nrf2, se ha reportado que la sobre activación de esta vía podría contribuir con la iniciación de los tumores activando parcialmente la transición epitelio-mesenquimal [62], aunado a esto la sobre-activación de las vías TGF-B y VEGFA también podría estar contribuyendo con este fenómeno, pues se ha reportado que ambos elementos propician la angiogénesis [63]. Por otra parte, los genes sub-expresados están afectados procesos metabólicos relacionados con el metabolismo del folato, un hecho interesante es que el folato contribuye a la proliferación celular y disminución en su absorción o disponibilidad podría reforzar el estado senescente [64]. Otro proceso afectado por la disminución de la expresión génica es la señalización mediada por interferón, este proceso es necesario para reclutar células del sistema inmunológico y eliminar células dañadas, por lo que esto podría ser uno de los factores que contribuyan a la acumulación de células senescentes. La sobre-expresión de diversos genes está ocasionando un proceso

de diferenciación, las células epiteliales de próstata se podrían estar convirtiendo en células epidermales, esto se podría confirmar por la elevada presencia de PI3, una proteína elevada de la piel, este proceso de diferenciación podría ser el inicio de la tumoración pues también se acompaña de la activación de fenómenos de migración celular. La extracción de módulos funcionales de las redes de genes sobre-expresados y sub-expresados podría revelar dos fenómenos que controlarían y dirigirían la senescencia; El primero sería la resistencia anti-apoptótica, arriba se describió la presencia de genes que dotan de resistencia ante la muerte celular, en este módulo emergen nuevos genes que también tienen esa función, es el caso de *BMP4* que sobre activa las proteínas Bcl-xL y promueve la supervivencia [65], *EDN1* que inhibe la apoptosis en cáncer de próstata [66], *SERPINE1* activado por la sobreexpresión de TGF- β [67], *CTGF* que induce la expresión de proteínas antiapoptóticas [68] y *THBS1* que inhibe la liberación del citocromo c [69]. El segundo sería la disminución de la respuesta inmunológica, pues disminuye la expresión de elementos quimio atrayentes como *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL8*, *CXCL10*, *CXCL11*, *IL1B* e *IL6*, estas citocinas son capaces de atraer neutrófilos, linfocitos, macrófagos y células NK, pero al disminuir su expresión la célula senescente podría evadir a las células del sistema inmunológico. Aunque no solamente disminuye la capacidad quimioatrayente, pues también los receptores relacionados con la activación de la respuesta inmune como *TLR2*, *TLR3*, *ICAM1*, *CD40* y *CD86* se ven disminuidos, todos estos elementos en conjunto podrían estar colaborando con la acumulación de células senescentes, pero además estas aberraciones podrían estar ocasionadas directamente por la sobre-expresión de 6 miRNA (*hsa-miR-342-3p*, *hsa-miR-26a-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-1271-5p*, *hsa-miR-155-5p*, *hsa-miR27b-3p*, *hsa-miR-29a-3p*) que podrían estar regulando tanto a los elementos del módulo de genes sobre-expresados como los del sub-expresado.

Alteraciones en los patrones de expresión de miRNA impactan en el correcto funcionamiento de vías de señalización como TGF- β , ErbB, Hippo, MAPK, PI3K-Akt y Wnt, provocando desregulaciones en procesos celulares como: interacciones receptor - matriz extracelular, biosíntesis de ácidos grasos, adhesión focal, endocitosis y aumento de la capacidad de diferenciación. Estas perturbaciones

podrían estar ocasionando la activación de vías de señalización relacionadas con cáncer de próstata. La expresión aberrante de lncRNA está asociada casi a las mismas vías de señalización anteriormente expuestas, pero además hay un fenómeno interesante, disminuye la capacidad para absorber y transportar iones metálicos como hierro y zinc ya que una gran cantidad de transportadores de iones disminuye su expresión por regulación mediada por el lincRNA *RP11-499E18.1* que funciona como elemento trans [70]. Las afectaciones en el metabolismo del zinc tienen una gran repercusión en la salud de la próstata, pues es en este órgano glandular en donde se acumula la gran mayoría de este ion, disminución en su metabolismo y transporte está asociado con patologías de la próstata como cáncer, prostatitis e hiperplasia benigna [71]. El mismo *RP11-499E18.1* podría estar regulando diversos transportadores de Hierro y la expresión de Ferritina, lo que lleva a un aumento en las concentraciones de hierro que otorga a la célula senescente resistencia ante un tipo de muerte celular programada conocida como ferroptosis [72]. La función de los circRNA es poco entendida, pero se cree que su acumulación podría estar relacionada con la aparición de diversas enfermedades durante el envejecimiento, además se ha propuesto que estos transcritos son capaces de inhibir a los miRNA funcionando como esponjas [73]. En el DGE se encontró una notable disminución en la cantidad y expresión de este tipo de RNA, esto disminuye la expresión de numerosos genes asociados a rutas de señalización y metabólicas como la gluconeogénesis, glucolisis, beta-oxidación de ácidos grasos y metabolismo de otros ácidos grasos, impactando en el metabolismo energético de la célula. Esta disminución en cantidad y expresión podría correlacionarse con el aumento de la expresión de algunos miRNA que funcionan como inhibidores de los genes de dichas rutas afectadas, de esta manera no estarían cumpliendo su función como esponjas de miRNA lo que les otorgaría un papel importante durante la senescencia en el tejido epitelial de próstata.

Se han realizado diversas investigaciones para tratar de encontrar una firma transcriptómica asociada a la senescencia, existen dos reportes que tratan de cumplir con este cometido. En esta investigación se comparó el DGE obtenido para buscar coincidencias entre genes expresados en HPEC bajo SIPS y el núcleo

asociado a la senescencia, se obtuvieron 20 genes que coincidían. Lo siguiente fue realizar el análisis de enriquecimiento para tratar de inferir las funciones de este núcleo que al parecer tiene un alto grado de conservación a pesar de la gran heterogeneidad transcriptómica de la senescencia. Estos genes están involucrados en vías como PDGFB, EGF/EGFR y regulación de ERBB1. Es interesante qué otro proceso de muerte celular resulte dentro de las vías enriquecidas, en este caso es la necroptosis, que es un tipo de muerte celular que provoca inflamación, los mediadores de este proceso son CHMP5 y STAT1 ambos con actividad antiapoptótica [74, 75] por lo que la célula senescente también podría ser resistente a la necroptosis.

Mediante el análisis de redes se trató de inferir el comportamiento y función de este núcleo génico asociado a la senescencia presente en HPEC, por lo que se construyó una red de co-expresión junto con los otros genes diferencialmente expresados. Resulta interesante que los 20 genes compartan patrones de co-expresión además de co-expresarse con otros genes diferencialmente expresados en respuesta a la senescencia, esto podría indicar la existencia de un mecanismo de regulación a nivel transcripcional. La primera idea que surgió fue la regulación mediada por miRNA por lo que se construyó una red de interacción mRNA – miRNA revelando la interacción de 4 miRNA sobre-expresados con 12 genes del núcleo (hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-20a-5p). Para seguir investigando posibles mecanismos de regulación del núcleo génico se optó por separar y reducir los elementos de la red de co-expresión, extrayendo los módulos con mayor relevancia e interacción, lo que podría indicar cuales son las proteínas con mayor peso dentro de la red, el análisis arrojó la existencia de un módulo con bastantes interacciones protagonizado por 9 genes: *STAT1*, *CHMP5*, *SAM9DL*, *USP6NL*, *FAM129A*, *FAM214B*, *MES11*, *TSPAN13*, *SPRX2*, *HIST1H1E* al ser los elementos más importantes dentro de la red se propone que podrían ser utilizados como marcadores del estado senescente y potenciales dianas terapéuticas. Por último, para inferir el mecanismo de regulación al que están sometidos estos genes y obtener una mayor cantidad de biomarcadores del estado senescente se construyó una red de competencia endógena con interacciones mRNA – miRNA –

circRNA que más que mostrar un mecanismo de regulación pareciera que este mecanismo dejó de funcionar correctamente y estaría mediado por circRNA que abaten su expresión por lo que no pueden inhibir a sus miRNA blanco, ocasionando la expresión y desregulación de los 9 genes asociados al núcleo. Por lo que los circRNA *EXOC7*, *FLNA*, *ENO1*, *SCP2*, *LAPTM4A*, *RP11-875011.1* podrían ser biomarcadores del estado senescente.

11. Conclusión

El estado senescente genera aberraciones transcriptómicas que afectan diversas rutas metabólicas y de señalización, ocasionando la aparición de procesos biológicos relacionados con estados patológicos. En este trabajo proveemos información que asocia aberraciones en los patrones de expresión de mRNA, lncRNA, circRNA y miRNA con la aparición de patologías como hiperplasia benigna y cáncer de próstata. Estas alteraciones son mediadas por transcritos no codificantes que además pueden ser usados como biomarcadores de diagnóstico temprano o marcadores para identificar células senescentes. A pesar de estas alteraciones y de la elevada heterogeneidad transcriptómica de las CS, existe un núcleo de genes asociados a la senescencia lo que podría indicar un mecanismo de regulación maestro del estado senescente. Dicho mecanismo podría estar regulado por interacciones mRNA–miRNA y mRNA–miRNA–circRNA.

12. Perspectivas

El análisis de redes reveló la existencia de módulos funcionales con una alta expresión de proteínas antiapoptóticas, la evidencia sugiere que esta es una de las razones por las cuales se acumulan las CS en órganos y tejidos. Es por esta razón que la continuación de este trabajo se enfocará en buscar moléculas dirigidas contra las proteínas codificadas por estos genes de supervivencia buscando interferir con su actividad para de esta forma inducir apoptosis de manera selectiva a las células senescentes.

13. Referencias bibliográficas

- [1] López-Otín, C., Blasco, M., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217 doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039
- [2] Bianchi-Frias, D., Vakar-Lopez, F., Coleman, I., Plymate, S., Reed, M., & Nelson, P. (2010). The Effects of Aging on the Molecular and Cellular Composition of the Prostate Microenvironment. *Plos ONE*, 5(9), e12501. doi: 10.1371/journal.pone.0012501
- [3] Campisi, J. (2005). Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. *Cell*, 120(4), 513-522. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.003
- [4] Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614-636. doi: 10.1016/0014-4827(65)90211-9
- [5] Nelson, D., McBryan, T., Jeyapalan, J., Sedivy, J., & Adams, P. (2014). A comparison of oncogene-induced senescence and replicative senescence: implications for tumor suppression and aging. *AGE*, 36(3). doi: 10.1007/s11357-014-9637-0
- [6] Chang, B., Swift, M., Shen, M., Fang, J., Broude, E., & Roninson, I. (2001). Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 99(1), 389-394. doi: 10.1073/pnas.012602599
- [7] López-Diazguerrero, N., López-Araiza, H., Conde-Perezprina, J., Bucio, L., CárdenasAguayo, M., & Ventura, J. et al. (2006). Bcl-2 protects against oxidative stress while inducing premature senescence. *Free Radical Biology And Medicine*, 40(7), 1161-1169. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.11.002
- [8] Cavallaro, U., Castelli, V., Del Monte, U., & Soria, M. (2000). Phenotypic Alterations in Senescent Large-Vessel and Microvascular Endothelial Cells. *Molecular Cell Biology Research Communications*, 4(2), 117-121. doi: 10.1006/mcbr.2000.0263
- [9] Maréchal, A., & Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(9), a012716. doi:10.1101/cshperspect.a012716
- [10] Ben-Porath, I., & Weinberg, R. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*, 37(5), 961-976. doi: 10.1016/j.biocel.2004.10.013
- [11] González-Puertos VY, Maciel-Barón LÁ, Barajas-Gómez BA, López-Diazguerrero, NE, Königsberg M (2015) Participación del fenotipo secretor de las células senescentes en el desarrollo del cáncer, el envejecimiento y las enfermedades asociadas a la edad. *Gac Méd Mex*151:491-500.
- [12] Tchkonja, T., Zhu, Y., van Deursen, J., Campisi, J., & Kirkland, J. (2013). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *Journal Of Clinical Investigation*, 123(3), 966-972. doi: 10.1172/jci64098

- [13] Coppé, J., Desprez, P., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review Of Pathology: Mechanisms Of Disease*, 5(1), 99-118. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808102144>
- [14] Maciel-Barón, L., Morales-Rosales, S., Aquino-Cruz, A., Triana-Martínez, F., GalvánArzate, S., & Luna-López, A. et al. (2016). Senescence associated secretory phenotype profile from primary lung mice fibroblasts depends on the senescence induction stimuli. *AGE*, 38(1). <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-016-9886-1>
- [15] Kim, Y., Byun, H., Jee, B., Cho, H., Seo, Y., & Kim, Y. et al. (2013). Implications of timeseries gene expression profiles of replicative senescence. *Aging Cell*, 12(4), 622-634. <http://dx.doi.org/10.1111/accel.12087>
- [16] Prattichizzo, F., Bonafè, M., Olivieri, F., & Franceschi, C. (2016). Senescence associated macrophages and “macroph-aging”: are they pieces of the same puzzle?. *Aging*, 8(12), 3159-3160. <http://dx.doi.org/10.18632/aging.101133>
- [17] Raj, N., & Attardi, L. (2013). Tumor Suppression: p53 Alters Immune Surveillance to Restrain Liver Cancer. *Current Biology*, 23(12), R527-R530. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.076>
- [18] Davalos, A., Coppe, J., Campisi, J., & Desprez, P. (2010). Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer And Metastasis Reviews*, 29(2), 273-283. <http://dx.doi.org/10.1007/s10555-010-9220-9>
- [19] Serrano, M. (2014). Senescence Helps Regeneration. *Developmental Cell*, 31(6), 671-672. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2014.12.007>
- [20] Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M., & Di Giacomo, V. et al. (2013). Senescence Is a Developmental Mechanism that Contributes to Embryonic Growth and Patterning. *Cell*, 155(5), 1119-1130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.041>
- [21] Wang, W., Cai, G., & Chen, X. (2017). Cellular senescence, senescence-associated secretory phenotype, and chronic kidney disease. *Oncotarget*, 8(38). <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.17327>
- [22] Kirkland, J. (2013). Inflammation and Cellular Senescence: Potential Contribution to Chronic Diseases and Disabilities With Aging. *Public Policy & Aging Report*, 23(4), 12-15. <http://dx.doi.org/10.1093/ppar/23.4.12>
- [23] Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P., & Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 98(21), 12072-12077. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.211053698>
- [24] Chen, M., Lin, P., Wu, C., Chen, W., & Wu, C. (2013). IL-6 Expression Regulates Tumorigenicity and Correlates with Prognosis in Bladder Cancer. *Plos ONE*, 8(4), e61901. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061901>

- [25] Nguyen, D., Li, J., & Tewari, A. (2014). Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6). *BJU International*, 113(6), 986-992. <http://dx.doi.org/10.1111/bju.12452>
- [26] Revandkar, A., Perciato, M., Toso, A., Alajati, A., Chen, J., & Gerber, H. et al. (2016). Inhibition of Notch pathway arrests PTEN-deficient advanced prostate cancer by triggering p27-driven cellular senescence. *Nature Communications*, 7, 13719. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms13719>
- [27] Blute, M., Damaschke, N., Wagner, J., Yang, B., Gleave, M., & Fazli, L. et al. (2017). Persistence of senescent prostate cancer cells following prolonged neoadjuvant androgen deprivation therapy. *PLOS ONE*, 12(2), e0172048. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0172048>
- [28] Hermabessière, J., & Taillandier, J. (2002). Fisiología de la próstata. EMC - Urología, 34(1), 1-6. doi: 10.1016/s1761-3310(02)72340-2
- [29] A., L., Albanese, C., & C., O. (2011). The Potential Target Therapy of Prostate Cancer Stem Cells. *Prostate Cancer - From Bench To Bedside*. doi: 10.5772/30062
- [30] LONG, R., MORRISSEY, C., FITZPATRICK, J., & WATSON, R. (2005). Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clinical Science*, 108(1), 1-11. doi: 10.1042/cs20040241
- [31] Vital, P., Castro, P., Tsang, S., & Ittmann, M. (2014). The Senescence-Associated Secretory Phenotype Promotes Benign Prostatic Hyperplasia. *The American Journal Of Pathology*, 184(3), 721-731. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.11.015
- [32] Dang, T., & Liou, G. (2018). Macrophage Cytokines Enhance Cell Proliferation of Normal Prostate Epithelial Cells through Activation of ERK and Akt. *Scientific Reports*, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-26143-8
- [33] Taddei, M., Cavallini, L., Comito, G., Giannoni, E., Folini, M., & Marini, A. et al. (2014). Senescent stroma promotes prostate cancer progression: The role of miR-210. *Molecular Oncology*, 8(8), 1729-1746. doi: 10.1016/j.molonc.2014.07.009
- [34] Casamassimi, A., Federico, A., Rienzo, M., Esposito, S., & Ciccodicola, A. (2017). Transcriptome Profiling in Human Diseases: New Advances and Perspectives. *International Journal Of Molecular Sciences*, 18(8), 1652. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18081652>
- [35] Ross J. (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiological reviews*, 59(3),423–450.
- [36] Wu, X., & Brewer, G. (2012). The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene*, 500(1), 10–21. doi:10.1016/j.gene.2012.03.021
- [37] Jarroux, J., Morillon, A., & Pinskaya, M. (2017). History, Discovery, and Classification of lncRNAs. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, 1-46. doi: 10.1007/978-98110-5203-3_1

- [38] Bhat, S. A., Ahmad, S. M., Mumtaz, P. T., Malik, A. A., Dar, M. A., Urwat, U., ... Ganai, N. A. (2016). Long non-coding RNAs: Mechanism of action and functional utility. *Non-coding RNA research*, 1(1), 43–50. doi:10.1016/j.ncRNA.2016.11.002
- [39] Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., & Kim, Y. (2010). MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(11), 1231-1243. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.06.013
- [40] Hammond S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews*, 87, 3–14. doi:10.1016/j.addr.2015.05.001
- [41] Cai, Y., Yu, X., Hu, S., & Yu, J. (2009). A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 7(4), 147–154. doi:10.1016/S16720229(08)60044-3
- [42] Rapaport, F., Khanin, R., Liang, Y., Pirun, M., Krek, A., Zumbo, P., ... Betel, D. (2013). Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data. *Genome biology*, 14(9), R95. doi:10.1186/gb-2013-14-9-r95
- [43] Hung, J. H., Yang, T. H., Hu, Z., Weng, Z., & DeLisi, C. (2012). Gene set enrichment analysis: performance evaluation and usage guidelines. *Briefings in bioinformatics*, 13(3), 281–291. doi:10.1093/bib/bbr049
- [44] Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., ... Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*, 25(1), 25–29. doi:10.1038/75556
- [45] Serin, E. A., Nijveen, H., Hilhorst, H. W., & Ligterink, W. (2016). LeRNAing from Coexpression Networks: Possibilities and Challenges. *Frontiers in plant science*, 7, 444. doi:10.3389/fpls.2016.00444
- [46] Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., & Pandolfi, P. P. (2011). A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?. *Cell*, 146(3), 353–358. doi:10.1016/j.cell.2011.07.014
- [47] Hetzl, A., Favaro, W., Billis, A., Ferreira, U., & Cagnon, V. (2010). Prostatic diseases in the senescence: structural and proliferative features. *The Aging Male*, 13(2), 124-132. doi: 10.3109/13685531003586991
- [48] Montico, F., Hetzl, A., Cândido, E., Fávoro, W., & Cagnon, V. (2011). Hormonal therapy in the senescence: Prostatic microenvironment structure and adhesion molecules. *Micron*, 42(6), 642-655. doi: 10.1016/j.micron.2011.03.004
- [49] HeRNandez-Segura, A., de Jong, T. V., Melov, S., Guryev, V., Campisi, J., & Demaria, M. (2017). Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Current biology : CB*, 27(17), 2652–2660.e4. doi:10.1016/j.cub.2017.07.033
- [50] Wei, Z., Guo, H., Qin, J., Lu, S., Liu, Q., & Zhang, X. et al. (2019). Pan-senescence transcriptome analysis identified RRAD as a marker and negative regulator of cellular

senescence. *Free Radical Biology And Medicine*, 130, 267-277. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.457

- [51] Casella, G., Munk, R., Kim, K., Piao, Y., De, S., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2019). Transcriptome signature of cellular senescence. *Nucleic Acids Research*, 47(14), 72947305. doi: 10.1093/nar/gkz555
- [52] Zhu Y, Xiong K, Shi J, Cui Q, Xue L (2017) A potential role of microRNAs in protein accumulation in cellular senescence analyzed by bioinformatics. *PLOS ONE* 12(6): e0179034. doi:/10.1371/journal.pone.0179034
- [53] Kuleshov, M. V., Jones, M. R., Rouillard, A. D., Fernandez, N. F., Duan, Q., Wang, Z., ... Ma'ayan, A. (2016). Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic acids research*, 44(W1), W90–W97. doi:10.1093/nar/gkw377
- [54] Vlachos, Ioannis S., Konstantinos Zagganas, Maria D. Paraskevopoulou, Georgios Georgakilas, Dimitra Karagkouni, Thanasis Vergoulis, Theodore Dalamagas, and Artemis G. Hatzigeorgiou. "DIANA-miRPath v3. 0: deciphering microRNA function with experimental support." *Nucleic acids research* (2015): gkv403.
- [55] Warde-Farley, D., Donaldson, S. L., Comes, O., Zuberi, K., Badrawi, R., Chao, P., ... Morris, Q. (2010). The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic acids research*, 38(Web Server issue), W214–W220. doi:10.1093/nar/gkq537
- [56] von Mering, C., Huynen, M., Jaeggi, D., Schmidt, S., Bork, P., & Snel, B. (2003). STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic acids research*, 31(1), 258–261. doi:10.1093/nar/gkg034
- [57] Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., ... Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), 2498–2504. doi:10.1101/gr.1239303
- [58] Tadaka, S., & Kinoshita, K. (2016). NCMine: Core-peripheral based functional module detection using near-clique mining. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(22), 3454–3460. doi:10.1093/bioinformatics/btw488
- [59] Kfoury, A., Le Corf, K., El Sabeh, R., Journeaux, A., Badran, B., Hussein, N., ... Coste, I. (2013). MyD88 in DNA repair and cancer cell resistance to genotoxic drugs. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(13), 937–946. doi:10.1093/jnci/djt120
- [60] Vázquez-Franco, J., Reyes-Maldonado, E., Vela-Ojeda, J., Domínguez-López, M., & Lezama, R. (2012). Src, Akt, NF-κB, BCL-2 and c-IAP1 may be involved in an anti-apoptotic effect in patients with BCR-ABL positive and BCR-ABL negative acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research*, 36(7), 862-867. doi: 10.1016/j.leukres.2012.03.020

- [61] Wen, A. Y., Sakamoto, K. M., & Miller, L. S. (2010). The role of the transcription factor CREB in immune function. *JouRNAl of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(11), 6413–6419. doi:10.4049/jimmunol.1001829
- [62] Bocci, F., Tripathi, S. C., Vilchez Mercedes, S. A., George, J. T., Casabar, J. P., Wong, P. K., ... Jolly, M. K. (2019). NRF2 activates a partial epithelial-mesenchymal transition and is maximally present in a hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 11(6), 251–263. doi:10.1093/intbio/zyz021
- [63] Nakagawa, T., Li, J., Garcia, G., Mu, W., Piek, E., & Böttinger, E. et al. (2004). TGF induces proangiogenic and antiangiogenic factors via parallel but distinct Smad pathways. *Kidney InteRNAtional*, 66(2), 605-613. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00780.x
- [64] Hwang, S., Kang, Y., Sung, B., Jang, J., Hwang, N., & Oh, H. et al. (2017). Folic acid is necessary for proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts. *JouRNAl Of Cellular Physiology*, 233(2), 736-747. doi: 10.1002/jcp.25989
- [65] Yamamoto, H., Kurachi, M., Naruse, M., Shibasaki, K., & Ishizaki, Y. (2018). BMP4 signaling in NPCs upregulates Bcl-xL to promote their survival in the presence of FGF-2. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 496(2), 588-593. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.090
- [66] Nelson, J. B., Udan, M. S., Guruli, G., & Pflug, B. R. (2005). Endothelin-1 inhibits apoptosis in prostate cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 7(7), 631–637. doi:10.1593/neo.04787
- [67] Higgins, S. P., Samarakoon, R., Higgins, C. E., Freytag, J., Wilkins-Port, C. E., & Higgins, P. J. (2009). TGF- β 1-Induced Expression of the Anti-Apoptotic PAI-1 Protein Requires EGFR Signaling. *Cell communication insights*, 2, 1–11. doi:10.4137/cci.s2775
- [68] Yin, D., Chen, W., O'Kelly, J., Lu, D., Ham, M., Doan, N. B., ... Koeffler, H. P. (2010). Connective tissue growth factor associated with oncogenic activities and drug resistance in glioblastoma multiforme. *InteRNAtional jouRNAl of cancer*, 127(10), 2257–2267. doi:10.1002/ijc.25257
- [69] Cunha, D. A., Cito, M., Carlsson, P. O., Vanderwinden, J. M., Molkenin, J. D., Bugliani, M., ... Cnop, M. (2016). Thrombospondin 1 protects pancreatic β -cells from lipotoxicity via the PERK-NRF2 pathway. *Cell death and differentiation*, 23(12), 1995–2006. doi:10.1038/cdd.2016.89

- [70] Qu, X., Dang, X., Wang, W., Li, Y., Xu, D., Shang, D., & Chang, Y. (2018). Long Noncoding RNAs and mRNA Regulation in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Mediators of inflammation*, 2018, 7501851. doi:10.1155/2018/7501851
- [71] Christudoss, P., Selvakumar, R., Fleming, J. J., & Gopalakrishnan, G. (2011). Zinc status of patients with benign prostatic hyperplasia and prostate carcinoma. *Indian journal of urology: IJU : journal of the Urological Society of India*, 27(1), 14– 18. doi:10.4103/09701591.78405
- [72] Masaldan, S., Clatworthy, S., Gamell, C., Meggyesy, P. M., Rigopoulos, A. T., Haupt, S., ... Cater, M. A. (2018). Iron accumulation in senescent cells is coupled with impaired ferritinophagy and inhibition of ferroptosis. *Redox biology*, 14, 100–115. doi: 10.1016/j.redox.2017.08.015
- [73] Yu, C. Y., & Kuo, H. C. (2019). The emerging roles and functions of circular RNAs and their generation. *Journal of biomedical science*, 26(1), 29. doi:10.1186/s12929-019-0523z
- [74] Wang, H., Liu, J., Wang, F., Chen, M., Xiao, Z., & OuYang, R. et al. (2013). The role of charged multivesicular body protein 5 in programmed cell death in leukemic cells. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 45(5), 383-390. doi: 10.1093/abbs/gmt028
- [75] Stephanou, A., & Latchman, D. S. (2003). STAT-1: a novel regulator of apoptosis. *International journal of experimental pathology*, 84(6), 239–244. doi:10.1111/j.09599673.2003.00363.x



Perfil transcriptómico de células epiteliales primarias de próstata humana inducidas a senescencia por estrés (SIPS)

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 29 del mes de noviembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
- DRA. MARIA CRISTINA GONZALEZ TORRES
- DR. HECTOR FERNANDO SERRANO
- DRA. ADRIANA ALARCON AGUILAR

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: KEVIN SAMUEL OLASCOAGA DEL ANGEL

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

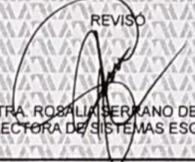
Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



KEVIN SAMUEL OLASCOAGA DEL ANGEL
ALUMNO

REVISÓ



MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



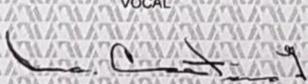
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA



DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

VOCAL



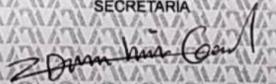
DRA. MARIA CRISTINA GONZALEZ TORRES

VOCAL



DR. HECTOR FERNANDO SERRANO

SECRETARIA



DRA. ADRIANA ALARCON AGUILAR