

UNIVERSIDAD DE OVIEDO



Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular

**SISTEMAS DE CONTROL DE CALIDAD CELULAR DURANTE LA
DIFERENCIACION DE CELULAS MADRE EMBRIONARIAS P19 Y
PROGENITORAS MIOGENICAS C2C12**

Autor: Juan Carlos Bermejo Millo

2022/2023



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Sistemas de control de calidad celular durante la diferenciación de las células madre embrionarias P19 y progenitoras miogénicas C2C12	Inglés: Cell quality control systems during differentiation of P19 embryonic stem cells and C2C12 myogenic progenitors
2.- Autor	
Nombre: Juan Carlos Bermejo Millo	
Programa de Doctorado: Biología Molecular y celular	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

RESUMEN (en español)

Aunque el uso de células madre como terapia está en aumento, hoy en día siguen existiendo numerosas incógnitas que deben ser descifradas. Comprender los mecanismos celulares que son determinantes en la regulación de la supervivencia, determinación y diferenciación de las células madre, así como la posibilidad de reemplazar células afectadas por una enfermedad o envejecimiento supondrían una revolución de la medicina regenerativa. Por ello, en esta tesis doctoral hemos centrado nuestros estudios en comprender la relevancia de los mecanismos de control de calidad celular tanto para el mantenimiento de la troncalidad como para la diferenciación de células madre en distintos tipos de células madre murinas que presentan diferente potencialidad para la generación de distintos linajes celulares. Se utilizaron células madre embrionarias P19 como modelo experimental de células madre pluripotentes y células progenitoras miogénicas C2C12 como modelo de células madre multipotentes. En la primera parte de nuestro trabajo estudiamos los mecanismos de control de calidad celular para el mantenimiento, diferenciación y resistencia a la muerte celular de células madre P19 en su estado indiferenciado (P19-CM) y tras la diferenciación temprana utilizando ácido retinoico (P19-CD). Este trabajo reveló que la pluripotencialidad de las P19-CM se correlaciona con una elevada protección antioxidante, una desregulación de la maquinaria apoptótica y una mayor activación de los sistemas proteolíticos, manteniendo la homeostasis proteica y celular y aumentando el umbral para la activación de la muerte celular, lo que, contribuye a preservar la calidad de las células madre embrionarias. Por otra parte, la diferenciación de las P19-CM causó alteraciones en los parámetros implicados en la supervivencia celular y la homeostasis de las proteínas, incluido el sistema redox, la respuesta a proteínas mal plegadas, los sistemas lisosomal y de ubiquitina-proteasoma, y las vías de señalización que controlan el crecimiento celular. Además, nuestros hallazgos identifican roles críticos para la vía PI3K-AKT-MTOR, así como la regulación del flujo autofágico y la apoptosis en el mantenimiento de la pluripotencialidad y el potencial de diferenciación de las P19-CM. Posteriormente, estudiamos la importancia de los mecanismos de control de calidad celular en el mantenimiento y diferenciación de células madre adultas musculares senescentes y evaluamos el potencial terapéutico de la melatonina frente a las alteraciones celulares inducidas por la senescencia. Mediante el uso de células madre adultas C2C12, evaluamos los sistemas de control de calidad celular en mioblastos C2C12 jóvenes (C2C12-J), los cuales presentan menos de 65 ciclos de duplicación y en mioblastos C2C12 senescentes (C2C12-S), que exhibían senescencia al presentar más de 65 ciclos de duplicación, tras ser tratados con distintas concentraciones de melatonina (100 μ M, 1 μ M y 1 nM) durante 72 horas y después de su diferenciación a miotubos. Este trabajo mostró que el tratamiento con melatonina a una concentración 1 nM regula los sistemas de control de calidad celular, al aumentar la respuesta a proteínas mal plegadas y la autofagia durante la diferenciación de mioblastos C2C12 senescentes. La acción de la melatonina sobre estos mecanismos repercutió determinantemente en la preservación de la calidad celular, al minimizar los daños celulares, aumentar la viabilidad celular y reducir la muerte celular. Nuestro trabajo también mostró que la regulación de los sistemas de control de calidad celular inducida por la melatonina permitió



recuperar el programa miogénico perdido durante la senescencia. Cabe concluir que, la diferenciación de las células P19 y C2C12 depende del correcto funcionamiento y mantenimiento de los sistemas de control de calidad celular. Y que la capacidad de la melatonina de reprogramar estas vías celulares supone un gran hallazgo y crea un nuevo desafío futuro en la medicina regenerativa.

RESUMEN (en Inglés)

Although the use of stem cells as therapy is on the rise, today there are still many unknowns that need to be unraveled. Understanding the cellular mechanisms that are determinant in the regulation of survival, determination and differentiation of stem cells, as well as the possibility of replacing cells affected by disease or aging would mean a revolution in regenerative medicine. For this reason, in this doctoral thesis we have focused our studies on understanding the relevance of cell quality control mechanisms both for the maintenance of stem cells and for the differentiation of stem cells in different types of murine stem cells that present different potential for the generation of different cell lineages. P19 embryonic stem cells were used as the experimental pluripotent stem cell model and C2C12 myogenic progenitor cells as the multipotent stem cell model. In the first part of our work, we studied the mechanisms of cell quality control for the maintenance, differentiation, and resistance to cell death of P19 stem cells in their undifferentiated state (P19-CM) and after early differentiation using retinoic acid (P19-CD). This work revealed that the pluripotency of the P19-CM is correlated with a high antioxidant protection, a deregulation of the apoptotic machinery and a greater activation of the proteolytic systems, maintaining protein and cellular homeostasis and increasing the threshold for the activation of death. cell, which contributes to preserving the quality of embryonic stem cells. Furthermore, P19-CM differentiation caused alterations in parameters involved in cell survival and protein homeostasis, including the redox system, the response to misfolded proteins, the lysosomal and ubiquitin-proteasome systems, and signaling pathways that control cell growth. Furthermore, our findings identify critical roles for the PI3K-AKT-MTOR pathway, as well as the regulation of autophagic flux and apoptosis in maintaining the pluripotency and differentiation potential of P19-CMs. Subsequently, we studied the importance of cellular quality control mechanisms in the maintenance and differentiation of senescent muscle adult stem cells and evaluated the therapeutic potential of melatonin against cell alterations induced by senescence. Using adult C2C12 stem cells, we evaluated cell quality control systems in young C2C12 myoblasts (C2C12-J), which exhibited less than 65 doubling cycles, and in senescent C2C12 myoblasts (C2C12-S), which exhibited senescence. when presenting more than 65 duplication cycles, after being treated with different concentrations of melatonin (100 μ M, 1 μ M and 1 nM) for 72 hours and after differentiation into myotubes. This work showed that treatment with melatonin at a 1 nM concentration regulates cellular quality control systems, by increasing the response to misfolded proteins and autophagy during the differentiation of senescent C2C12 myoblasts. The action of melatonin on these mechanisms had a decisive impact on the preservation of cell quality, by minimizing cell damage, increasing cell viability and reducing cell death. Our work also showed that the regulation of cell quality control systems induced by melatonin made it possible to recover the myogenic program lost during senescence. It can be concluded that the differentiation of P19 and C2C12 cells depends on the correct functioning and maintenance of the cell quality control systems. And that the ability of melatonin to reprogram these cellular pathways is a great discovery and creates a new future challenge in regenerative medicine.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN _____

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de un contrato predoctoral de formación en investigación en salud por parte del Instituto de Salud Carlos III, FI18/00149 y a los proyectos de investigación PI17/02009, PI21/01596 y IDI/2021/000033

ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$: Potencial de membrana mitocondrial	CMA: Células madre adultas
nM: Nanomolar	CME: Células madre embrionarias
μ M: Micromolar	CMHs: Células madre hematopoyéticas
AAT: Actividad antioxidante total	CMMs: Células madre mesenquimales
ABTS: 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)	CPAM: Células progenitoras adultas multipotentes
ADN: Ácido desoxirribonucleico	CMS: Células madre somáticas
ADP: Adenosin difosfato	DMSO: Sulfóxido de dimetilo
AKT: Proteína quinasa B	DP: Duplicación de población
AMP: Adenosin monofosfato	DRAM: Modulador de autofagia regulado por daño
AR: Ácido retinoico	DRP1: Proteína similar a la dinamina 1
ARN: Ácido Ribonucleico	DUB: Enzimas desubiquitinizantes
ATF6 α : Factor de transcripción activador 6 alfa (En inglés, Activating transcription factor 6)	ECC: Células de carcinoma embrionario (En inglés, <i>Embryonic carcinoma cells</i>)
ATG: Autofagia relacionada con proteínas	EGC: Células germinales embrionarias (En inglés, <i>Embryonic germ cells</i>)
<i>Atg</i> : Genes relacionados con la autofagia	EIF2 α : Factor de iniciación eucariótico 2 alfa
ATP: Trifosfato de adenosina	ERAD: Complejo de degradación asociado al retículo endoplásmico
BCL-2: protooncogén Bcl-2 (En inglés, <i>B-cell lymphoma 2</i>)	ERN: Especies reactivas de nitrógeno
Ca ²⁺ : Calcio	FADH ₂ : Flavin adenin dinucleotido
C2C12-J: Células C2C12 Jóvenes	FICT: Anexina V-isotiocianato de fluoresceína
C2C12-S: Células C2C12 Senescentes	FIS1: Proteína de fisión mitocondrial 1
CAT: Catalasa	
CHOP: Proteína homologa C/EBP	

GSSG: Glutati3n oxidado

GSH-Px: Glutati3n peroxidasa

GSH-R: Glutati3n reductasa

GSH: Glutati3n reducido

GRP78/BIP: Prote3na regulada por glucosa 78/ Prote3na inmunoglobulina de uni3n (En ingl3s, *Glucose-regulated protein 94/ Binding immunoglobulin protein*)

GRP94: Prote3na regulada por glucosa 94(En ingl3s, *Glucose-regulated protein 94*)

H₂O₂: Per3xido de hidrogeno

HBBS: Soluci3n salina equilibrada de Hanks

HRP: Peroxidasa de rabano

Hsc70: Prote3na af3n al choque t3rmico 70 kDa. Chaperona citosol3ca (En ingl3s, *Heat shock-cognate protein 70 kDa*)

4-HNE: 4-hidroxi-2-nonenal

iPSC: C3lulas madre pluripotentes inducidas

IRE1 α : Enzima 1 alfa que requiere inositol (En ingl3s, *Inositol-requiring enzyme 1 alpha*)

KFERQ: Secuencia de amino3cidos espec3fica (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln)

LAMP2A: Lisosoma asociado a prote3na de membrana tipo 2A (En ingl3s, *Lysosome-associated membrane protein 2*)

LC3: Prote3na de cadena ligera 3 asociada a microt3bulos (En ingl3s, *Microtubule associated protein 1 Light*)

LPO: Lipoperoxidaci3n

MCI: Masa celular interna

Melatonina: N-acetil-5metoxitriptamina:

NADH: Nicotidamina adenina dinucleotida deshidrogenasa

MDA: Malondialdehido

MET: Microscopia electr3nica de transmisi3n

Mfn1: Mitofusina 1

Mfn2: Mitofusina 2

Miotubos C2C12-J: Miotubos C2C12 j3venes

Miotubos C2C12-S: Miotubos C2C12 Senescentes

mTOR: Diana de rapamicina en mam3feros (En ingl3s, *mammalian Target of Rapamycin*)

NANOG: Prote3na NANOG homebox (En ingl3s, Homeobox protein NANOG (hNanog))

.NO: 3xido n3trico

NOS 2: 3xido n3trico sintasa 2

NRF2: Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (En ingl3s, *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

O ₂ : Oxígeno	ROO [•] -: Radical peróxido
O ₂ ^{-•} : Superóxido	ROS: Especies reactivas de oxígeno
•OH: Radical hidroxilo	SA-β-Gal: Enzima beta galactosidasa
OCT4: Factor de transcripción de unión a octamero 4 (En inglés, <i>octamer-binding transcription factor 4</i>)	SASP: Fenotipo secretor asociado a la senescencia
OPA1: Atrofia óptica tipo1 (En inglés, <i>Optic atrophy 1</i>)	SC: Senescencia Celular
OXPPOS: Fosforilación oxidativa	SHC1-1/p66 SHC: Proteína transformante C1 que contiene el dominio de homología src 2, isoforma de 66 kDa
P19-CM: Células madre P19	SOD: Superóxido dismutasa
P19-CD: Células P19 diferenciadas con ácido retinoico	SOD1: Superóxido dismutasa citosólica
PBS: Tampón fosfato salino	SOD2: Superóxido dismutasa mitocondrial
PCr: Fosfocreatina	SOD3: Superóxido dismutasa extracelular
PDI: Proteína disulfuro isomerasa (En inglés, <i>Protein disulfide isomerase</i>)	SOX2: Región determinante del sexo Y-box2 (En inglés, <i>SRY-Box transcription factor 2</i>)
PERK: Proteína tipo quinasa activada por ARN quinasa del retículo (En inglés, <i>Protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase</i>)	SPTAN1: Alfa espectrina no eritrocítica 1 (En inglés, <i>Spectrin alpha chain</i>)
PI3K: Fosfoinositol 3 quinasa	SR: Senescencia replicativa
PUMA: Modulador de apoptosis regulado al alza por p53 (En inglés, <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>)	SRB: Sulforhodamina B
P62/SQSTM1: proteína de unión a ubiquitina p62 / sequestosoma 1	TD: Tiempo de duplicación
P70S6: Proteína ribosómica S6 quinasa beta 1(En inglés, <i>Ribosomal protein S6 kinase beta-1</i>)	TROMA 1: Marcador trofoectodérmico KRT8/citoqueratina 8
RE: Retículo endoplásmico	UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	6
RENOVACIÓN Y REPARACIÓN TISULAR	6
HISTORIA DE LA INVESTIGACIÓN CON CELULAS MADRE	8
CARACTERISTICAS Y CLASIFICACION DE LAS CELULAS MADRE	10
CELULAS MADRE EMBRIONARIAS PLURIPOTENTES	14
Células de carcinoma embrionario P19	16
CELULAS MADRE ADULTAS	17
Células madre adultas C2C12	20
MECANISMOS DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS CELULAS MADRE	21
Función mitocondrial	21
Metabolismo Redox	25
Sistemas de control de calidad de proteínas	29
OBJETIVOS	42
MATERIAL Y MÉTODOS	44
CULTIVO CELULAR, DIFERENCIACIÓN Y TRATAMIENTO	44
Células P19	44
Células C2C12	44
Cinética del crecimiento celular	45
Tratamiento con melatonina	45
ANÁLISIS DEL COMPARTIMENTO LISOSOMAL	46
DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO	46
DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO	46
DEFENSA ANTIOXIDANTE CELULAR	47
Actividad antioxidante total	47
Actividad de la Catalasa	47
Actividad de la superóxido dismutasa	47

Actividad del glutatión reducido y oxidado.....	47
DAÑO OXIDATIVO.....	48
Daño oxidativo de proteínas	48
Daño oxidativo de lípidos.....	48
ENSAYO DE CÉLULAS VIVAS/MUERTAS	48
INMUNOENSAYO POR WESTERN BLOT	48
ACTIVIDADES DE LAS CASPASAS	50
ACTIVIDAD DEL PROTEASOMA 20S.....	50
ACTIVIDAD DE LA CATEPSINA B Y CATEPSINA D.....	51
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	51
AISLAMIENTO DE EXTRACTOS MITOCONDRIALES	52
DETERMINACIÓN DEL FLUJO AUTOFÁGICO	52
APOPTOSIS.....	53
TRANSFECCIÓN CELULAR.....	53
ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR.....	54
CICLO CELULAR	54
MEDICIÓN DEL NIVEL DE CALCIO MITOCONDRIAL	55
POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_M$)	55
MEDICIÓN DE ATP.....	55
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
DISEÑO EXPERIMENTAL DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS P19.....	57
DISEÑO EXPERIMENTAL DE CÉLULAS MADRE ADULTAS C2C12	58
RESULTADOS	60
Las células madre P19 presentan una fuerte respuesta antioxidante que las protege frente a las agresiones oxidativas	60
Las células madre P19 exhiben alteraciones en la maquinaria apoptótica	64
La diferenciación de las P19-CM activa la respuesta a proteínas mal plegadas y se despliegan sistemas de degradación de proteínas	66

La diferenciación de las células madre P19 provoca una remodelación de los compartimentos lisosomales y activa la vía AKT/MTOR	68
Las células madre P19 presentan un mayor flujo autofágico que las P19 diferenciadas con ácido retinoico	71
La activación de la autofagia en las células madre P19 contribuye a mantener una adecuada calidad mitocondrial	74
La señalización de PI3K, la autofagia y la apoptosis son necesarias para el mantenimiento de la troncalidad y del potencial de diferenciación de las células P19	76
Las células C2C12 entran en senescencia pasados los 65 ciclos de duplicación.	80
El tratamiento de mioblastos C2C12 con melatonina produce efectos ambivalentes a nivel proliferativo y dependientes de la concentración	81
La melatonina modifica la progresión del ciclo celular de los mioblastos C2C12... ..	83
La melatonina aumenta la concentración de calcio mitocondrial en mioblastos C2C12.....	84
La melatonina no altera el potencial de membrana mitocondrial de las células C2C12.....	85
El tratamiento con melatonina aumenta el flujo autofágico en los mioblastos C2C12 senescentes.....	86
El tratamiento con melatonina aumenta la viabilidad de los mioblastos C2C12 senescentes.....	87
La melatonina altera la expresión de los marcadores de diferenciación miogénica	88
La melatonina recupera la capacidad de diferenciación de las células C2C12 senescentes.....	92
DISCUSIÓN	99
CONCLUSIONES	122
BIBLIOGRAFÍA	124

INTRODUCCIÓN

RENOVACIÓN Y REPARACIÓN TISULAR

La necesidad de renovar, reemplazar o regenerar tejidos dañados está aumentando a lo largo de las últimas décadas debido al aumento en la esperanza de vida, al incremento de enfermedades relacionadas con el envejecimiento y al incremento de otras enfermedades como tumores, traumatismos y defectos congénitos que causan una pérdida de la integridad y función tisular. ¿Pero en que consiste exactamente la regeneración tisular? Para la reparación de un tejido lesionado es necesario reemplazar las células dañadas o muertas por células sanas y esto puede realizarse mediante dos fenómenos o procesos: la cicatrización, en la que se sustituye el tejido lesionado por estroma de tejido conjuntivo y que conlleva una pérdida de función y, la regeneración. La regeneración se refiere a la proliferación y diferenciación de células con el fin de reemplazar las células perdidas o lesionadas por células del mismo tipo. Para entender de forma clara y sencilla este término haremos un pequeño recorrido por la biología de dicho proceso.

La estructura definitiva del cuerpo de un ser vivo puede ser muy compleja y se produce por medio de un repertorio limitado de actividades celulares. Durante el desarrollo embrionario, las células crecen, se dividen y mueren, tienen la capacidad de formar adherencias mecánicas y utilizan energía que les permite realizar sus funciones o propósitos. Además, poseen la capacidad de diferenciarse mediante la activación o la inactivación de proteínas específicas, producen señales moleculares que influyen sobre células vecinas y responden a las señales enviadas por ellas, recuerdan los efectos de las señales recibidas con anterioridad y, se especializan de forma progresiva de acuerdo con las características que adoptan. En la actualidad, se conoce gran parte del proceso, concluyendo que estas mismas actividades que se producen durante el desarrollo embrionario siguen en funcionamiento en el organismo adulto, es decir, se producen nuevas células de forma constante de acuerdo con patrones precisos y controlados.

Los tejidos son organizaciones estructuradas resultado de una combinación de muchos tipos celulares y que además deben conservar tales diferencias mientras coexistan en un mismo ambiente. Además, como se ha nombrado anteriormente, en casi todos los tejidos adultos las células mueren y se renuevan de forma permanente. Durante este proceso de reposición y renovación de células siempre se debe

conservar la organización y estabilidad estructural del tejido. Para ello, es necesario la presencia de tres factores específicos:

- **Comunicación celular:** Cada célula especializada controla su entorno en busca de señales provenientes de otras células adaptando su comportamiento y, asegurando así la producción y supervivencia de células nuevas.
- 1. **Adhesión intercelular selectiva:** Los distintos tipos celulares, que poseen cadherinas y otras moléculas de adhesión en sus membranas plasmáticas, tienden a unirse con otras células del mismo tipo de forma selectiva por medio de uniones homófilas. Pueden presentar también adherencias selectivas con otros tipos celulares o componentes específicos de la matriz extracelular impidiendo así la combinación caótica de los diferentes tipos celulares que componen un tejido.
- 2. **Memoria celular:** Los patrones especializados de expresión de genes se mantienen estables de tal manera que las células preservan su naturaleza específica de forma autónoma y la transmiten a su descendencia.

Las células madre son células indiferenciadas con velocidades y patrones de recambio diferentes. Están presentes en las etapas embrionaria, fetal y adulta de la vida, como ejemplo, se encuentran las células nerviosas y cardíacas, las cuales duran toda la vida del individuo sin ser sustituidas, y en el otro extremo, se encuentran las células que revisten el intestino, las cuales son reemplazadas entre cada dos y cuatro días. Durante la etapa postnatal y adulta de la vida, las células madre se encuentran en órganos ya diferenciados y son fundamentales para la renovación normal y para la reparación tras una lesión. Nuestra vida depende de estos procesos de renovación. Un organismo adulto normal y sano posee mecanismos de control que mantienen el equilibrio entre la producción y la pérdida celular. Un ejemplo de la pérdida de dicho control está presente en el cáncer, el cual se origina a partir de la modificación de estos mecanismos de control generando una proliferación excesiva de células en los tejidos con capacidad de autorenovación.

HISTORIA DE LA INVESTIGACIÓN CON CELULAS MADRE

El término “células madre” se utilizó a principios del siglo XX por Ernst Haeckel que reunió conceptos de filogenia y ontogenia para describir el *stammzelle* (célula madre), un concepto evolutivo para una célula primordial que se desarrolla en todas las células y organismos multicelulares. Poco después Theodor Boveri y Valentin Haecker, describieron los rasgos hereditarios de las células germinales (espermatogonias y ovocitos), desarrollaron el término pluripotencia (la capacidad de convertirse en células adultas de distintos tipos) y establecieron las características presentes de una célula madre como autorrenovación y diferenciación en células somáticas (adultas) (Maehle, 2011). En 1917, Artur Pappenheim presentó la noción contemporánea del término célula madre al describir un postulado para un origen celular común que podría producir tanto glóbulos rojos como blancos (Pappenheim, 1917). Cohnheim y Pappenheim también conceptualizaron la idea de las células madre en la formación de tumores y leucemia (Cohnheim, 1907). Tres décadas después se demostró la primera evidencia de autorrenovación de una sola célula mediante la capacidad de las células cancerosas de leucemia para transmitir el cáncer desde una sola célula (Furth, 1937).

En 1961, Till y Ernest McCulloch demostraron que la teoría de las células madre era correcta y describieron la existencia de células madre hematopoyéticas (CMHs). Gran parte de esta investigación continuó 50 años después gracias al propio McCulloch. Dos décadas más tarde, en 1981, se realizó el primer trabajo pionero que implicó a las células madre pluripotentes, cuando se consiguió con éxito el aislamiento y cultivo de células madre embrionarias (CME) de la masa celular interna del blastocisto (preembriones) por parte de científicos británicos y estadounidenses (Evans & Kaufman, 1981; G. R. Martin, 1981)

Con todo un movimiento científico dedicado al estudio de la transición de células embrionarias a somáticas, incluida la capacidad de autorrenovación y el potencial de diferenciación de éstas fuera del embrión en desarrollo, no fue hasta 12 años después, en 1993, que científicos canadienses lograron la prueba más difícil y esencial de la autorrenovación y la pluripotencia de las CME, generar ratones completamente vivos a partir de ellas (Nagy, Rossant, Nagy, Abramow-Newerly, & Roder, 1993). Poco tiempo después, en 1998, el científico estadounidense Dr. James Thomson describió la forma de aislar CME humanas, lo que reveló la posibilidad de encontrar una célula madre pluripotente como fuente de nuevos órganos (Thomson et al., 1998). Sin embargo, las polémicas surgidas entonces sobre las técnicas de clonación humana y la destrucción de embriones humanos no lograron involucrar

apropiadamente al público en general, lo que resultó en políticas limitantes en la investigación con CME.

Esa posición se hizo insostenible, ya que poco después una serie de descubrimientos primordiales alteró para siempre el debate sobre las CME y redirigió la comprensión del estado celular somático pluripotente. En 2006, el investigador japonés Dr. Shinya Yamanaka descubrió que las células somáticas podrían volver a una forma pluripotente a través de la reexpresión de genes embrionarios maestros cuya expresión queda suprimida en el estado somático (Takahashi et al., 2007). A partir de este momento se estableció un nuevo concepto, el de células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Un año después, el investigador Dr. Francés y sus colaboradores demostraron que una célula pluripotente también podría ser producida por trasplante nuclear de células somáticas en blastocistos (French et al., 2008). El descubrimiento de que las CME se podían aislar sin destruir el embrión (Chung et al., 2008) erosionó, aún más, cualquier ápice de argumento de la posición anti-células madre. Por ello, todos estos hallazgos ofrecieron la oportunidad de producir CME evitando las objeciones éticas y el rechazo inmunológico al utilizar las propias células del receptor.

Aunque la investigación con células madre se encuentra en tasas de crecimiento, aún existen brechas significativas en nuestra comprensión sobre el funcionamiento de las células madre y su relevancia para el desarrollo de nuevas terapias celulares y de medicina regenerativa.

La capacidad de cultivar células se originó hace 60 años y únicamente a partir de células cancerosas es que se lograron establecer líneas celulares inmortales (Scherer, Syverton, & Gey, 1953). Sin embargo, en 1960, el Dr. Isaac Harary y la Dra. Barbara Farley cultivaron por primera vez cardiomiocitos de ratas en los Estados Unidos (Harary & Farley, 1960) y 35 años después surgió la idea de inyectar cardiomiocitos en el corazón (Soonpaa, Koh, Klug, & Field, 1994) con la intención de proporcionar un beneficio funcional después de un infarto de miocardio.

Con el tiempo aparecieron nuevos resultados de investigación que mostraban que las células estromales mesenquimales de la médula ósea poseían varias de las propiedades de las células madre mesenquimales multipotentes. Así, científicos italianos y japoneses demostraron que las células madre mesenquimales podían diferenciarse en músculo esquelético o cardíaco (Ferrari et al., 1998; Makino et al., 1999) La médula ósea ofreció una fuente de células atractiva debido a su abundancia y accesibilidad para la terapia con células madre autólogas. En lo que se convertiría en un estudio traslacional fundamental, científicos canadienses trasplantaron células

madre de médula ósea en el corazón lesionado de ratas y observaron mejoras en la función cardíaca (Tomita et al., 1999). Con el comienzo del siglo XXI, la terapia con células cardíacas se fusionó con la medicina regenerativa, ya que Orlic y sus colegas confirmaron el beneficio terapéutico del trasplante de células madre de la médula ósea después de un infarto de miocardio y detallaron la capacidad de las células de la médula ósea para regenerar el miocardio (Orlic et al., 2001)

A partir de los años 60 del siglo pasado se han ido localizando células precursoras en cada vez más tejidos y los últimos años de estudios básicos y clínicos sobre las células madre produjeron hallazgos importantes y plantearon nuevas preguntas para el futuro de la terapia celular y de la medicina regenerativa. De forma que permitieron comprender muchas enfermedades y sobre todo abrieron la posibilidad de regenerar tejidos dañados, incluso generar nuevos órganos que se empleen en trasplantes o permitan desarrollar nuevos medicamentos. Existen mínimas dudas de que se alcanzaron avances terapéuticos importantes mediante la aplicación de terapias basadas en células madre. Sin embargo, este tipo de terapias suelen requerir adyuvantes como la terapia génica, la terapia génica basada en células o técnicas de ingeniería de tejidos para estimular y complementar la intervención. Además, los mecanismos responsables de la ubicación, retención, supervivencia, integración y función de las células madre en sistemas normales, envejecidos y enfermos aún siguen siendo desconocidos. Hasta que estas limitaciones se entiendan mejor, la capacidad de trasladar los descubrimientos sobre las células madre a pacientes estará limitada.

CARACTERISTICAS Y CLASIFICACION DE LAS CELULAS MADRE

Las células diferenciadas que necesitan reposición continua, como los eritrocitos, epidérmicas superficiales, enterocitos, etc., presentan diferenciación terminal y son incapaces de dividirse. Su reposición solo es posible a partir de células precursoras proliferativas que proceden de células madre que están retenidas en el propio tejido junto con las células diferenciadas.

Las células madre no presentan diferenciación terminal y presentan dos características propias como son: A) La capacidad de autorenovación, es decir, la capacidad de dividirse y proliferar para dar lugar a otras dos células madre idénticas, de modo indefinido, (división simétrica) o dar lugar a una célula hija idéntica a la madre y otra célula hija que entre en un proceso de diferenciación celular (división asimétrica) (Fig.1). El potencial de diferenciación, el cual hace referencia a la

capacidad que tienen las células de producir diferentes tipos o linajes celulares, es decir, la capacidad de una célula de dar lugar a células con características funcionales y morfológicas distintas a las de la célula original y entre ellas.

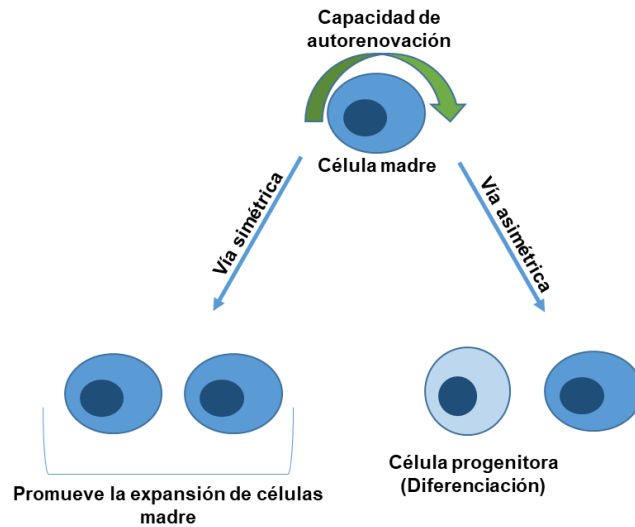


Figura 1. División simétrica y asimétrica de las células madre. La vía simétrica da lugar a otras dos células madre idénticas de modo indefinido, para promover su expansión. La vía asimétrica da lugar a una célula hija idéntica a la madre y otra célula hija que entra en diferenciación celular.

Atendiendo al potencial y capacidad de diferenciación, las células madre se pueden clasificar en 4 grupos diferentes: totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes.

1. Células madre totipotentes: Son aquellas células que pertenecen a las primeras etapas del desarrollo embrionario, cuando el óvulo fecundado está en el proceso de segmentación o clivaje. (Gomis, 2011; Marañez, 2010) Este tipo de células madre poseen la capacidad de crear nuevos embriones y formar un organismo completo, es decir, van a dar lugar a todos los tejidos extraembrionarios, además de a todos los tejidos del cuerpo. A este grupo pertenecen aquellas células que se encuentran en los estados iniciales del desarrollo embrionario: cigoto, blastómeros y células de la mórula (Condic, 2014). El cigoto es la célula madre totipotente por excelencia.
2. Células madre pluripotentes: Poseen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula correspondiente a los 3 linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo) pero no logran formar un organismo completo. Son localizadas en el polo embrionario del blastocisto.

3. Células madre multipotentes: Estas células madre son capaces de generar células de su propia capa embrionaria o linaje. Se las denominadas células madre órgano-específicas y pueden generar un órgano en su totalidad, sea en el embrión o en el individuo adulto (Gomis, 2011; Marañez, 2010) Este tipo de células madre pueden obtenerse a partir de una gran variedad de fuentes como la médula ósea, la sangre del cordón umbilical, el cerebro, la piel, el músculo cardíaco y esquelético, la retina y el páncreas (Nombela, 2007).
4. Células madre unipotentes: Las células unipotenciales, también llamadas oligopotenciales, presentan menor potencialidad debido a que solo pueden especializarse a un solo linaje celular (Boyd, 2011; Lucas, 2005)

Por otra parte, pese a que el origen no es una característica presente en las células madre, sí que se trata de un criterio que se utiliza actualmente para clasificarlas. Generalmente, se dividen en 2 categorías: células madre embrionarias (CME) y células madre adultas (CMA). Actualmente, se encuentran también las células madre pluripotentes inducidas (IPSCs) registradas por primera vez a finales de 2007.

1. Células madre embrionarias: Son células totipotenciales o pluripotenciales y pueden transformarse en cualquier tipo funcional de los 3 linajes embrionarios. A partir del endodermo, se forma el páncreas, el hígado, la glándula tiroides, el pulmón, la vejiga, y la uretra (T. Pastor Navarro, 2010). Del mesodermo se desarrolla la médula ósea, el esqueleto, el músculo estriado, el miocardio, los vasos sanguíneos y los túbulos renales. Del ectodermo provienen la piel, las neuronas, la glándula pituitaria, los ojos y los oídos (García de Insausti, 2012)

Este tipo de células madre pueden ser aisladas de un embrión en los primeros estadios de desarrollo. Por ello, se trata de células totipotentes y se les denomina CME tipo I. Por otra parte, también pueden proceder de la masa celular interna de un embrión en estado de blastocisto. En este caso, son células pluripotentes y se les denominada CME tipo II. En términos generales, las polémicas éticas y legales han hecho que su estudio sea de gran dificultad y que se prohíba su implementación médica. Otras fuentes de obtención de CME corresponden a teratomas o carcinomas embrionarios, fetos abortados de entre 5-9 semanas de gestación, entre otros (García de Insausti, 2012).

2. Células madre adultas: Son células madre multipotenciales o unipotenciales, donde el proceso celular de diferenciación, tras la formación de las 3 capas embrionarias, es prácticamente irreversible (S. Liu, Zhou, J., Zhang, X., Liu,

Y., Chen, J., Hu, B. , Zhang, Y. , 2016; Maguire, 2016) Se encuentran en los tejidos adultos y el cordón umbilical del cual se pueden obtener sin causar daño alguno al feto. Estas células dan lugar a células adultas del tejido en el que se encuentran y se originan mediante división celular asimétrica. El papel de estas células es conservar y restaurar el tejido donde se encuentran. Prácticamente todos los tejidos presentan una población de CMA que no se dividen, las cuales están retenidas en el propio tejido y que ayudan a la conservación del mismo. Las más estudiadas dentro de esta categoría son las pertenecientes a la médula ósea y la piel, que sí suelen dividirse constantemente debido a la elevada tasa de recambio o renovación celular que presentan.

3. Células madre pluripotentes inducidas: Este tipo de células madre pueden ser obtenidas a partir de células somáticas que proceden de tejidos fetales o adultos y que se someten a un proceso de reprogramación celular. Concretamente, existen dos procedimientos de reprogramación celular que han permitido desarrollar células madre con características similares a las CME. La primera técnica desarrollada es conocida como transferencia nuclear de células somáticas, denominada clonación, que consiste en trasplantar un núcleo de una célula somática o diferenciada en un óvulo ya desnucleado. En 1962 el doctor Ian Gurdon realizó el primer experimento de clonación de un animal, lo que le otorgó el premio nobel de fisiología y medicina. Como ya se comentó anteriormente, en 2006 el grupo de investigación del doctor Shinya Yamanka descubrió otra técnica para el desarrollo de CMA o fetales a células madre similares a las CME, demostrando que las células somáticas podrían ser reprogramadas a iPSC. Originalmente el procedimiento se realizó mediante alteraciones genéticas de la célula adulta, introduciendo 4 genes específicos de células madre (Oct3/4, Sox2, Klf4, y c-Myc), que son los responsables de controlar el proceso de diferenciación y de esta manera reprogramar la célula diferenciada a una célula madre pluripotente (Byrne, 2003; Okita, 2014)

CELULAS MADRE EMBRIONARIAS PLURIPOTENTES

Este tipo de células madre derivan de la masa celular interna (MCI) de un embrión en estado de blastocisto. El estado de blastocisto surge como resultado de una serie de divisiones sucesivas de las células embrionarias (o blastómeros), las cuales forman una estructura hueca constituida por una capa externa de células denominada trofoectodermo (TE), e interiormente por células en forma de racimo, las cuales constituyen la MCI. La capa externa continúa su desarrollo para formar la placenta y otros tejidos extraembrionarios precisos para la implantación y posterior desarrollo fetal del embrión en el útero, mientras que las células internas se desarrollan y especializan en los tejidos de las diferentes capas germinales del embrión, endodermo, mesodermo y ectodermo, formando así todos los tejidos de un organismo adulto (M., 1992)

Como se ha descrito anteriormente, estas células son pluripotentes ya que pueden generar todos los tipos celulares del cuerpo. Solo poseen una única limitación de origen y es que no pueden dar lugar a células de la placenta. A partir del aislamiento de las primeras líneas de células madre embrionarias en ratón (Evans & Kaufman, 1981), este tipo de células han sido objeto de intensa investigación ya que poseen dos características que las convierten en únicas con relación a otras células madre específicas de órganos identificadas hasta la fecha: La primera característica es la capacidad de autorrenovación *in vitro*, es decir, pueden mantenerse en cultivo después de numerosos pasajes y durante períodos prolongados como una población homogénea de células indiferenciadas, conservando un cariotipo normal. La segunda característica ya comentada, la pluripotencialidad. Esta capacidad quedó en evidencia cuando Bradley y col (1984) (Bradley, Evans, Kaufman, & Robertson, 1984) inyectaron células madre embrionarias de ratón en blastocistos en desarrollo, observando más tarde la contribución de estas células a todos los tejidos de los ratones quimeras adultos generados, incluyendo la línea germinal. De hecho, en 1998 se aislaron por primera vez líneas celulares pluripotentes derivadas de blastocistos humanos (Thomson et al., 1998)

Cabe destacar algunas de las características que permiten que una célula se defina como CME:

1. Son células diploides estables y poseen un cariotipo normal cuando se cultivan *in vitro*.

2. Se pueden propagar de forma indefinida en el estado embrionario y, por ello, son capaces de experimentar un número ilimitado de divisiones simétricas sin diferenciarse.
3. Se pueden diferenciar de forma espontánea para dar lugar a múltiples células que pertenecen a las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo.
4. Se pueden diferenciar *in vivo* tanto si son trasplantadas a un embrión temprano como a uno tardío, es decir, son capaces de integrarse en todos los tejidos fetales durante el desarrollo.
5. Pueden dar lugar a cualquier célula del cuerpo adulto, incluso las células germinales, cuando colonizan un blastocisto huésped. Se pueden diferenciar *in vitro* de forma dirigida en las condiciones apropiadas.

Existen otras dos fuentes a partir de las cuales es posible aislar células madre embrionarias. Por un lado, las germinales (EGC, *Embryonic Germ Cells*), las cuales se originan por las células germinales primordiales (CGP) que se encuentran en el mesodermo extraembrionario, y migran hacia los tejidos gonadales del embrión o feto dando inicio a la gametogénesis (Shamblott et al., 2001). Por otra parte, las de carcinoma (ECC, *Embryonic Carcinoma Cells*), las cuales provienen de tumores complejos denominados teratocarcinomas, que derivan de gónadas adultas (Skakkebaek, Berthelsen, Giwerzman, & Muller, 1987) (Fig.2)

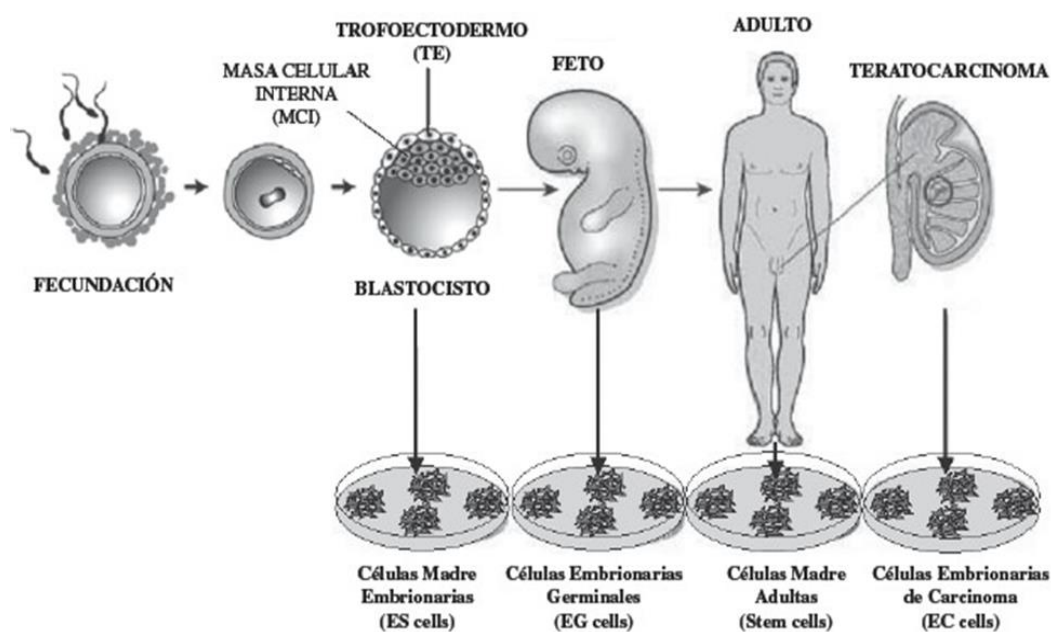


Figura 2. Origen de los diferentes tipos de células madre. Células madre embrionarias (ES cells), células madre de carcinoma (EC cells), células embrionarias germinales (EG cells) y células madre de adulto (Stem cells). (Donovan & Gearhart, 2001)

CÉLULAS DE CARCINOMA EMBRIONARIO P19

La línea celular P19 fue aislada por Rogers y McBurney (McBurney & Rogers, 1982) de un teratocarcinoma resultante del injerto de un embrión a los 7 días de gestación en los testículos de un ratón adulto C3H/He. Las células se extrajeron, separaron y sembraron en placas para su crecimiento. Finalmente, se seleccionó y mantuvo la línea celular clonal que presentaba la morfología típica de las células de carcinoma embrionario (CCE) (Noll & Miller, 1994). La línea celular P19 posee características únicas que las hacen muy útiles en los estudios sobre el cáncer y sobre la diferenciación de células madre. Las células P19 pueden propagarse en un estado similar al de las células madre o ser inducidas para que se diferencien mientras permanecen inmortalizadas, asemejándose a un tipo de célula tumoral que no es una célula madre. Cuando se implantan, en los diferentes tejidos adultos de ratones producen tumores. Sin embargo, cuando se implantan en un embrión recuperan el control sobre la proliferación y se integran de forma normal en el embrión, formando parte del futuro ratón adulto quimera.

La línea celular P19 se ha convertido en un buen modelo para responder algunas preguntas sobre el estado de célula madre, el crecimiento/recaída tumoral y, finalmente, para aclarar qué vías o señales están involucradas en la diferenciación de las células madre de cáncer. Como las células madre P19 (P19-CM) son pluripotentes, se utilizan con frecuencia como modelo de línea celular para estudios de desarrollo que involucran la diferenciación. Las P19-CM tratadas con concentraciones no tóxicas de ácido retinoico crecen en monocapa y, como agregados, se diferencian en neuronas, glía o células similares a fibroblastos o en endodermo o mesodermo (McBurney, Jones-Villeneuve, Edwards, & Anderson, 1982). Las células P19 en cultivo tienen pequeños cuerpos con extensiones largas análogas a los axones y dendritas de las células cerebrales similares a neuronas (Kawabata, Kawabata, & Saeki, 2004). Debido a esto, la línea celular P19 está bien establecida como modelo *in vitro* para estudios sobre diferenciación neural (Watkins, Basu, & Bogenhagen, 2008). Las células P19 también se pueden diferenciar con sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 0,5-1 % y, en estas condiciones, se diferencian principalmente en una variedad de células endodérmicas y mesodérmicas, incluidas células con fenotipos cardíacos y de músculo esquelético multinucleado (van der Heyden & Defize, 2003).

En conclusión, las P19-CM constituyen un excelente modelo para estudiar la diferenciación de células madre y el potencial tumorigénico de las células cancerosas que expresan un fenotipo embrionario. Las células P19 son un sistema único en el

que podemos comparar células similares a células madre cancerosas con células cancerosas más diferenciadas mediante el uso de una sola línea celular, lo que es claramente una ventaja científica.

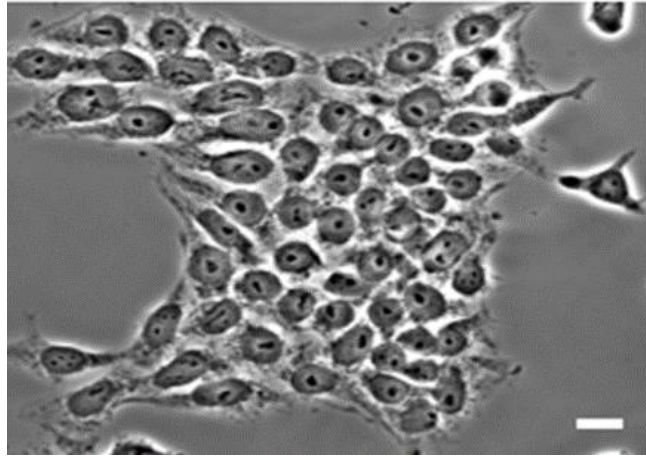


Figura 3. Fotografía realizada por microscopía de contraste de fases como representación de la morfología de la línea celular P19. Barra de escala: 20 μ m.

CELULAS MADRE ADULTAS

Las células madre adultas (CMA) o somáticas (CMS), como ya se ha mencionado anteriormente, son células multipotentes, y por tanto organoespecíficas. Este tipo de células han sido de gran interés en los últimos años debido a que su uso no presenta tantos problemas éticos. Las CMA se dividen en varios grupos (Flores-Figueroa, 2006):

- Células madre hematopoyéticas (CMHs): Las CMHs se han utilizado desde hace más de 50 años en el trasplante de médula ósea y han mostrado su efectividad en el tratamiento de diversas enfermedades. Pese a que la médula ósea fue la fuente inicial para obtener este tipo de células madre, posteriormente también se extrajeron de la sangre periférica y de la sangre del cordón umbilical. Poseen un inmunofenotipo complejo, sobre todo de acuerdo a su estado de diferenciación, pero habitualmente se ha empleado el marcador de superficie CD34 para su identificación. Una de las principales características que tienen las CMHs es la plasticidad de desarrollo cuando se introducen en diferentes tejidos; pueden diferenciarse en células hepáticas (Lagasse et al., 2000), músculo cardíaco y endotelio vascular (Jackson et al., 2001), así como en varios tipos de células epiteliales (Krause et al., 2001). Por lo tanto, muchos o todos los tejidos parecen contener una población de células madre adultas que se diferencian de una manera específica del

contexto, presumiblemente en respuesta a factores de crecimiento y señales proporcionadas por los tejidos del huésped (Seale, Asakura, & Rudnicki, 2001).

- Células madre *side population* (CMSP): La mayoría de las células acumulan fluorocromos, tales como Hoechst 33342 y rodamina 123, pero las células madre no, ya que poseen transportadores ABC como ABCG2 y ABCB1 cuya función es expulsar activamente fármacos o agentes citotóxicos que puedan dañar la integridad de la célula. Estos transportadores son un marcador importante cuando se trata de aislar y analizar la CMHs. El término de células CMSP se acuñó porque durante los análisis de las CMHs por citometría de flujo se visualizó una pequeña proporción de células que eran capaces de repeler el fluorocromo Hoechst 33342 a un lado de la mayoría de células. Posteriormente, se observó que las CMSP tienen capacidad pluripotente y pueden aislarse de muchos tejidos como: cerebro, mama, pulmón, corazón, páncreas, testículos, piel, medula ósea, músculo e hígado, y representan células madre específicas de linaje. Aunque son células difíciles de identificar y su estudio a nivel básico es complicado, parecen estar relacionadas con la renovación de los tejidos y el mantenimiento de la homeostasis tisular durante toda la vida, según el estudio publicado en 1999 por Gussoni y colaboradores (Gussoni et al., 1999). Este estudio describe que las CMSP aisladas de la médula ósea o del músculo y trasplantadas en el músculo esquelético participan activamente en la formación de miotubos esqueléticos durante la regeneración. Aún faltan pruebas del mecanismo concreto por el cual se logra la formación de miotubos esqueléticos. Sin embargo, es importante destacar que el músculo deficiente en Pax7 carece por completo de células satélite miogénicas, pero contiene CMSP musculares que exhiben un alto nivel de actividad progenitora hematopoyética (Seale et al., 2001).

En conjunto, estos datos demuestran que las células madre derivadas de músculo representan una población celular distinta de las células satélite, sugiriendo la hipótesis de que la inducción de Pax7 en células madre derivadas de músculo promueve la especificación de células satélite al restringir los programas de desarrollo alternativos. No obstante, aún faltan pruebas directas de que las células madre derivadas del músculo representan los progenitores de las células satélite y de los mecanismos que parecen estar implicados en la regulación de este paso del desarrollo.

- Células progenitoras adultas multipotentes (CPAM): Las CPAM están presentes en todos los tejidos que componen el cuerpo, poseen capacidad

de autorenovación y diferenciación celular, y un gran número de moléculas bioactivas, que actúan modulando la respuesta inflamatoria, angiogénesis y mitosis de células involucradas en el proceso de reparación de tejidos. Además, cuando estas células son introducidas en el organismo, adquieren la morfología y funcionalidad de cualquier tipo de célula que constituye el tejido lesionado, lo que es de suma importancia para su uso a nivel terapéutico dentro de la medicina regenerativa. Cabe resaltar que estas células al ser trasplantadas tienden a no integrarse en el tejido lesionado, sino que

ejercen su efecto terapéutico sobre las CPAM endógenas del tejido lesionado a través de la secreción de factores tróficos. De esta forma, las CPAM endógenas son las responsables del proceso de reparación tisular a través de los mecanismos de diferenciación celular, modulación del sistema inmunológico, renovación celular, acción antiapoptótica y antifibrótica, además de estimular la angiogénesis (Caplan & Hariri, 2015)

- Células madre mesenquimales (CMMs): Son células multipotentes y con morfología fibroblastoide también conocidas como Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides. Son precursoras del tejido muscular y del tejido conjuntivo en general, dando lugar a los diferentes tipos de tejidos conectivos especializados (como el tejido adiposo, el tejido cartilaginoso, el tejido óseo y el tejido hematopoyético); así como los tejidos conectivos no especializados, laxo (tejido mucoso, tejido reticular y el propio tejido mesenquimatoso) y denso (regular e irregular). Entre las principales características que poseen las CMMs resaltan:
 - Se pueden aislar fácilmente y mantienen su capacidad de proliferar durante largos periodos de tiempo sin perder sus características.
 - Se pueden trans-diferenciar de mesodermo a ectodermo y endodermo en función de las condiciones de cultivo que se utilicen. Esto hace que sean muy versátiles.
 - Tienen propiedades inmunomoduladoras. Secretan citoquinas y receptores que son capaces de modificar el microambiente inmune del huésped.

Debido a estas características las CMMs muestran un gran potencial en el campo de la medicina regenerativa.

CÉLULAS MADRE ADULTAS C2C12

La línea celular C2C12 (Fig.3), es una línea de mioblastos de ratón C3H inmortalizada que fue originalmente aislada por Yaffe y Saxel en Israel en 1977 (Yaffe & Saxel, 1977). Se obtuvieron a través de pases en serie de mioblastos cultivados procedentes del músculo del muslo de ratones, posterior a una lesión por aplastamiento. Las células C2C12 son de utilidad para estudiar el compromiso del linaje celular dada su pluripotencialidad, lo que permite a los investigadores evaluar el linaje muscular, así como el linaje óseo y, con menos frecuencia, los linajes de condrocitos y adipocitos. Esta capacidad de compromiso multilínea es una característica similar a la que presentan las células satélite del músculo esquelético. Por ejemplo, las células C2C12 tratadas con un elevado porcentaje de suero son capaces de proliferar rápidamente y diferenciarse en miotubos en condiciones de bajo porcentaje de suero, lo que lleva a los precursores de las células del músculo esquelético al proceso de miogénesis. Por otro lado, si son tratadas con el factor de crecimiento de la proteína morfogenética ósea -2 (BMP-2) se diferencian en las células precursoras del linaje óseo, los osteoblastos. Estos osteoblastos derivados de C2C12 expresan los marcadores específicos de etapa para el compromiso osteoblástico del linaje óseo, incluida la expresión de Runx2, OSX (*Osterix*) y ALP y el depósito celular de proteínas de matriz. Esta característica de pluripotencia, presente en esta línea celular, permite la investigación de factores que regulan el compromiso de linaje y la transdiferenciación. Por estas características, la línea celular C2C12 es útil para estudiar la diferenciación de mioblastos, osteoblastos y miogénesis. Así como para estudiar los mecanismos reguladores de la regeneración del tejido muscular posterior a una lesión o pérdida de tejido debido a una enfermedad en el campo de la medicina regenerativa.

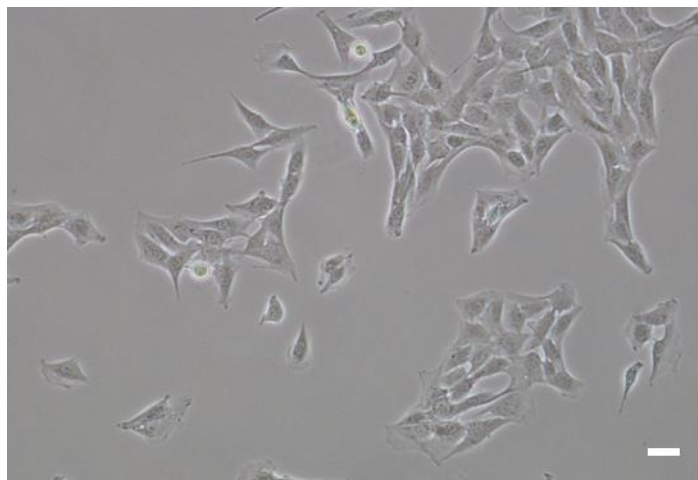


Figura 4. Fotografía realizada por microscopía de contraste de fases como representación de la morfología de la línea celular C2C12. Barra de escala. 20 μ m.

MECANISMOS DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS CELULAS MADRE

El sistema de control de calidad celular engloba una variedad de actividades de autorregulación. Una de ellas, es el mantenimiento de la síntesis de proteínas, la que, a su vez, se encuentra en equilibrio con los procesos involucrados en la degradación de proteínas disfuncionales. De igual forma, los componentes a partir de los cuales se construyen las estructuras celulares deben reciclarse y redistribuirse para garantizar el funcionamiento de todos los sistemas celulares. Otras vías del sistema de control de calidad celular se encargan de mantener el código genético al tiempo que permiten la supervivencia y proliferación celular. Asimismo, también existen vías que garantizan la creación fiel de ARNs y su adecuada distribución para producir proteínas en el momento adecuado (Hurtley & Alderton, 2019).

Dada la vida, relativamente larga, de las células madre y sus diferentes periodos de actividad, son necesarios mecanismos eficientes de control de calidad celular que equilibren su supervivencia y resistencia a estresores internos y externos con sus requerimientos energéticos y potencial de activación. De hecho, estudios recientes sugieren una asociación entre el metabolismo energético mitocondrial, el sistema redox, los sistemas de degradación de proteínas y el eje lisosomal/autofágico-muerte celular con el mantenimiento de la troncalidad, el potencial de diferenciación y la senescencia de las células madre, por lo que la regulación de estos procesos celulares podría servir como herramienta para inhibir, inducir o dirigir la diferenciación celular durante el desarrollo de nuevas terapias celulares o de ingeniería tisular.

FUNCIÓN MITOCONDRIAL

Metabolismo energético

Para realizar sus funciones, la célula utiliza tres principales sistemas metabólicos energéticos que le proporcionan trifosfato de adenosina (ATP): el sistema fosfocreatina, la glucólisis y la respiración mitocondrial.

1. Sistema de fosfocreatina (PCr) es la forma más rápida de sintetizar ATP. Se basa en la actividad de las enzimas creatina quinasa y adenilato quinasa. La producción de adenosín monofosfato (AMP) en esta vía es una característica importante debido a su acción como un potencial activador alostérico de la glucogenólisis y de la glucólisis.
2. Glucólisis: es la vía metabólica encargada de oxidar o fermentar la glucosa. Se produce en el citoplasma de la mayoría de las células. Esta vía conlleva 10 reacciones enzimáticas que convierten a la glucosa en dos

moléculas de piruvato. El piruvato tiene dos posibles destinos: ser un combustible para la respiración mitocondrial o ser un metabolito precursor durante la fermentación láctica. La producción de lactato impide la inhibición de la glucólisis que se produce como consecuencia de una concentración de piruvato que supera la capacidad de fosforilación oxidativa mitocondrial. La mitocondria se considera el principal centro de energía de las células eucariotas, ya que genera elevados niveles de ATP (38 moléculas de ATP a partir de una molécula de glucosa) en presencia de oxígeno a través de la maquinaria conocida como cadena de transporte de electrones o respiración mitocondrial y fosforilación oxidativa (OXPHOS).

3. Respiración mitocondrial y OXHPOS: Sistema aeróbico que tiene la tasa más lenta de síntesis de ATP, pero a su vez, tiene la mayor capacidad de producción de ATP debido a su capacidad para responder a bajas concentraciones de ADP. A partir del piruvato obtenido en la glucólisis, en la matriz mitocondrial, durante el ciclo de Krebs, se generan equivalentes reductores (NADH y FADH₂) que ceden electrones de alta energía a la cadena de transporte de electrones localizada en la membrana mitocondrial interna. Este sistema de transporte de electrones o cadena respiratoria consta de cuatro complejos multiproteicos que generan un gradiente de protones que será utilizado por la ATP sintetasa o complejo V para producir ATP (de Oliveira et al., 2012): El complejo I (NADH:ubiquinona oxidorreductasa) cataliza la reducción de la ubiquinona a través de la oxidación de NADH. El complejo II (succinato deshidrogenasa) cataliza la oxidación de succinato para dar fumarato, lo que resulta en la oxidación del FADH₂ y la reducción de la ubiquinona. El complejo III (ubiquinol-citocromo-c reductasa) transfiere los electrones procedentes del ubiquinol producidos en el complejo I o en el II al citocromo c que los transporta a su vez al complejo IV (citocromo c oxidasa) que oxida el citocromo c transfiriendo los electrones al oxígeno y generando finalmente agua. Las transferencias de los electrones en los complejos I, III y IV llevan asociados una disminución de energía libre que se emplea en bombear protones al espacio intermembrana generando un gradiente de protones ($\Delta\Psi_m$, potencial de membrana mitocondrial) que es utilizado por el complejo V para producir ATP a partir de ADP en un proceso denominado fosforilación oxidativa (Baker, McCormick, & Robergs, 2010)

Varios estudios se han centrado en descubrir el papel de la respiración mitocondrial para la función de las células madre debido a su capacidad de responder a bajas concentraciones de ADP y producir ATP eficientemente. {Vega-Naredo, 2014 #611; Zhang, 2011 #1958}. Además, las mitocondrias también contribuyen a otras funciones celulares importantes para la actividad de las células madre como la proliferación celular, el ciclo celular y la supervivencia y muerte celular (Antico Arciuch, Elguero, Poderoso, & Carreras, 2012)

Biogénesis y dinámica mitocondrial

La biogénesis mitocondrial es un conjunto de eventos celulares que participan en la formación de nuevas mitocondrias. En este proceso confluyen la proliferación o aumento del número de mitocondrias por célula y la diferenciación, mediante la cual, el orgánulo adquiere las características estructurales y funcionales adecuadas para el desarrollo de sus funciones específicas en las distintas células del organismo. Las mitocondrias surgen por el crecimiento y división de mitocondrias preexistentes. Durante este proceso juegan un papel importante tanto la dinámica mitocondrial (Lopez-Lluch, Irusta, Navas, & de Cabo, 2008) como las especies reactivas de oxígeno (ROS) (H. C. Lee, Kim, Kim, Shin, & Yoon, 2000; Wei & Lee, 2002) que se forman de manera natural como subproductos de la cadena respiratoria. Estos factores son de suma importancia en la regulación del volumen de organelas en la célula.

La dinámica mitocondrial se refiere al equilibrio entre los procesos de fusión y fisión mitocondrial. Es decir, las mitocondrias no permanecen estáticas dentro de las células, sino que se mueven, cambian de tamaño y forma, se fusionan unas con otras o se dividen en otras más pequeñas (Bereiter-Hahn & Voth, 1994). El equilibrio entre los procesos de fusión y fisión mitocondrial engloba tres procesos distintos: a) el remodelado del retículo mitocondrial mediante procesos de fusión/fisión, el cual se encuentra estrechamente vinculado al estado metabólico celular y es controlado por la actividad de un grupo de GTPasas relacionadas con la familia de las dinaminas y que manifiestan efectos opuestos; b) la motilidad mitocondrial subcelular, que corresponde al desplazamiento de las mitocondrias dependiente de las proteínas kinesina 1 y 3 y de los adaptadores Milton y Miro (Hirokawa & Takemura, 2005), lo que asegura el suministro local de ATP en procesos biológicos con elevados requerimientos energéticos y el uso de estas organelas como tampones de Ca^{2+} (Hollenbeck & Saxton, 2005) y c) el remodelado de la ultraestructura mitocondrial

y la condensación de su matriz, procesos considerados básicamente como un reflejo del estado metabólico mitocondrial (Scalettar, 1991)

El equilibrio entre los mecanismos de fusión y fisión es necesario para una función mitocondrial y celular normal, además está íntimamente relacionado con la bioenergética mitocondrial. Con la fusión de las mitocondrias se forman redes tubulares que permiten el intercambio de lípidos de membrana y contenidos mitocondriales mejorando así la actividad de las mitocondrias, siendo beneficioso en términos de una mayor producción de ATP, intercambio de nutrientes y proteínas, así como un buen gradiente electroquímico. Por otra parte, la fisión permite eliminar componentes dañados de manera irreversible. De esta forma se disminuye el porcentaje de mitocondrias defectuosas y se aumenta la estabilidad de la proliferación celular. Un desequilibrio en estos mecanismos de fusión y fisión disminuye la eficiencia del funcionamiento mitocondrial y aumenta el riesgo de muerte celular. La paralización del proceso de fusión mitocondrial hace que la red tubular normal se fragmente y se produzca la reducción del consumo de oxígeno mitocondrial y el metabolismo energético, pudiendo afectar la propagación de ondas de Ca^{2+} a la célula (Frieden, 2004). Por otro lado, la paralización de la fisión mitocondrial genera túbulos alargados, interconectados que a menudo se agrupan perinuclearmente y como consecuencia se produce un daño mitocondrial debido a una reducción del $\Delta\Psi_m$, un incremento en los niveles de ROS y una disminución de la degradación de cuerpos mitocondriales defectuosos (Seo, 2010).

Las principales proteínas implicadas en la regulación de la fusión mitocondrial son las Mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2) que se encuentran en la membrana mitocondrial externa y son las responsables de mediar su fusión y la atrofia óptica tipo 1 (OPA1) que se encuentra en la membrana mitocondrial interna, espacio intermembrana y en la base de los pliegues de las crestas (Misaka, 2002 {Sato, 2003 #1972}) y que participa en la fusión de las membranas internas. Las 3 proteínas pertenecen a una superfamilia de dinaminas con un dominio GTPasa transmembrana cuya actividad es crucial para la actividad de fusión. La Mfn2, a diferencia de la Mfn1, tiene funciones pleiotrópicas, estando involucrada en distintas funciones celulares claves como son el metabolismo oxidativo, ciclo celular, muerte celular y el transporte axonal mitocondrial (Bach, 2003 {Santel, 2003 #1974}). Por otra parte, el proceso de fisión mitocondrial ocurre habitualmente en todas las células en condiciones normales para mantener en equilibrio la dinámica mitocondrial. En este caso, las principales proteínas que controlan la fisión mitocondrial y peroxisomal en células eucariotas son

la proteína similar a la dinamina-1 (Drp1) y la proteína de fisión 1 (Fis1) (Smirnova, Shurland, Ryazantsev, & van der Blik, 1998{James, 2003 #1976})

METABOLISMO REDOX

Radicales libres y daño oxidativo

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado en su orbital más externo, por lo que son muy reactivos e inestables ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica, siendo las mitocondrias la principal fuente de estos en la célula. La vida media del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos.

Entre los principales radicales libres se encuentran algunas especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) que son una familia de moléculas antimicrobianas derivadas del anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y del óxido nítrico (NO^{\cdot}) producidos mediante la actividad enzimática de la NADPH oxidasa y del óxido nítrico sintasa 2 inducible (NOS2), respectivamente. Los ROS más importantes son el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el radical peróxido ($ROO^{\cdot -}$) y el radical hidroxilo ($^{\cdot}OH$), que se descomponen rápidamente en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual se difunde a través de las membranas celulares, dispersándose por todo el organismo, y transformándose en $^{\cdot}OH$.

En concentraciones bajas o moderadas, estas especies reactivas cumplen una función fisiológica al participar en la defensa frente a las infecciones, en el metabolismo normal, en la fagocitosis e inflamación, e incluso funcionan como mensajeros secundarios en diferentes vías de señalización celular (Valko, 2007)

Las células han desarrollado mecanismos de defensa para contrarrestar el efecto lesivo de los radicales libres, en casos de intoxicación masiva o continuada. Los sistemas antioxidantes constituyen la primera línea de defensa para aliviar la superproducción de radicales libres. Sin embargo, estos sistemas celulares pueden ser superados, condicionando una situación de estrés oxidativo. Este estrés producido por el bombeo continuo de ROS provoca un daño oxidativo a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que puede llegar a ocasionar la muerte celular favoreciendo la aparición de afecciones patológicas, así como la aceleración del envejecimiento.

La lipoperoxidación (LPO), u oxidación lipídica, es un proceso degradativo de autooxidación que implica una propagación en cadena de reacciones de radicales libres que afecta mayoritariamente a ácidos grasos poliinsaturados abundantes en las membranas biológicas y a las lipoproteínas, y que culmina en la formación de hidroperóxidos lipídicos y aldehídos lo suficientemente tóxicos como para reaccionar con otro ácido graso poliinsaturado. Cada vez hay más evidencias que apuntan a que los aldehídos generados endógenamente durante el proceso de LPO están implicados en la mayoría de los efectos patológicos y fisiológicos asociados con el estrés oxidativo en células y tejidos (Esterbauer & Cheeseman, 1990). Entre los aldehídos derivados de la LPO destacan el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) que puede ser producido por el ácido araquidónico, ácido linoleico o sus hidroperóxidos. El 4-HNE presenta un amplio rango de actividades biológicas, incluyendo la inhibición de la síntesis de proteínas y de ADN, así como la inactivación de enzimas. Cabe destacar que la LPO está implicada en la patogénesis de numerosas enfermedades como la diabetes y el cáncer, así como en procesos de envejecimiento (Uchida, Kudo, Suzuki, & Nakase, 1999).

Las proteínas pueden dañarse en su esqueleto peptídico y en las cadenas laterales generando proteínas carboniladas. Este proceso se inicia por la sustracción del hidrógeno de un carbono α en una cadena polipeptídica. Alternativamente, el oxígeno molecular puede atacar al radical del carbono α para formar intermediarios peróxidos llevando finalmente a la formación de péptidos que contienen carbonilos (Dean, Fu, Stocker, & Davies, 1997). La acumulación de proteínas carboniladas se ha asociado con el envejecimiento y con enfermedades relacionadas con el mismo como la sarcopenia (Levine, 2001 #1981).

La exposición a oxidantes también contribuye con el incremento del daño a ácidos nucleicos. El daño al ADN puede resultar de reacciones con los residuos de desoxirribosa, con el esqueleto fosfodiéster o con las bases nitrogenadas. Habitualmente se produce por la acción de radicales hidroxilo y epóxidos sobre las bases nitrogenadas, dando lugar a especies tipo 8-oxo-deoxiguanosina. Las lesiones en el ADN que no son reparadas se van acumulando y pueden contribuir a la aparición de procesos mutagénicos y carcinogénicos (Chatgililoglu & O'Neill, 2001). Sin embargo, el factor de transcripción p53 puede ser activado en respuesta al daño oxidativo en el ADN, favoreciendo la detención del ciclo celular y la reparación del daño o, en caso de un daño irreparable, disparando la muerte celular programada.

Defensa antioxidante

El hecho de que en las células se formen especies reactivas como subproducto de su metabolismo normal implica un peligro para la integridad de la propia célula y, genera la necesidad de contar con mecanismos de protección eficaces que mantengan la homeostasis redox.

Un antioxidante es una molécula que, aun encontrándose en pequeñas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, inhibe o retrasa la oxidación de un sustrato, sin perder su propia estabilidad. Los organismos han desarrollado un importante número de sistemas de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos. Entre los sistemas enzimáticos destacan los enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y el tándem glutatión peroxidasa/reductasa (GPx/GR).

La SOD cataliza la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . En eucariotas superiores hay tres formas del enzima: SOD citosólica o SOD1 (con cobre y zinc en su centro activo), SOD mitocondrial o SOD2 (con manganeso en su centro activo) y SOD extracelular o SOD3 (con cobre y zinc en su centro activo) (Brawn & Fridovich, 1980).

La CAT es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina. Tiene cuatro subunidades proteicas, cada una de ellas con un grupo hemo y una molécula de NADPH. Se encuentra muy activa en eritrocitos y en el hígado, pero ha sido descrita en todos los tejidos, incluido el cerebro (Vega-Naredo et al., 2005). El H_2O_2 se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo aeróbico de los hidratos de carbono. La CAT actúa eliminándolo, pero tiene una baja afinidad por su sustrato, de manera que es mucho más eficiente cuando las concentraciones de H_2O_2 son elevadas. Esta enzima se localiza principalmente en los peroxisomas (De Duve & Baudhuin, 1966).

La GPx y la GR forman el tándem GPx/GR, junto con glutatión y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). La GPx elimina el H_2O_2 usando glutatión reducido (GSH) y liberando glutatión oxidado (GSSG) y H_2O , y tiene una alta afinidad por su sustrato, por lo que funciona mejor a bajas concentraciones de H_2O_2 . La GPx actúa en conjunto con la GR, que cataliza la reducción de GSSG a GSH, tomando un H^+ de NADPH y permitiendo su reutilización por la GPx.

Por último, cabe destacar la existencia de antioxidantes no enzimáticos. Son compuestos capaces de neutralizar los radicales libres debido a su capacidad para donarles un electrón, neutralizando así su toxicidad potencial. En esta categoría se

engloban varias moléculas de diversa naturaleza química como pueden ser los antioxidantes obtenidos a partir de la dieta como el ácido ascórbico, el α -tocoferol y el β -caroteno. También podemos encontrar en este grupo compuestos como el GSH y la melatonina. El GSH tiene poder reductor debido al grupo -SH libre de la cisteína central. Cuando se oxida, dos moléculas de GSH se unen para formar el GSSG a través de un puente disulfuro establecido entre las dos cisteínas. Este péptido participa en una gran variedad de procesos redox intracelulares como, por ejemplo, el mantenimiento de la hemoglobina en su estado ferroso.

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Fig.4) ha despertado un interés especial entre los investigadores debido a la gran amplitud y variedad de funciones que se le adscriben. Es una hormona que interviene en el ciclo del sueño y ayuda a controlar los ritmos circadianos (Vega-Naredo et al., 2012) y, además, es el antioxidante natural más potente que se conoce (Reiter et al., 2016)

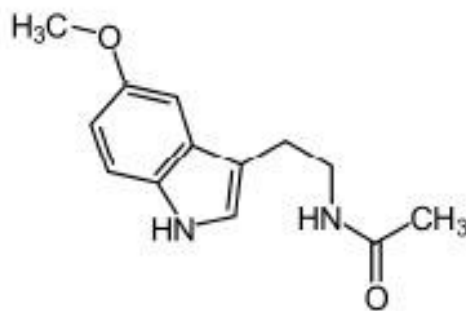


Figura 5. Estructura química de la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina)

La síntesis de esta indolamina se produce a partir del aminoácido esencial L-triptófano (Ramis, Esteban, Miralles, Tan, & Reiter, 2015) por la glándula pineal secretándose bajo un ritmo circadiano con altos niveles durante la noche y niveles basales durante el día. La duración del periodo de máxima producción de melatonina es típicamente proporcional a la extensión de la fase oscura, y por ello, dependiendo de la latitud, la señal nocturna de melatonina puede variar doce horas o más en el curso del año. En las especies fotoperiódicas, estos cambios anuales en la duración de la señal proporcionan el aviso neuroendocrino por el cual una gran variedad de respuestas fisiológicas se sincroniza con el cambio de estación (von Gall, Stehle, & Weaver, 2002). Sin embargo, todos los órganos y tejidos del organismo producen también

melatonina, es la llamada melatonina extrapineal que se produce sin ritmicidad circadiana y en cantidades más elevadas que las encontradas en plasma.

Otra de las funciones atribuidas a la melatonina se refiere a sus propiedades oncostáticas, inmunomoduladoras y como antioxidante (Reiter, 2003). De hecho, probablemente la principal función de la melatonina extrapineal sea su utilización por las propias células para defenderse del estrés oxidativo. La melatonina actúa eficazmente en la reducción del estrés oxidativo en un elevado número de circunstancias (envejecimiento, neurodegeneración, obesidad, diabetes, etc.) (Ramis et al., 2015). Desarrolla su acción como antioxidante directo, al neutralizar radicales libres por sí misma, y como antioxidante indirecto, al inducir la expresión y/o actividad de los principales enzimas antioxidantes (Reiter et al., 1995)). La efectividad de la melatonina radica en su alta lipofilidad y su débil hidrofobia, lo que le permite atravesar las membranas celulares con facilidad. Por ello, esta indolamina se puede distribuir por todo el cuerpo a nivel celular y subcelular (Coto-Montes et al., 2012). Dentro de la célula, la melatonina se encuentra presente a diferentes concentraciones en distintos compartimentos: en el citosol, en el núcleo y en las membranas celulares y mitocondriales (Sainz et al., 1995, {Menendez-Pelaez, 1993 #1994},). Así, algunos compartimentos como el núcleo y la mitocondria acumulan concentraciones particularmente elevadas (Leon, Holuigue, & Jordana, 2007). Debido a la amplitud de su localización subcelular, la melatonina protege a los lípidos en las membranas, a las proteínas en el citosol y al ADN en el núcleo del daño por radicales libres (Reiter, 1998).

SISTEMAS DE CONTROL DE CALIDAD DE PROTEÍNAS

La célula tiene varios mecanismos para mantener la homeostasis de las proteínas asegurando el reciclaje de componentes y conservando la integridad celular. Entre estos mecanismos se encuentra la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), el sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia. Fallos en estos sistemas son críticos para la célula, ocurren más frecuentemente con el envejecimiento celular y provocan una acumulación aberrante de proteínas que puede desencadenar una respuesta negativa como la parada en seco de la proliferación de la célula, así como la incapacidad de diferenciación, aumentando el riesgo de muerte celular. Además de dejar de proliferar, las células envejecidas secretan moléculas que pueden ser peligrosas, a través de las cuales influyen en células vecinas que inducen la senescencia celular

Respuesta a proteínas mal plegadas

El retículo endoplásmico (RE) es un orgánulo donde se sintetizan, se ensamblan y pliegan hasta el 75% de las proteínas destinadas al espacio extracelular, a la membrana plasmática y a los compartimentos exo/endocíticos (X. Zhang et al., 2006), siendo este orgánulo un punto de control para asegurar el correcto plegamiento de estas proteínas. Casi todas las proteínas celulares son trasladadas al lumen del RE donde son plegadas y estructuradas de forma correcta para posteriormente ser transportadas a su lugar de destino. Por ello, un óptimo funcionamiento en la capacidad de plegamiento y procesamiento de las proteínas constituye un factor importante para la supervivencia celular. El correcto plegamiento de las proteínas requiere de una gran cantidad de factores presentes en el interior del RE, entre los que cabe destacar las altas concentraciones Ca^{2+} , de ATP y un ambiente oxidante que pueda permitir la formación de puentes disulfuro (Losa, 2010). Las proteínas se pliegan gracias a las chaperonas moleculares y otras proteínas que reciben el nombre colectivo de chaperonas del RE. El RE es muy sensible a situaciones que alteren su ambiente y modifiquen por tanto la capacidad de plegamiento de proteínas. En este sentido, existen una gran variedad de estímulos intracelulares y/o extracelulares que pueden comprometer el correcto funcionamiento del RE, como pueden ser la inhibición de la glicosilación, la reducción de los puentes de disulfuro, una bajada de los niveles de Ca^{2+} en el lumen del RE, episodios de hipoxia/isquemia... lo que da lugar a una acumulación y agregación de proteínas mal plegadas y, por ende, a provocar lo que se conoce como “estrés del retículo endoplásmico” (Liang, Zhang, McGrath, Zhang, & Cavener, 2006). Para lidiar con este estrés las células desencadenan la UPR {Ozcan, 2004 #1999; {Schroder, 2005 #2000}}. Es una respuesta coordinada que consiste en cuatro eventos fundamentales que se ponen en marcha simultáneamente:

1. Inhibición generalizada de la síntesis proteica (Losa, 2010), lo que evita la acumulación de nuevas proteínas mal plegadas.
2. Un aumento en la expresión de genes que codifican enzimas residentes en el RE implicadas en el correcto plegamiento de las proteínas como Grp78/Bip, Grp94, PDI y otras), aumentando la capacidad de plegamiento. (Sidrauski, Chapman, & Walter, 1998).
3. Inducción transcripcional de genes correspondientes a miembros del complejo de degradación asociado al RE, (ERAD). Por ello, aquellas proteínas que no pasan el control de calidad en este orgánulo son enviadas desde el RE al

citosol, ubiquitinizadas y degradadas por el sistema ubiquitina- proteasoma (Losa, 2010).

4. Si la situación de estrés no es resuelta en un periodo de tiempo, la UPR tiene la capacidad de inducir la muerte celular por apoptosis de las células dañadas por acúmulos de proteínas mal plegadas, con el fin de asegurar la supervivencia de las demás células.

La activación de la UPR se produce por medio de tres proteínas transmembrana residentes en el RE (Fig.4), que responden cuando se produce una disfunción de la actividad normal del RE. Se han identificado tres proteínas sensoras-transductoras en el RE: enzima 1 alfa que requiere inositol ($IRE1\alpha$), proteína tipo quinasa activada por ARN quinasa del retículo endoplásmico (PERK) y el factor de transcripción activador 6 alfa ($ATF6-\alpha$)(Yoshida et al., 2000) . En la célula en reposo, estos tres receptores transmembrana del RE se mantienen inactivos a través de su asociación con la chaperona Grp78/Bip (Bertolotti, Zhang, Hendershot, Harding, & Ron, 2000). Cuando se produce un exceso de proteínas dañadas y/o mal plegadas, Grp78/Bip se disocia de estos tres receptores uniéndose a las proteínas mal plegadas, iniciándose así la activación de las vías de transducción de señales de la UPR.

PERK e $IRE1\alpha$ se activan por dimerización y subsiguiente autofosforilación. Por otra parte, $ATF6-\alpha$ que se sintetiza como una proteína de 90 kDa ($ATF-6\alpha$ 90 kDa), se activa mediante una escisión proteolítica específica, se transporta al aparato de Golgi y se activa mediante proteasas *site-1* y *site-2* que producen la forma activa ($ATF-6\alpha$ 50 kDa) (Gotoh, Endo, & Oike, 2011).

La respuesta de la UPR incluye la reducción de síntesis de proteínas como ya se ha indicado anteriormente. Este proceso se produce a través de la fosforilación del factor de iniciación eucariótico 2 alfa ($eIF2\alpha$) tras la activación de PERK, la síntesis de chaperonas y proteínas para mejorar la capacidad de plegado del RE, la degradación de proteínas dañadas y/o mal plegadas a través del sistema ubiquitina proteasoma o la activación de la apoptosis, cuando el estrés del RE es prolongado o severo para eliminar células dañadas (Hoyer-Hansen & Jaattela, 2007).

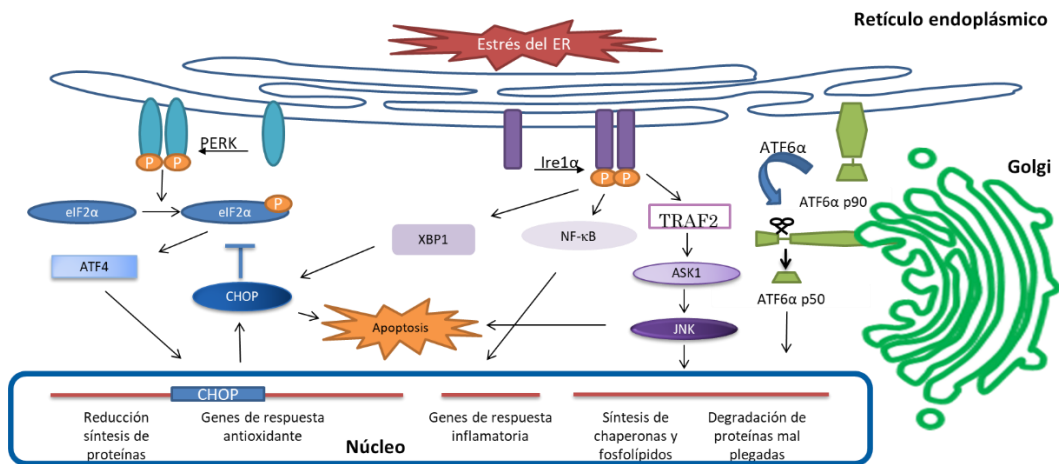


Figura 6. Esquema de las tres principales rutas de activación de la respuesta a proteínas mal plegadas por estrés del retículo endoplásmico. IRE1 α (enzima 1 alfa que requiere inositol); PERK (proteína tipo quinasa activada por ARN quinasa del retículo endoplásmico) y ATF6 α (factor de transcripción activador 6 alfa). (Gotoh et al., 2011)

Sistema ubiquitina-proteasoma

El proteasoma es un complejo enzimático formado por múltiples subunidades que se encuentra principalmente en el citoplasma y cuya función es catalizar la degradación selectiva de proteínas dañadas y de vida media corta para mantener la homeostasis celular (Groll & Potts, 2011) (Cuervo & Wong, 2014).

La ubiquitinación es el mecanismo celular de destinación o marcaje de proteínas solubles o de membrana para su degradación por el proteasoma (Hershko & Ciechanover, 1998). Este proceso consiste en la ligación covalente de la proteína de 76 aminoácidos llamada ubiquitina a residuos de lisina específicos en la proteína diana produciendo una cadena de poliubiquitinas (Hershko & Ciechanover, 1998). Este proceso es mediado por la actividad de tres enzimas que catalizan la transferencia secuencial de la ubiquitina a la proteína diana.

1. La enzima E1 activadora recibe la ubiquitina libre
2. La enzima E2 conjugadora se une transitoriamente a la ubiquitina
3. La enzima E3 ligasa cataliza la transferencia de la ubiquitina desde la E2 a un residuo de lisina en la proteína blanco (Pickart, 2001)

La ubiquitinación ha sido clásicamente descrita como una señal de destinación de proteínas a su degradación por acción del proteasoma 26S, formado por la subunidad 20S (núcleo catalítico responsable de la degradación de proteínas) y dos subunidades reguladoras de 19S, a las que se une la cadena de poliubiquitina de la proteína a

degradar. Antes de la degradación, las moléculas de ubiquitina son liberadas por enzimas desubiquitinizantes (DUB) con gasto de ATP y se reciclan.

El sistema ubiquitina-proteasoma (Fig.7) regula una variedad de procesos celulares durante proliferación y diferenciación celular, de forma que alteraciones en este sistema contribuyen al desarrollo de diversas patologías celulares, como el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. Está aceptado que el sistema ubiquitina-proteasoma juega un papel importante en el mantenimiento de la autorrenovación y la diferenciación de las células madre y progenitoras a través de la degradación altamente ordenada de las proteínas (Wang et al., 2022) que podría ser esencial para la remodelación celular que acompaña a la diferenciación (H. Zhang et al., 2022).

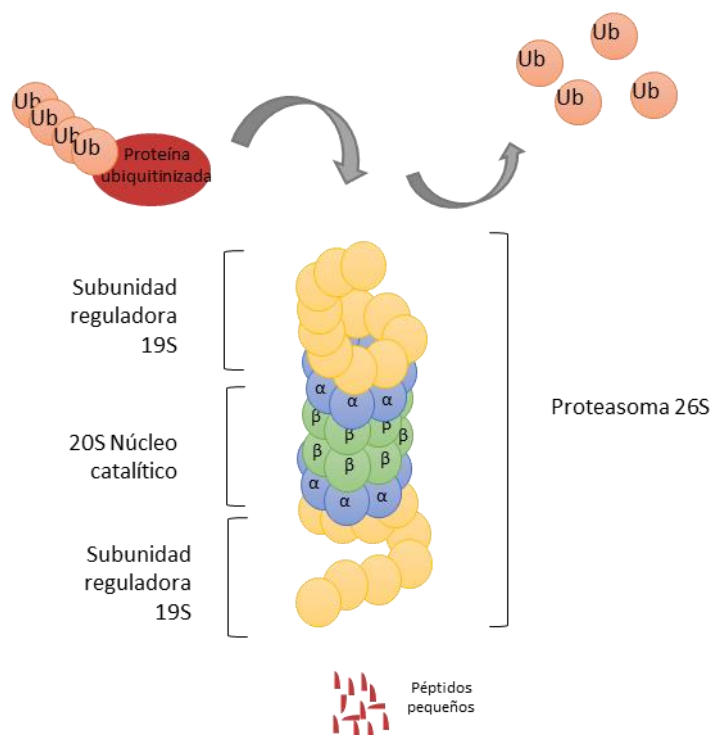


Figura 7. Esquema del sistema ubiquitina-proteasoma. El proteasoma 26S está compuesto por un núcleo catalítico 20S y dos subunidades reguladoras 19S. La subunidad 20S se encarga de degradar a las proteínas marcadas por poliubiquitina, que han sido reconocidas por las subunidades 19S. (Cuervo & Wong, 2014)

Autofagia

La autofagia es, principalmente, un mecanismo de supervivencia celular evolutivamente muy conservado ya que ocurre en todas las células eucariotas, desde levaduras hasta mamíferos. La autofagia se trata de un proceso dinámico de reciclaje por el cual membranas celulares secuestran proteínas de vida media larga y

orgánulos para su degradación por proteasas lisosomales con el fin de recuperar sus componentes (Cuervo, 2004). Este mecanismo de supervivencia permite a las células responder a los cambios ambientales, abarcando desde la adaptación a la escasez de nutrientes hasta la adaptación frente a un daño celular y, si los mecanismos resultan ineficientes, interviene en la manifestación de la muerte celular.

Este mecanismo de supervivencia es considerado como la principal ruta para la renovación de componentes citoplasmáticos que depende de la presencia de ATP y síntesis de proteínas. Se han identificado tres tipos de autofagia: microautofagia, macroautofagia, y autofagia mediada por chaperonas (AMC).

- Microautofagia, proceso por el cual el secuestro del material citoplasmático se realiza mediante una invaginación directa de la membrana lisosomal (Klionsky et al., 2008).
- AMC (Fig.8), mecanismo que permite la degradación lisosomal de proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos específica KFERQ. Esta secuencia es reconocida por la chaperona citosólica relacionada con el choque térmico de 70 kDa (HSC-70), la cual se encarga de transportar la proteína al lisosoma donde la proteína-sustrato interacciona con la proteína de membrana tipo 2A asociada al lisosoma (LAMP-2A) (Cuervo & Wong, 2014). Una vez efectuado el reconocimiento por el receptor LAMP2A, la proteína se despliega por un complejo de chaperonas para ser importada al lumen lisosomal, donde posteriormente es degradada.

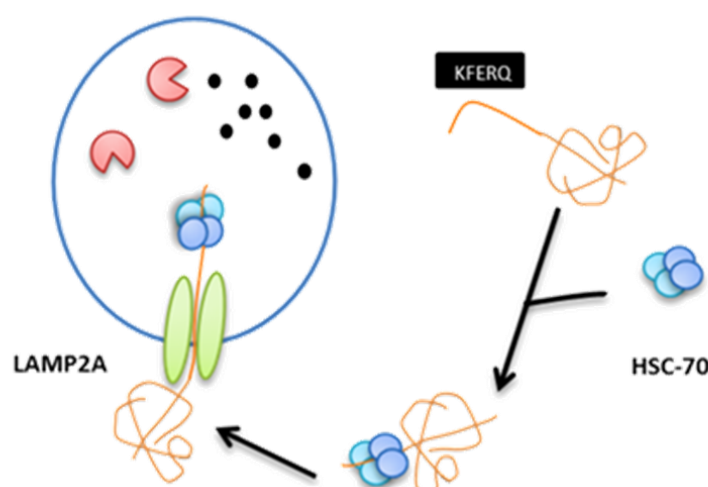


Figura 8. Esquema que muestra la autofagia mediada por chaperonas (Proteínas citosólicas específicas se transportan dentro del lisosomas a través de un complejo/receptor). LAMP-2A: proteína de membrana

tipo 2A asociada al lisosoma; HSC-70: chaperona citosólica; KFERQ: secuencia de aminoácidos específica (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln). (Cuervo & Wong, 2014).

- Macroautofagia, proceso generalmente conocido con el termino autofagia, consiste en la formación de una estructura de doble membrana llamada autofagosoma que permite el secuestro de porciones del citoplasma, moléculas y grandes orgánulos (Klionsky et al., 2008). Los genes y proteínas que constituyen la maquinaria de este proceso están bien descritos en levaduras y, en muchos de sus ortólogos mamíferos ya han sido caracterizados. Dichos genes, denominados genes relacionados con la autofagia (Atg), codifican proteínas necesarias para la inducción, generación, maduración y reciclado de autofagosomas. Por su parte, las proteínas codificadas por estos genes se han clasificado en cuatro grupos funcionales:

a) Los complejos de proteínas serina/treonina quinasas (Atg1, Atg13, Atg17) que actúan como sustratos de la diana de la rapamicina en células de mamífero (mTOR) en la inducción e iniciación de la autofagia.

b) El complejo de señalización lípido-quinasa (Atg6 o Beclin-1, Atg14, Atg34, Atg15) involucrado en procesos de nucleación vesicular.

c) El sistema de conjugación similar a ubiquitina (Atg8 o LC3, Atg7, Atg12) que participa en la elongación de la membrana vesicular.

d) Las proteínas implicadas en la ruta de reciclaje y que median el desensamblaje de las proteínas Atg de los autofagosomas maduros (Atg2, Atg9, Atg18).

Así, la macroautofagia consta de tres fases secuenciales (Fig.9): iniciación, nucleación y elongación/envoltura.

- Iniciación. En mamíferos, en la iniciación de la autofagia interviene el complejo ULK. Esta fase es estimulada por la inhibición de la quinasa mTOR.
- Nucleación. En esta fase comienza la formación de la estructura de doble membrana denominada fagóforo mediante el reclutamiento de membranas procedentes del RE, la mitocondria, el aparato de Golgi o el compartimento endosomal. El complejo formado por el fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) de clase III y Beclin-1 son los principales factores catalíticos y reguladores de este proceso.

- Elongación y envoltura. El fagóforo se expande por la acción de dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina catalizados por Atg7, el conjugado Atg12-Atg5 y por la proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos (LC3), imprescindible para el transporte y la maduración del autofagosoma (Klionsky et al., 2016). Atg4 proteoliza LC3 dando lugar a su forma citosólica, LC3-I. LC3-I es reconocido y procesado por Atg7 y Atg3, para finalmente añadir una fosfatidiletanolamina dando lugar a LC3-II y permitiendo su anclaje a la membrana, con la ayuda del complejo Atg12-Atg5.
- Transporte y fusión con los lisosomas. Finalmente, los autofagosomas se fusionan con los lisosomas formando el autofagolisosoma y se produce la degradación de los componentes celulares secuestrados.

La identificación de los sustratos a degradar se realiza a través de adaptadores autofágicos, como el receptor de carga de autofagia proporcionado por HGNC (NBR1) o la proteína de unión a ubiquitina p62 / sequestosoma 1 (p62/SQSTM1) que, a su vez, reconocen la proteína LC3-II. Concretamente, la proteína p62 marca específicamente orgánulos y agregados de proteínas para su degradación automática (Komatsu, 2011). Sin embargo, ante un bloqueo en el proceso autofágico, se detiene la degradación de las estructuras marcadas y, por consiguiente, p62 se acumula con ellas junto con agregados ubiquitinizados formando agrosomas.

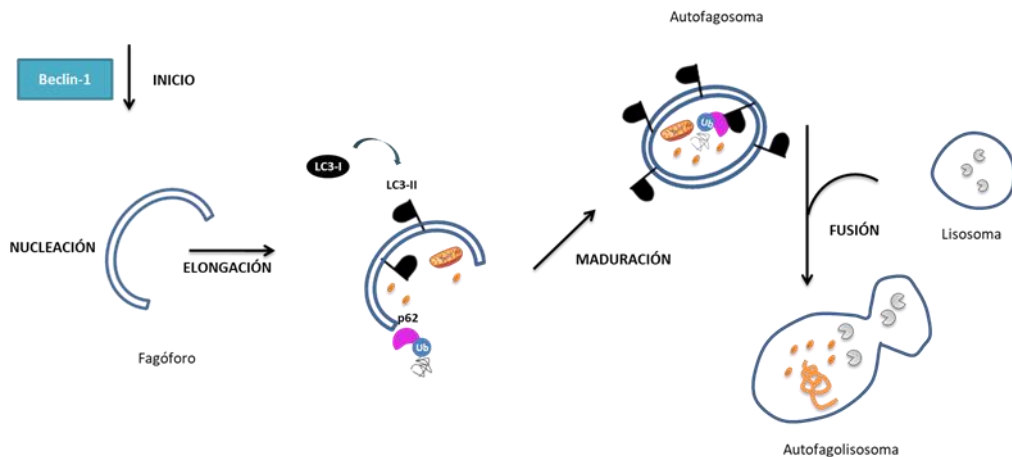


Figura 9. Diagrama que muestra el proceso de la macroautofagia (grandes porciones de citoplasma están secuestradas en estructuras de doble membrana fusionadas con lisosomas). LC3: proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos. (Lavallard, Meijer, Codogno, & Gual, 2012).

Pese a que el término macroautofagia incluye cualquier proceso no selectivo de degradación de grandes estructuras celulares en vesículas de doble membrana, se han descrito distintos tipos de autofagias selectivas en función de los orgánulos

secuestrados, recibiendo una terminología específica. Entre los distintos tipos destacan la mitofagia, la micro- y macropexofagia, la reticulofagia, la ribofagia e incluso la microautofagia gradual del núcleo. Sin embargo, todos estos procesos comparten características morfológicas y componentes moleculares comunes al descrito anteriormente.

Finalmente, cabe mencionar que la autofagia se trata de un mecanismo esencial para la renovación celular y forma parte del proceso de desarrollo celular en condiciones fisiológicas normales. De hecho, varios estudios recientes han observado que la autofagia parece estar involucrada tanto en la activación como en la diferenciación de diversos tipos de células madre (Chang, 2020). Precisamente, la diferenciación celular implica el reciclado de parte de sus moléculas y orgánulos para dar lugar a una célula diferente, con morfología y función específicas, como se ha demostrado en la diferenciación a osteoblastos a partir de células pluripotentes inducidas por reprogramación genética (Ozeki, Jethanandani, Nakamura, Ziober, & Kramer, 2007). Es más, varias investigaciones han mostrado que el factor transcripcional (Nanog), el cual ayuda a mantener la pluripotencia de las CME mediante la supresión de los factores de determinación celular, induce autofagia en condiciones de hipoxia (Noman et al., 2009).

Por ello, tanto en el contexto del envejecimiento, como en condiciones degenerativas que involucran la disminución de la capacidad regenerativa de las células madre, la autofagia resulta un proceso atractivo como blanco terapéutico o un mecanismo de preservación de las células madre en buenas condiciones para su actuación, convirtiéndose en un objetivo viable en la medicina regenerativa.

Senescencia y muerte celular

La senescencia y muerte celular son dos mecanismos implicados en la supervivencia celular y en la prevención en el desarrollo de tumores malignos. La senescencia impide la proliferación de células propensas a sufrir transformaciones neoplásicas y la muerte celular mata las células dañadas que pueden ser peligrosas para el organismo.

La senescencia celular es un fenómeno caracterizado por la detención de la proliferación de células postmitóticas como respuesta a algún tipo de daño (Rodier & Campisi, 2011) y por el mantenimiento de su actividad metabólica. Este fenómeno fue descrito por Hayflick y Moorhead en los años sesenta, cuando observaron que las células cultivadas *in vitro* cesaban su proliferación después de un número limitado de duplicaciones (Hayflick & Moorhead, 1961). Hoy en día, a este tipo de senescencia

se le conoce como senescencia replicativa (SR) y es consecuencia del acortamiento de los telómeros después de repetidas divisiones celulares (Cristofalo, Volker, Francis, & Tresini, 1998). En estudios posteriores, se demostró que la SR puede ser consecuencia de diferentes estresores independientemente del número de divisiones celulares. Entre los estresores más estudiados que provocan senescencia se encuentran el estrés oxidativo, radiación UV, hiperoxia, alteraciones de la autofagia e inhibición del proteasoma, entre otros.

Actualmente no existe un marcador universal para detectar una célula senescente, sin embargo, la senescencia celular presenta una serie de características que permiten caracterizarla:

1. Detención permanente del ciclo celular (expresan inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas).
2. Incremento en el tamaño celular.
3. Presencia de daño en el ADN.
4. Incremento en la actividad de la enzima β -Galactosidasa.
5. Secreción de un complejo patrón de citocinas denominado fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP).

La senescencia se ha asociado con la promoción o supresión de tumores, la inflamación crónica y el envejecimiento. Por todo ello, no debemos perder de vista el contexto biológico en el que se desencadena la senescencia celular.

Los estudios de los procesos que desencadenan muerte celular han avanzado enormemente, así como el conocimiento de los tipos de muerte y su relevancia para el correcto desarrollo y funcionamiento del organismo. La muerte celular es un proceso natural para eliminar células senescentes, potencialmente malignas, con lesiones celulares irreversibles o para reemplazar células sobrantes por otras nuevas. Actualmente se describen diversos subtipos de muerte celular y ésta no se encuentra restringida únicamente a necrosis y apoptosis.

La necrosis ocurre de manera aguda, es considerada una muerte celular patológica, no programada, desencadenada por toxinas, hipoxia severa, agresión masiva y cualquier otra condición que genere caída de ATP. Esto crea cambios morfológicos que incluyen pérdida temprana de la integridad de la membrana plasmática, hinchazón celular y cambios, también tempranos, en los orgánulos celulares. Debido a la pérdida de la integridad de la membrana celular, el contenido del citoplasma, incluidos los enzimas lisosomales, es liberado al espacio extracelular, produciendo la atracción de células inmunes en el área, lo que genera una respuesta inflamatoria

extensa que afecta a las células vecinas, en el cual los restos celulares son eliminados por fagocitos.

Se define como muerte celular programada al proceso de autodestrucción celular controlado genéticamente, que permite al organismo su correcta morfogénesis, así como, la eliminación de las células dañadas que amenacen la integridad de un tejido.

La apoptosis o muerte celular programada tipo I es un proceso desencadenado por condiciones fisiológicas o patológicas sin pérdida de niveles de ATP, debido a que requiere de energía para su realización. Cursa con fragmentación del ADN, condensación del citoplasma, fragmentación celular y formación de vesículas con membrana llamadas cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos apoptóticos son eliminados rápidamente por macrófagos o células vecinas con lo que no se produce una respuesta inflamatoria. Este tipo de muerte celular está regulada por un programa genético intrínseco de la célula en respuesta a señales intrínsecas o extrínsecas. Las caspasas juegan un papel esencial en su inducción y ejecución de forma que una vez activadas adquieren la capacidad de romper moléculas, dando lugar a los cambios bioquímicos y morfológicos característicos de la apoptosis.

Las caspasas actúan como proteasas con una cisteína en su sitio catalítico, que ataca residuos que se encuentran después de un ácido aspártico (en su extremo C-terminal), actuando a nivel del enlace peptídico. Se dividen en tres grupos, basados en la similitud de sus secuencias y en su función biológica.

- Caspasas inflamatorias: Son las caspasas 1, 4, 5, 11, 12, 13 y 14. Su función es principalmente la piroptosis, un tipo de muerte celular programada que ocurre ante la infección por parte de un patógeno intracelular.
- Caspasas implicadas en apoptosis, dos tipos:
 1. Iniciadoras. Son las caspasas 2, 8, 9 y 10. Su función consiste en la iniciación de la señal de apoptosis.
 2. Efectoras. Son las caspasas 3, 6 y 7. Su función consiste en una proteólisis masiva que resulte en apoptosis.

El mecanismo molecular de la autofagia puede ser reconducido como una forma alternativa de muerte celular independiente de caspasas denominada muerte celular programada de tipo II o autofágica (Gozuacik & Kimchi, 2004). Al igual que la muerte celular apoptótica, la muerte celular autofágica es esencial para la regulación del crecimiento celular, el mantenimiento de la homeostasis, la defensa celular y la adaptación a un ambiente adverso. En los últimos años se ha relacionado el papel que podría tener la muerte celular en el mantenimiento de las células madre, se ha

barajado como hipótesis la posible relación que podría existir entre la muerte celular y la diferenciación favoreciendo el mantenimiento del estado pluripotente al inhibir la muerte celular (Presa Torre, 2013).

OBJETIVOS

Aunque la ingeniería tisular, la medicina regenerativa y las terapias basadas en células madre han avanzado en los últimos diez años, surgen nuevas preguntas de cara al futuro de la terapia celular. Concretamente, las principales incógnitas a las que se enfrenta este campo de investigación se centran en definir qué mecanismos celulares son claves en la regulación de la supervivencia y la determinación del destino de las células madre, con el fin de buscar estrategias terapéuticas dirigidas que permitan por ejemplo reestablecer la función normal de los órganos tras una lesión de una manera efectiva. Por ello, el presente trabajo de tesis doctoral se ha enfocado en identificar las alteraciones y los mecanismos celulares que afectan a la pluripotencia y capacidad de diferenciación de dos tipos de células madre (células madre embrionarias pluripotentes P19 y células precursoras miogénicas C2C12), centrándose principalmente en el estudio de los sistemas de control de calidad celular con el fin de desentrañar su relevancia funcional en estos procesos. Asimismo, en este trabajo también se han evaluado los efectos beneficiosos de la melatonina sobre el potencial de diferenciación de las células progenitoras miogénicas que presentan senescencia celular.

Los objetivos específicos de esta tesis doctoral fueron:

1. Evaluar el metabolismo redox y las respuestas antioxidantes sobre la supervivencia y proliferación de las células madre embrionarias P19.
2. Analizar el papel de la vía PI3K/AKT/mTOR y de la apoptosis en el mantenimiento de la pluripotencia y la capacidad de diferenciación de células madre embrionarias P19.
3. Evaluar el papel de los sistemas de control de calidad de proteínas (respuesta a proteínas mal plegadas, sistema ubiquitina-proteasoma y autofagia) en el mantenimiento de la troncalidad y potencial de diferenciación de células madre embrionarias P19 y células precursoras miogénicas C2C12.
4. Evaluar los efectos del tratamiento de mioblastos C2C12 jóvenes y senescentes con diversas dosis de melatonina, poniendo especial atención a los sistemas de control de calidad de proteínas.
5. Analizar el potencial terapéutico de la melatonina frente a las alteraciones celulares inducidas por la senescencia en mioblastos C2C12 e identificar una dosis que favorezca el restablecimiento del programa miogénico.

MATERIAL Y MÉTODOS

CULTIVO CELULAR, DIFERENCIACIÓN Y TRATAMIENTO

CÉLULAS P19

Las células de carcinoma embrionario P19 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (CRL-1825) y se cultivaron en medios que contenían glucosa o galactosa (sin glucosa) a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. El medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con alto contenido de glucosa (Sigma, D5648) se complementó con 10 % de suero bovino fetal (FBS) (Gibco, 10270-106), 1,8 g/L de bicarbonato de sodio (Sigma, S5761), 110 mg/L de piruvato de sodio (Sigma, P5280) y 1% de solución antibiótica/antimicótica (Sigma, A5955). El medio que contenía galactosa (sin glucosa) se preparó usando DMEM sin glucosa (Sigma, D5030) suplementado con FBS al 10% (Gibco, 10270-106), 1,8 g/L de bicarbonato de sodio (Sigma, S5761), 110 mg/L de piruvato de sodio (Sigma, P5280), 1,8 g/l de galactosa (Sigma, G5388), 0,584 g/L L-glutamina (Sigma, G3126) y 1% de solución antibiótica/antimicótica (Sigma, A5955). Las células madre P19 se mantuvieron en estado indiferenciado cultivándolas en monocapa y realizando pases cada 2 días con una dilución de 1:20 a 1:30. Para iniciar la diferenciación neuroectodérmica, se sembraron células P19 a una densidad de $5,2 \times 10^3$ células/cm² y se trataron con una única dosis de ácido retinoico (AR) 1 μ M (Sigma, R2625) durante 96 horas. Por consiguiente, en este estudio se utilizaron dos condiciones experimentales: Células madre embrionarias P19 indiferenciadas (P19-CM) y células P19 diferenciadas (P19-CD). Todos los experimentos se realizaron después de 4 días de diferenciación.

CÉLULAS C2C12

La línea celular C2C12, un subclon de mioblastos de ratón CH3, se obtuvo de la American Type Culture Collection (CRL1772). Las células C2C12 se cultivaron con DMEM con alto contenido de glucosa (Sigma, D5648) suplementado con 10% de FBS (Gibco,102700-106), 1,8 g/L de bicarbonato de sodio (Sigma, S5761) y 1% de solución antibiótica/antimicótica (Sigma, A5955) a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5 %.

Para alcanzar la SR se utilizó el modelo de duplicación de población (DP) múltiple. Las células C2C12 con rangos de DP menores de 65 se las denominó C2C12 Jóvenes (C2C12-J), mientras que aquellas células que presentaban rangos de DP mayores de 65 se las denominó C2C12 Senescentes (C2C12-S) ya que su potencial

proliferativo se vio reducido notablemente, como se describe en la literatura (Ochoa, 2019; Sharples, Al-Shanti, Lewis, & Stewart, 2011). Ambas condiciones experimentales fueron cultivadas en monocapa sin permitir que llegaran a superar un 80% de confluencia. Se les realizó pases cada 48 horas a una dilución 1:15.

Las células C2C12-J y C2C12-S, una vez que alcanzaron el 90% de confluencia, se diferenciaron durante 7 días en miotubos mediante su cultivo con DMEM que contenía suero de caballo al 2 % (Gibco, 16050122). Como resultado de la diferenciación se obtuvieron las siguientes condiciones experimentales: miotubos C2C12 jóvenes (Miotubos C2C12-J) y miotubos senescentes (Miotubos C2C12-S). El medio de diferenciación se cambió cada 48 horas.

CINÉTICA DEL CRECIMIENTO CELULAR

Las células C2C12 se sembraron a una densidad de 5×10^3 células/cm². Cuando las células alcanzaron el 80 % de confluencia, se contaron en un contador de células automatizado TC10 (BioRad) tras realizar una dilución 1:2 con el colorante Trypan Blue (Sigma, T8154). El ciclo de duplicación (DP) y el tiempo de duplicación (TD) fueron calculados usando las siguientes ecuaciones: $DP = (\log \text{ número final de células cultivadas} - \log \text{ número inicial de células sembradas}) / \log 2$ y $TD = (\log 2 \times \text{ tiempo}) / (\log \text{ número final de células cultivadas} - \log \text{ número inicial de células sembradas})$. Se calculó el DP y el TD durante 2 meses, lo que resultó en un total de 30 pases. El experimento fue realizado para monitorear las tasas de crecimiento y determinar la senescencia de la línea celular C2C12.

TRATAMIENTO CON MELATONINA

Los mioblastos C2C12-J y C2C12-S fueron cultivados en DMEM y tratados con diferentes concentraciones de melatonina (Sigma, M5250) durante 72 horas. Las concentraciones de melatonina testadas en este estudio fueron 100 μ M, 50 μ M, 1 μ M, 100 nM y 1 nM.

Los miotubos C2C12-J y C2C12-S fueron tratados previamente con las concentraciones 100 μ M y 1 nM para después iniciar el proceso de diferenciación de mioblastos a miotubos como se describió en el primer apartado.

La melatonina se disolvió en etanol no superando el 0,95 % de éste en todas las concentraciones a estudio y teniendo en cuenta su solubilidad. Los mioblastos y miotubos tanto jóvenes y senescentes no tratados con melatonina (grupos control), recibieron una dosis comparable del vehículo. Los experimentos se realizaron

después del tratamiento con melatonina en el caso de los mioblastos C2C12-J y C2C12-S y pasados los 7 días de diferenciación en el caso de los miotubos C2C12.

ANÁLISIS DEL COMPARTIMENTO LISOSOMAL

Para marcar los cuerpos lisosomales, se cultivaron las P19-CM y P19-CD en μ -Slides de 8 pocillos ibiTreat (ibidi, 80826). El día del experimento se retiró el medio de cultivo y las células se incubaron con 75 nM LysoTracker Green (Invitrogen, L7526), una amina débilmente básica que se acumula selectivamente en compartimentos celulares con pH interno bajo, en DMEM durante 45 min. Tras el período de incubación, el medio de cultivo utilizado se reemplazó por DMEM fresco. Se tomaron imágenes de las células con el microscopio confocal TCS-SP8X y el análisis de imágenes se realizó en el software Image J.

DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

Para medir los niveles de ROS intracelulares, se incubaron un total de 1×10^6 células/mL de P19-CM y P19-CD con la sonda CM- CM-H2DCFDA (Invitrogen, C6827) diluida en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) (14025092, Gibco) a una concentración final de 7,5 μ M. Tras una incubación de 30 minutos en oscuridad a 37 °C, se lavaron dos veces con HBSS y se midió la fluorescencia utilizando un citómetro de flujo Cytoflex S (Beckman Coulter). Finalmente, se realizó el análisis cuantitativo de la intensidad de la fluorescencia mediante el software CityExpert 2.3. Los resultados se expresan como unidades de fluorescencia relativa.

DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO

La concentración de nitrato/nitrito se midió como indicador de la producción de RNS utilizando el reactivo de Griess de acuerdo al método citado por Grisham. (Grisham, Johnson, & Lancaster, 1996). Para ello, se añadieron 100 μ L del reactivo de Griess (sulfanilamida al 1 % y naftilendiamina al 0,1 % en ácido fosfórico al 5 %) a 100 μ L de P19-CM y P19-CD. Tras 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la densidad óptica a 540 nm en un lector de microplacas (BioTek PowerWave). Para determinar las concentraciones de nitrito de las muestras experimentales estudiadas, se realizó una comparativa con las absorbancias obtenidas a partir de soluciones estándar de nitrito de sodio preparadas en medio de cultivo. Los resultados están expresados como μ mol NO^{-2} /mg proteína.

DEFENSA ANTIOXIDANTE CELULAR

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

La actividad antioxidante total (AAT) en la línea celular P19 de ambas condiciones experimentales se determinó siguiendo una adaptación del protocolo desarrollado por (Arnao, Cano, & Acosta, 2001). En este ensayo, a partir de la reacción entre el ácido 2, 2'-azino-bis (3-etil-benzotiazonil-6-sulfónico) (ABTS) con H_2O_2 y catalizada por la peroxidasa de rábano (HRP) se forma el radical ABTS $\cdot+$ que posee un espectro de absorbancia característico con máximos a 730 nm. A continuación, se añade la muestra al radical preformado y se mide la desaparición del radical neutralizado por la muestra a 730 nm durante 15 minutos, permitiendo determinar la AAT. Los resultados están presentados como mg equivalentes Trolox / mg proteína.

ACTIVIDAD DE LA CATALASA

La actividad de la catalasa (CAT) se midió en la línea celular P19 usando el método descrito por Lubinsky y Bewley (Lubinsky & Bewley, 1979), basado en la conversión del H_2O_2 en H_2O y O_2 y utilizando H_2O_2 como sustrato. Para ello, a las muestras se les añadió 30% H_2O_2 diluido en un tampón fosfato de sodio 50mM pH 7. La conversión de H_2O_2 en H_2O y O_2 se midió en una placa ultravioleta a 240 nm durante 4 minutos a 25°C. Los resultados están expresados como $\mu\text{mol } H_2O_2 / \text{mg proteína} \cdot \text{min}$

ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se midió en la línea celular P19 usando el método citado por Martin y colaboradores (J. P. Martin, Jr., Dailey, & Sugarman, 1987). Este método mide la capacidad de esta enzima de inhibir, a un pH 6,8-7,8, la autooxidación de la hematoxilina en hemateína, producto que presenta un grupo cromóforo rojo brillante. Los resultados están expresados como unidades SOD/mg proteína.

ACTIVIDAD DEL GLUTATIÓN REDUCIDO Y OXIDADO

La actividad del glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) se evaluaron por HPLC (Gilson) con detección fluorimétrica (excitación a 385 nm y emisión 515 nm) de acuerdo con las instrucciones descritas en el kit Immunodiagnostik (Immunodiagnostik AG, KC1800). Los resultados están expresados $\mu\text{mol/mg}$ proteína.

DAÑO OXIDATIVO

DAÑO OXIDATIVO DE PROTEÍNAS

El daño oxidativo a proteínas se determinó en la línea celular P19 usando los métodos descritos por Levine y cols. (Levine et al., 1990). con modificaciones de Coto-Montes y Hardeland (Coto-Montes & Hardeland, 1999). Los resultados están presentados como nmol proteínas carboniladas / mg proteína.

DAÑO OXIDATIVO DE LÍPIDOS

Los productos finales de peroxidación lipídica malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE) se determinaron usando el método de 1-metil-2-fenilindol, basado en la condensación del agente cromogénico 1-metil-2-fenilindol con MDA o 4-HNE (Gerard-Monnier et al., 1998). Para ello, primero se preparó una curva estándar con 1,1,3,3-tetrametoxipropano y luego se les añadió tanto a la curva estándar como a las muestras a estudiar 1-metil-2-fenilindol 10,3mM previamente diluido en acetonitrilo/metanol (1:3) y ácido metanosulfónico. Tras una incubación de 40 minutos a 45°C y 15 minutos en hielo, las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 5 minutos a 4°C y finalmente se midió la absorbancia a 586nm. Los resultados obtenidos están presentados como nmol MDA+4-HNE / mg proteína

ENSAYO DE CÉLULAS VIVAS/MUERTAS

La determinación de los porcentajes de células vivas y muertas se realizó mediante la utilización de los reactivos calceína-AM (Invitrogen, C1430) y yoduro de propidio (Sigma Aldrich, P4864). Para ello, 1×10^6 células fueron resuspendidas en HBSS/Ca (Gibco, 24020117) y tratadas con calceína-AM 0,1 μ M y yoduro de propidio 8 μ M durante 20 minutos a temperatura ambiente. La fluorescencia se midió con el sistema de citometría de flujo FACS (Becton Dickinson FACScalibur) con una longitud de onda de excitación de 488 nm. La medición simultánea de la fluorescencia de calceína/yoduro de propidio se realizó utilizando un filtro de paso de banda de 530/30 nm para la calceína y un filtro de paso de banda de 610/20 nm para la fluorescencia roja de yoduro de propidio. Los resultados se expresan como porcentaje del control (solo vehículo) para cada punto de tiempo.

INMUNOENSAYO POR WESTERN BLOT

Se recogieron las células P19 y C2C12 con sus respectivas condiciones experimentales por tripsinización, se lavaron con PBS y se centrifugaron durante 5 minutos a 1250 g. El sedimento celular de cada condición experimental se

resuspendió en tampón RIPA (Sigma, R0278) suplementado con ditioneitol 2 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 100 μ M y con un cóctel inhibidor de proteasas que contenía 1 μ g/mL de leupeptina (Roche, 11017101001), antipain (Roche, 11004646001), quimostatina (Roche, 11004638001) y pepstatina A (Roche, 10253286001). Tras romper los sedimentos celulares por sonicación, éstos fueron almacenados a -80°C hasta su uso. La concentración de proteína que presentaba cada muestra se determinó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). El lisado celular (50 μ g) se mezcló con tampón Laemmli (Bio-Rad, 161-0737) y se desnaturizó a 100°C durante 5 minutos. Las muestras se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8, 10, 12, 14 o 16% con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) a 200V y posteriormente se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) a 350 mA. Las membranas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 10 % en TBS-T (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 NaCl 150 mM y Tween-20 al 0,1 %) durante 1 hora a temperatura ambiente y, posteriormente se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios dirigidos contra SOD2 (sc-18504), NRF2 (sc-722), ATF6- α (sc-22799), P53 (sc6243), SPTAN1 (sc-46696), CTSD/catepsina D (sc -6486), MTOR (sc-8319), p-MTOR (S2448) (sc-101738), DNM1L (sc-32898), OPA1 (sc-30573), TOMM20 (sc-11415), β -TUBULINA III (sc-80005), MYOD (sc-760) de Santa Cruz Biotechnology; p-EIF2S1 (S51) (3398), IRE1 α (3294), CHOP (2895), UBIQUITINA (3933), BCL2 (2870), BAX (2772), CASP3 escindido (9661), AKT (9272) , p-AKT (S473) (9271), P70S6 (9202), BECN1/Beclin-1 (3495), ATG3 (3415), ATG7 (D12B11), ATG12 (4180), OCT4 (2840), SOX2 (2748) de Cell Signaling Technology; LAMP2A (Ab18528), MYF5 (Ab125078), Miogenina (MYOG) (Ab1835), PAX7 (Ab199010), NANOG (ab80892) de Abcam; LC3 (PD014), p62/SQSTM1 (PM045) de MBL International; PAX3 (MAB2457, R&D System, MN, USA), SHC1 (BD Biosciences, 610879), p-SHC1-1/p66SHC (S36) (Calbiochem, 566807), BNIP3L (Sigma, N0399), DRAM1 (Rockland, 600-401-A70) y TROMA1 (Banco de Estudios de Desarrollo de Hibridomas). Los anticuerpos primarios utilizados fueron diluidos a una concentración 1:1000 en TBS-T que contiene 1% de leche desnatada en polvo y 0,02% de azida sódica. Finalizado el tiempo de incubación, las membranas se lavaron tres veces durante 5 min en TBS-T y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con su correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante IgG preparado a una concentración 1:10000 en TBS-T que contiene 1% de leche desnatada en polvo. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes: anti-*rabbit* (Cell Signaling Technology, 7074), anti-*goat* (Santa Cruz Biotechnology, sc- 2020) o anti-*mouse* (Cell Signaling Technology, 7076). Tras realizar tres lavados de 10 min en TBS-T, las

membranas se revelaron utilizando un sustrato de peroxidasa de rábano picante quimioluminiscente (Millipore, WBKLS05500) siguiendo las instrucciones descritas en el protocolo proporcionado por el fabricante. Las densidades ópticas de las bandas de proteína se analizaron utilizando el software Image Studio Lite 3.1.4 (LI-COR Biosciencie). Los resultados obtenidos fueron normalizados utilizando la tinción de Ponceau S que sirvió como control de carga. Los resultados se expresaron como porcentaje de células P19-CM y/o C2C12-J o Miotubos C2C12-J, siguiendo las sugerencias descritas en la literatura (Romero-Calvo et al., 2010; Thacker, Yeung, Staines, & Mielke, 2016).

ACTIVIDADES DE LAS CASPASAS

Se analizó la actividad de la caspasa 3, la caspasa 8 y 9 en los estratos celulares de las diferentes condiciones experimentales obtenidas a partir de la línea celular P19, mediante ensayos colorimétricos basados en la escisión proteolítica de un sustrato compuesto por el cromóforo p-nitroanilida (pNA) y un tetrapéptido sintético. Para ello, los extractos celulares se tripsinizaron y se lavaron con PBS. Posteriormente, las células se recolectaron tras realizar una centrifugación a 300 g durante 3 minutos. El pellet celular obtenido se resuspendió en el tampón de lisis HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, CHAPS al 0,1 %, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM. Las muestras se mantuvieron en hielo durante 20 minutos y tras cuantificar la concentración proteica utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976), se diluyeron 25 µg del extracto proteico con tampón de ensayo (HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, CHAPS al 0,1 %, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, glicerol al 10 %). El tampón de ensayo había sido previamente suplementado con el sustrato correspondiente: Ac-DEVD-pNA 100 µM (Merck Millipore, 235400), Ac-LEHD-pNA 200 µM (Merck Millipore, 218805) o Ac-IETD-pNA 200 µM (BioVision, 1063) para medir las actividades de la CASP3, la CASP9 y la CASP8, respectivamente. La absorbancia se midió a 405 nm en un lector de placas VICTOR X3 (Perkin Elmer) después de 2 horas de incubación a 37 °C. La actividad similar a la caspasa se expresó como pmol de pNA / µg de proteína.

ACTIVIDAD DEL PROTEASOMA 20S

La actividad del proteasoma se midió utilizando el kit de ensayo de la actividad del proteasoma 20S (Millipore, APT280). Para realizar este ensayo se utilizaron los lisados celulares de las diferentes condiciones experimentales obtenidas a partir de la línea celular P19 que habían sido previamente almacenados a -80°C. Para ello, en una placa de 96 pocillos, las células se incubaron con 80 µL de tampón de ensayo (HEPES 250 mM, pH 7,5, EDTA 5 mM, NP-40 al 0,5 %, SDS al 0,01 %) y con 10 µL

del sustrato del proteasoma LLVY-7-amino- 4-metilcumarina (AMC). Por otra parte, las diversas condiciones experimentales testadas también fueron tratadas con 25 μ L del inhibidor del proteasoma lactacistina. Adicionalmente, también se añadió a la placa 10 μ L del control positivo de proteasoma 20S (25 μ L de proteosoma 20S en HEPES 50 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, DTT 1 mM). Asimismo, se preparó una curva estándar con concentraciones de AMC comprendidas en un rango entre 0,04 μ M y 12,5 μ M. Tras 1-2 horas de incubación a 37°C, se leyó la fluorescencia en un lector de microplacas (BioTek PowerWave) utilizando un filtro de 380/460 nm. Los resultados se representan como unidades absorbancia / μ g de proteína.

ACTIVIDAD DE LA CATEPSINA B Y CATEPSINA D

Las actividades de CTSB y CTSD se midieron por detección fluorimétrica y espectrofotométrica respectivamente, siguiendo el protocolo descrito previamente (Petrosillo, Ruggiero, & Paradies, 2003). Se recogieron 1×10^6 células de las diferentes condiciones experimentales obtenidas a partir de la línea celular P19 y se resuspendieron en un tampón de lisis (100 mM NaCl, 0,1% CHAPS, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 50 mM HEPES pH 7,4. Las muestras se mantuvieron en hielo durante 20 minutos y, posteriormente, se cuantificó la concentración de proteínas. Para medir la actividad similar a CTSB, las células se incubaron con Z-Arg-Arg-N-metil-cumarina 40 μ M (Sigma, C5429) en acetato de sodio 100 mM pH 5,5, EDTA 1 mM, DTT 5 mM y 0,1% Brij-35 a 37°C durante 20 minutos. A continuación, se añadieron 150 μ L de tampón de parada (acetato de sodio 33 mM pH 4,3 y cloroacetato de sodio 33 mM) para detener la reacción enzimática. La actividad de CTSB se determinó mediante la detección de la N-metil-cumarina (Sigma, A9891) por fluorimetría a 360 nm de excitación y 460 nm de emisión en un lector VICTOR X3 (Perkin –Elmer, Boston, MA, EE. UU.). El método se calibró con concentraciones conocidas de N-metil-cumarina. Para la determinación de la actividad de CTSD, las células se incubaron con 125 μ L de hemoglobina al 3% (Sigma, H2625) en ácido acético 200 mM a 4°C durante 30 min. Tras la incubación, a las muestras se les añadió 125 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 15% y se mantuvieron a 4°C durante 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a 13400 g durante 5 minutos y la actividad de la CTSD se determinó en el sobrenadante por cuantificación espectrofotométrica a 280 nm en un lector de placas múltiples Cytation 3 (BioTek Instruments).

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Se realizaron ensayos de microscopía electrónica para examinar la complejidad del sistema endo-lisosomal en las células P19-CM y P19-CD. Las células se recogieron

por tripsinización, se lavaron y se fijaron para microscopía electrónica en glutaraldehído al 3% diluido en tampón de cacodilato de sodio 0,1 M, pH 7,3 durante 2 horas a 4 °C. Posteriormente, las células se centrifugaron durante 3 minutos a 2500 g, se lavaron con tampón de cacodilato y se incubaron en OsO₄ al 1 % en tampón de cacodilato de sodio durante 2 h. Los sedimentos se lavaron de nuevo en tampón de cacodilato de sodio y se incluyeron en agar al 1%. Finalmente, las muestras se deshidrataron en etanol y se incluyeron en resina de Spurr. Se utilizó un ultramicrotomo LKB Ultratome III (GE Healthcare) para obtener secciones finas que posteriormente se tiñeron con acetato de uranilo metanólico seguido de citrato de plomo.

Las secciones fueron examinadas con un microscopio electrónico JEOL Jem-100SX (JEOL) operado a 80 kV. Se tomaron cuarenta micrográficas de cada muestra para estudiar el sistema endo-lisosomal en ambos grupos de células.

AISLAMIENTO DE EXTRACTOS MITOCONDRIALES

Los extractos mitocondriales se aislaron recolectando células P19 mediante tripsinización y centrifugándolas a 1000 × g. Los pellets se lavaron una vez en PBS frío y se centrifugaron nuevamente 1000 × g a 4 °C. A continuación, la suspensión celular se resuspendió en 0,5 ml de tampón de sacarosa enfriado con hielo (sacarosa 250 mM, HEPES 20 mM pH 7,5, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 1 mM) complementado justo antes utilizar con DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM y cóctel de inhibidores de proteasa que contiene 1 mg/ml de leupeptina, antipain, quimostatina y pepstatina. Luego, la suspensión se incubó en hielo durante 20 a 30 minutos. Después de la incubación, las células se transfirieron a un homogeneizador de tejidos pre-enfriado y se homogeneizarán 30 veces usando un mortero hermético, mientras se mantenía el homogeneizador en hielo. El progreso se monitoreó cada 20-30 movimientos bajo un microscopio de contraste de fase y se detuvo cuando se rompió más del 90% de las células. Las células homogeneizadas se centrifugaron a 3500 × g durante 5 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante que contenía fracción mitocondrial y citosólica. Luego, el sobrenadante recolectado se centrifugó nuevamente a 10,000 × g durante 15 min a 4 °C. El sedimento, correspondiente a la fracción mitocondrial, se resuspendió en 50 µl del tampón de sacarosa citado anteriormente.

DETERMINACIÓN DEL FLUJO AUTOFÁGICO

Para medir el flujo autofágico, se bloqueó la fusión de autofagosomas con lisosomas tratando las células con bafilomicina A1 (Cayman, 11038). Las células se sembraron

a 2×10^4 células/mL para P19-CM y 5×10^3 para P19-CD, en el caso de la línea celular C2C12 se sembraron 5×10^3 células/mL para mioblastos C2C12-J y C2C12-S previamente tratados con las concentraciones 100 μ M, 1 μ M y 1nM durante 72 horas. En el caso de los Miotubos C2C12-J y Miotubos C2C12-S se sembraron el mismo número de células que los mioblastos C2C12 sin embargo el tratamiento previo con melatonina fue con las concentraciones 100 μ M y 1 nM durante 72 horas además de inducir su diferenciación añadiendo suero de caballo al 2 % (Gibco, 16050122) al medio de cultivo durante 7 días. Veinticuatro horas después de la siembra, se trataron durante 24 horas con 0,2 μ M de bafilomicina A1. Para determinar el flujo autofágico se detectó la acumulación LC3-II (MBL, PD014) de células completas y para medir el flujo mitofágico en las células P19-CM y P19-CD se detectaron SQSTM1/p62 (MBL, PM045) y TOMM20 (*Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 20*, Santa Cruz Biotechnology, sc-11415) en extractos mitocondriales, por western blot como se describe anteriormente.

APOPTOSIS

Para evaluar la respuesta apoptótica se utilizó el kit de detección de apoptosis con anexina V-isotiocianato de fluoresceína (FICT) (Sigma, APOAF). Para ello, se recogieron tanto las células adherentes como las flotantes en el medio de todas las condiciones experimentales de la línea celular C2C12. Se lavaron dos veces con PBS frío y se resuspendieron en 250 μ L de tampón de unión a una densidad celular de $2,5 \times 10^5$ células/mL. Posteriormente, las células fueron tratadas con 5 μ L de Anexina V-FICT y 10 μ L de solución de yoduro de propidio en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células tratadas se analizaron utilizando un citómetro de flujo Cytotflex S (Beckman Coulter) con una longitud de onda de excitación de 488 nm. La medición simultánea de la fluorescencia de Anexina-V-FICT/PI se realizó utilizando un filtro de paso de banda de 530 nm para anexina-V-FICT y un filtro de paso de banda de 610/20 nm para fluorescencia de PI. Los porcentajes de células en necrosis, apoptosis temprana y apoptosis tardía se determinaron utilizando el software CytExpert 2.1.

TRANSFECCIÓN CELULAR

Las células se transfectaron con 50 nM de oligonucleótido de siARN Atg7 (SI00900529, Qiagen) o con un siARN codificado (D-001810-03-20; Dharmacon). Para realizar el ensayo, 24 horas antes de la transfección, se sembraron células P19 a una densidad de $7,5 \times 10^3$ células/cm². La transfección transitoria se realizó utilizando el reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con

las instrucciones del fabricante. Con el fin de verificar si el silenciamiento de Atg7 influye en la capacidad de diferenciación, las células P19 se sometieron al protocolo de diferenciación 24 horas después realizada la transfección.

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación celular se midió mediante el ensayo de sulforhodamina B (SRB) siguiendo el protocolo descrito previamente (Orellana & Kasinski, 2016) (Silva et al., 2016). Para ello, las células se sembraron en placas de 48 pocillos a una concentración de 5×10^3 células/mL para P19-CM y 2×10^4 células/mL para P19-CD. Veinticuatro horas después de la siembra, las células se trataron dentro de cada pocillo con el inductor específico de estrés oxidativo H_2O_2 (500 μ M y 1 mM), con el inhibidor de MTOR rapamicina (0,1 nM, 10 nM y 100 nM) y con el inhibidor de PI3K 3-MA (2, 5 mM y 5 mM) para evaluar su efecto sobre la proliferación celular. Ambos tipos de células también se transfectaron con el oligonucleótido siARN Atg7 (si-Atg7) o con un siARN codificado (si-Control). Tras realizar tratamientos de 72 horas con 3-MA, rapamicina y siARN, y tratamientos de 2, 4 y 6 horas con H_2O_2 , se retiró el medio y se lavaron los pocillos con PBS al 1%.

Por otra parte, las células C2C12-J y C2C12-S se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 5×10^3 células/mL. Posteriormente, las células se trataron con diferentes concentraciones de melatonina (100 μ M, 50 μ M, 1 μ M, 100nM y 1nM) durante 24, 48, 72 y 96 horas, periodo tras el cual se retiró el medio y se lavaron los pocillos con PBS al 1%.

A continuación, ambas líneas celulares se fijaron añadiendo ácido acético al 1 % diluido en metanol durante al menos 2 horas a -20 °C. Posteriormente, se descartó la solución de fijación y las placas se secaron en estufa a 37 °C. Se añadieron 250 μ L de SRB al 0,5 % (Sigma, S9012) en solución de ácido acético al 1 % y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. A continuación, los pocillos se lavaron con ácido acético al 1% en agua y se secaron. Se añadieron 500 μ L de Tris, pH 10 y las placas se agitaron durante 30 min. Finalmente, el sobrenadante se transfirió a placas de 96 pocillos y se midió la densidad óptica a 540 nm). Los datos se expresan como el porcentaje promedio de absorbancia de SRB.

CICLO CELULAR

Se analizó el ciclo celular en función del contenido de ADN celular. Para ello, se recogieron 1×10^6 células C2C12-J y C2C12-S tratadas con melatonina (100 μ M, 1 μ M y 1 nM), previamente lavadas con PBS y se fijaron añadiendo etanol frío al 70%

(-20 °C). Posteriormente, las células se centrifugaron a 850 g para eliminar el etanol, se lavaron dos veces con PBS y finalmente se resuspendieron en 400 µL de PBS. Las células fueron tratadas con yoduro de propidio a una concentración de 20 µg/mL (Sigma, P4864) y un cóctel de RNasa a 10 µg/mL (Sigma, R5000) durante 30 min a 37 °C. Se analizaron un total de 20×10^3 eventos por muestra utilizando el citómetro de flujo Cytoflex S (Beckman Coulter). Los porcentajes de células que se encuentran G1/G0, S y G2/M se determinaron usando el software CytExpert 2.1.

MEDICIÓN DEL NIVEL DE CALCIO MITOCONDRIAL

El nivel de calcio (Ca^{2+}) mitocondrial se analizó en la línea celular C2C12 tanto en células jóvenes como senescentes previamente tratadas con melatonina (100 µM, 1 µM y 1 nM) (células vivas) con el indicador fluorescente de Ca^{2+} Rhod-2-AM (Invitrogen, R1245MP). Para ello, se sembraron 3×10^4 células en un µ-Slide abierto de ocho pocillos (Ibidi, 80826) y se incubaron en la oscuridad con 5 µM Rhod-2-AM durante 60 minutos a 37°C. Tras realizar dos lavados con HBSS (Gibco, 14025092), se midió la señal de fluorescencia de estas células utilizando el microscopio confocal Leica TCS-SP8X, con longitudes de onda de excitación y emisión de 552 y 581 nm, respectivamente.

POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi\text{M}$)

Los cambios en el $\Delta\Psi\text{m}$ se evaluaron en los mioblastos C2C12 jóvenes y senescentes previamente tratados con melatonina (100 µM, 1 µM y 1 nM) durante 72 horas utilizando el kit de ensayo MitoProbe TMRM (éster metílico de tetrametilrodamina) (Thermo Fisher Scientific, M20036). TMRM es un tinte catiónico lipofílico que se acumula en las mitocondrias polarizadas, mientras que su fluorescencia disminuye después de la despolarización de la membrana mitocondrial. Se incubó una densidad de 1×10^6 células/mL con TMRM 20 nM durante 30 min a 37 °C y 5 % de CO_2 . Tras la incubación, se eliminó el colorante y las células se resuspendieron en 500 µL de PBS. La fluorescencia se midió utilizando un citómetro de flujo Cytoflex S (Beckman Coulter) a longitudes de onda de excitación y emisión de 561 y 585 nm, respectivamente. Los resultados se expresan como unidades de fluorescencia relativa de TMRM.

MEDICIÓN DE ATP

El kit de ensayo bioluminiscente de adenosina 5'-trifosfato (ATP) (Sigma, FLAA) se utilizó para determinar los niveles intracelulares de ATP en mioblastos C2C12 jóvenes y senescentes previamente tratados con melatonina (100 µM, 1 µM y 1 nM) durante

72 horas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo se midieron los niveles de intensidad de bioluminiscencia con un luminómetro SIRIUS (Berthold, Pforzheim) que se produce tras el consumo de ATP cuando la luciferasa cataliza la oxidación de D-luciferina. Las concentraciones de ATP se expresaron como nmol de ATP/g de proteína.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como valores medios \pm desviación estándar (D.E.), calculados a partir de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las comparaciones múltiples se llevaron a cabo usando ANOVA de una o dos vías, según fuera apropiado, seguido de la prueba post hoc de Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Los análisis estadísticos e histogramas se realizaron con el software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

DISEÑO EXPERIMENTAL DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS P19

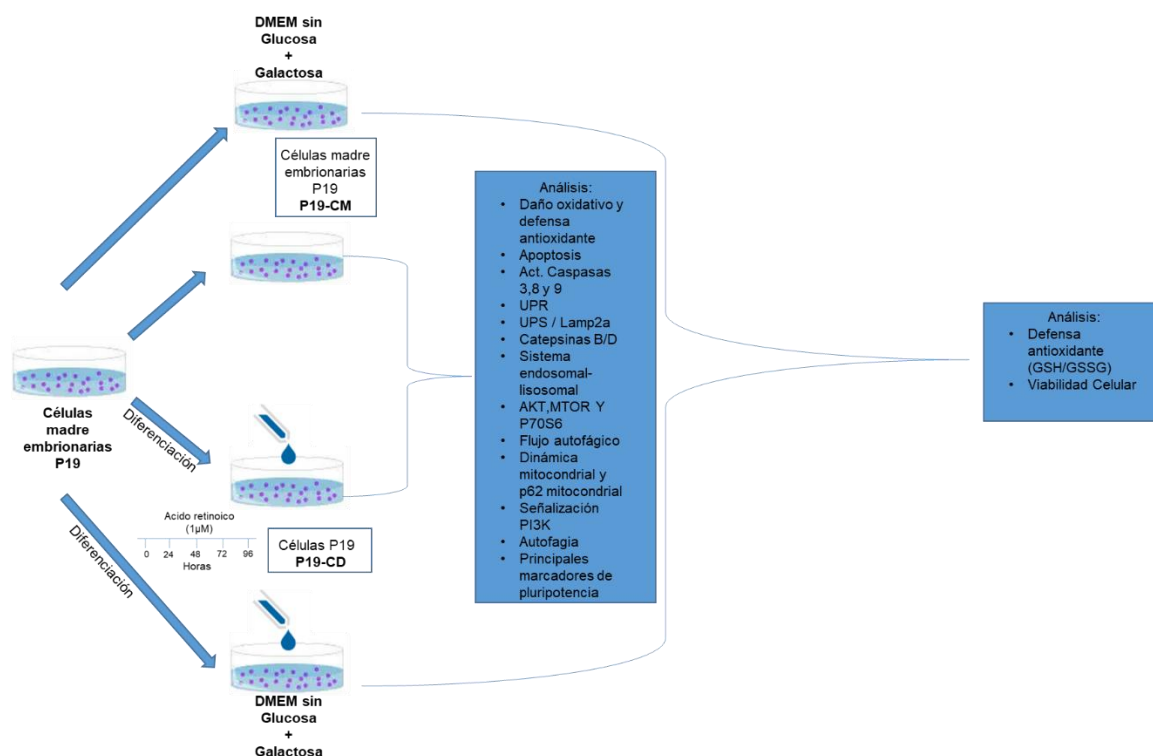


Figura 10. El esquema representa una síntesis de los pasos seguidos durante este trabajo con la línea celular P19. A partir de la línea celular P19 se obtuvieron los grupos experimentales a estudio. Por un lado, tenemos las células madre embrionarias P19 (P19-CM) y su diferenciación neuroectodérmica añadiendo a su medio de cultivo (DMEM) ácido retinoico a una concentración de 1 µM durante 4 días (P19-CD). A partir de estos dos grupos experimentales se realizaron los siguientes ensayos: Daño oxidativo y defensa antioxidante, apoptosis, actividad de las caspasas 3, 8 y 9, análisis de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), expresión del marcador lisosomal LAMP2a, evaluación del sistema edosomal-lisosomal, expresión de las proteínas AKT, de la proteína quinasa P70S6 y MTOR (mammalian Target of Rapamycin), análisis del flujo autofagico y p62 mitocondrial, además la señalización de PI3K (fosfoinositol 3-cinasas) y dinámica mitocondrial y por último análisis de la autofagia y la expresión de marcadores de pluripotencia. Por otra parte se estudio la defensa antioxidante a través del análisis del glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) y la viabilidad celular. Estos dos ensayos fueron realizados modificando el medio de las P19-CM y P19-CD, es decir, añadiendo galactosa a su medio de cultivo carente de glucosa.

DISEÑO EXPERIMENTAL DE CÉLULAS MADRE ADULTAS C2C12

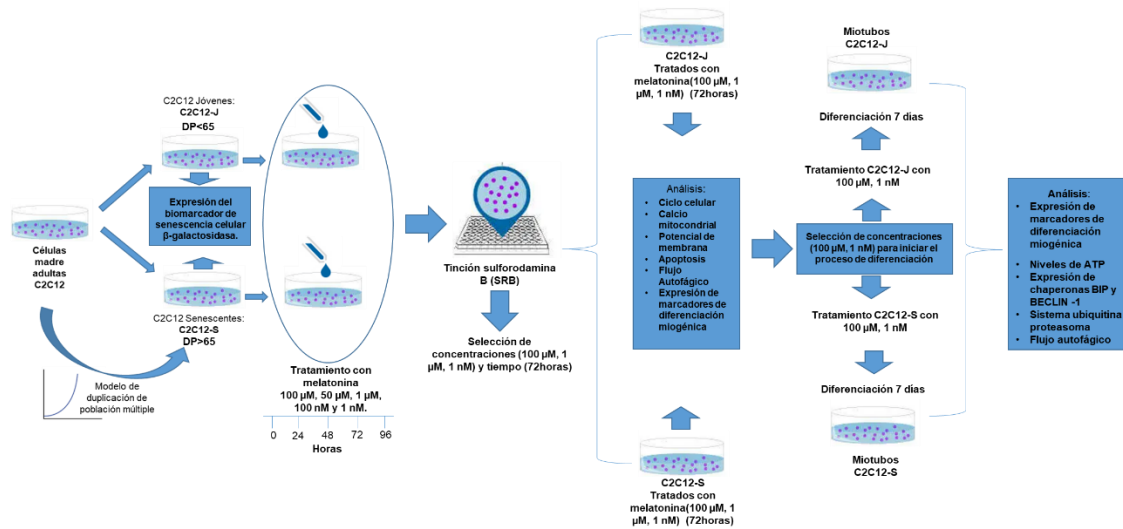


Figura 11. El esquema representa una síntesis de los pasos seguidos durante este trabajo con la línea celular C2C12. Desde la obtención del grupo experimental de senescencia replicativa pasados más de 65 ciclos de duplicación (DP>65), utilizando el modelo de duplicación de población múltiple hasta la concentración óptima de melatonina (1 nM) sobre la senescencia de las células madre adultas C2C12. Tanto el grupo experimental de mioblastos C2C12 jóvenes (C2C12-J) con menos de 65 ciclos de duplicación (DP<65) y senescentes (C2C12-S) fueron tratados con las concentraciones 100 µM, 50 µM, 1 µM, 100 nM y 1 nM en un primer momento para evaluar el efecto probablemente beneficioso de la melatonina sobre la proliferación celular por medio de la tinción sulforadamina B durante 96 horas. Finalizado este ensayo se seleccionó aquellas concentraciones que representaron tanto un beneficio como una consecuencia en la tasa de proliferación de C2C12-J y C2C12-S además de seleccionar el tiempo exposición al tratamiento con melatonina. Estas concentraciones fueron 100 µM, 1 µM y 1 nM y el tiempo de exposición al tratamiento fueron 72 horas. Seleccionadas estas concentraciones se realizaron los siguientes ensayos experimentales: Análisis del ciclo celular, calcio mitocondrial, potencial de membrana, flujo autofágico, apoptosis y expresión de marcadores de diferenciación miogénica. Tras los resultados obtenidos por estos ensayos se volvieron a seleccionar aquellas concentraciones de melatonina que pudieran tener un efecto positivo sobre la diferenciación de mioblastos senescentes a miotubos. Estas concentraciones fueron las siguientes: 100 µM y 1nM. Tras su selección se trataron tanto las C2C12-J y C2C12-S y después se inició el proceso de diferenciación añadiendo a su medio de cultivo DMEM suero de caballo al 2 % (Gibco, 16050122), durante 7 días. Tras su diferenciación pasados los 7 días se obtuvieron los grupos experimentales: Miotubos C2C12-J y Miotubos C2C12-S y se realizaron los siguientes ensayos: Análisis de la expresión de marcadores de diferenciación miogénica, niveles de ATP, expresión de chaperonas como BIP, expresión de la proteína BECLIN-1 y análisis del flujo autofágico.

RESULTADOS

LAS CÉLULAS MADRE P19 PRESENTAN UNA FUERTE RESPUESTA ANTIOXIDANTE QUE LAS PROTEGE FRENTE A LAS AGRESIONES OXIDATIVAS

La producción de ROS se evaluó por medio de citometría de flujo utilizando la sonda H2DCFDA, una vez finalizado el protocolo para su análisis se observó un incremento de las ROS tras la diferenciación de las P19-CM con AR ($p < 0,001$) (Fig.12A). Asimismo, la determinación de nitritos/nitratos, como indicador de producción de RNS, mostró una mayor concentración de productos finales de la descomposición del .NO en las P19-CD ($p < 0,001$) (Fig.12B).

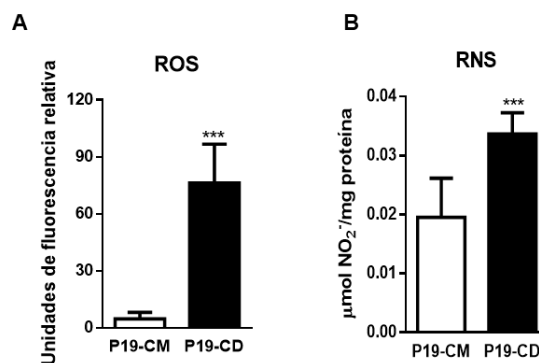


Figura 12. (A) Cuantificación de los niveles de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) de células madre P19 (P19-CM) y células P19 diferenciadas (P19-CD) con ácido retinoico (AR) **(B)** Niveles de producción de especies reactivas de nitrógeno (RNS) expresado como $\mu\text{mol NO}_2/\text{mg proteína}$ en ambos tipos de células P19. Los datos se muestran como media \pm desviación estándar, $n = 5$. *** $p < 0,001$.

Asimismo, para determinar el daño oxidativo celular en ambos tipos de células P19, indiferenciadas y diferenciadas, se analizaron los niveles de carbonilación proteica y LPO. Los resultados obtenidos mostraron que, aunque los niveles de proteínas carboniladas permanecieron inalterados tras la diferenciación con ácido retinoico (Fig.13A), las P19-CD presentaron una elevada peroxidación lipídica ($p < 0,001$) (Fig.13B).

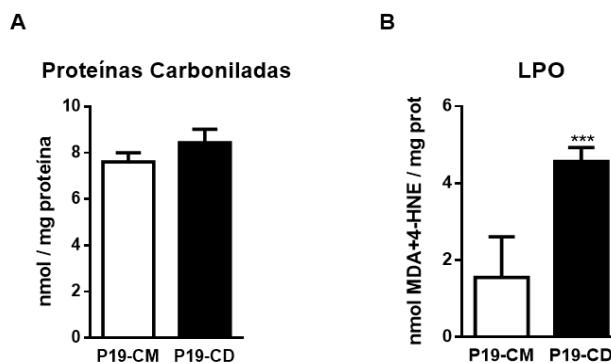


Figura 13. Daño oxidativo a proteínas y lípidos en células P19 indiferenciadas (P19-CM) y diferenciadas con ácido retinoico (P19-CD). **(A)** Daño oxidativo a proteínas expresado como nmol proteína carbonilada / mg proteína. **(B)** Niveles de oxidación a lípidos (LPO) expresado como nmol MDA+4-HNE/mg proteína. Los datos se muestran como media \pm D.E. calculados a partir de, al menos, tres experimentos separados realizados por triplicado. *** $p < 0,001$.

Tras el protocolo de diferenciación también se observó una alteración en la defensa antioxidante enzimática. En comparación con las P19-CM, las P19-CD mostraron un aumento de la actividad SOD ($p < 0,01$) (Fig.12B) acompañado de una menor actividad CAT ($p < 0,01$) (Fig.14A). El análisis del ensayo ABTS también mostró una disminución significativa de la AAT ($p < 0,01$) tras la diferenciación de las células P19 (Fig.14C). Además, se observó que las P19-CM presentaban una fuerte protección antioxidante caracterizada por concentraciones elevadas del glutatión reducido (GSH) (Fig.14D) respecto a las de glutatión oxidado (GSSG) (Fig.14E). Este estado redox particular observado en las P19-CM podría estar íntimamente relacionado con su menor actividad mitocondrial descrita previamente en otros trabajos. De hecho, en nuestro estudio se demuestra que cuando se fuerza el metabolismo energético mitocondrial al cultivar las P19-CM en medio que contiene galactosa (sin glucosa), la relación GSH:GSSG disminuye significativamente ($p < 0,01$) (Fig.14F). Otro parámetro que refuerza la protección antioxidante que muestran las P19-CM es la SOD2, también conocida como superóxido dismutasa mitocondrial o dependiente de manganeso (MnSOD), que presentó un nivel de expresión proteica significativamente inferior en las células P19-CD respecto al observado en sus equivalentes indiferenciadas ($p < 0,001$) (Fig.15A).

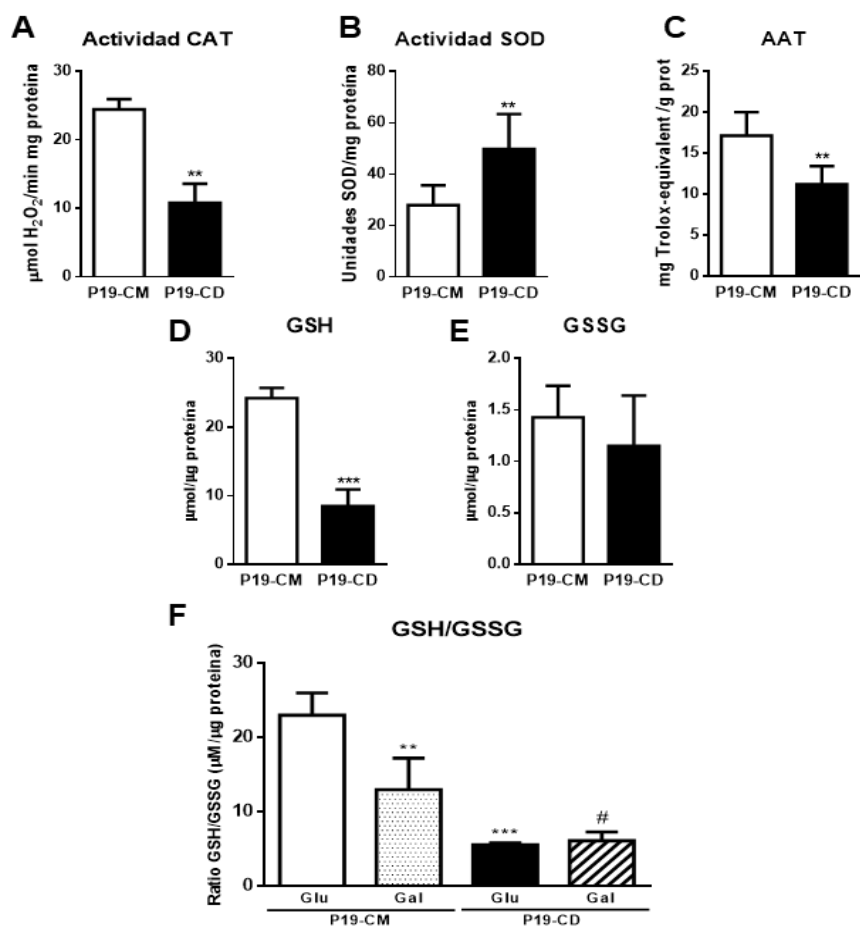


Figura 14. Defensa antioxidante en células P19 indiferenciadas (P19-CM) y diferenciadas con ácido retinoico (P19-CD). **(A)** Actividad de la catalasa (CAT) expresada como $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg proteina}\cdot\text{min}^{-1}$. ****** $p<0,01$. **(B)** Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) expresada como unidades SOD/mg proteina. ****** $p<0,01$. **(C)** Actividad antioxidante total (AAT) expresada como equivalentes de mg de Trolox/mg proteina. ****** $p<0,01$. **(D)** Cantidad del glutatión reducido (GSH) expresada como $\mu\text{mol}/\mu\text{g proteina}$. ******* $p<0,001$. **(E)** Concentración de glutatión oxidado (GSSG) expresada como $\mu\text{mol}/\mu\text{g proteina}$. **(F)** Proporción de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en células madre P19 (P19-CM) y diferenciadas (P19-CD), proliferando en medios que contienen glucosa (Glu) y galactosa (sin glucosa) (Gal). Los datos se muestran como media \pm D.E., calculados a partir de al menos, tres experimentos separados realizados por triplicado. Comparaciones estadísticas: * vs. P19-CM (Glu); # vs. P19-CM (Gal). El número de símbolos marca el nivel de significación: uno para $p<0,05$, dos para $p<0,01$ y tres para $p<0,001$.

Por otro lado, también se observó que las células indiferenciadas mostraron una mayor expresión del factor NFE2L2/NRF2 (factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2), un factor crítico para promover las respuestas antioxidantes y de supervivencia celular (Fig.15B). De hecho, tras una agresión con H_2O_2 sobrevivieron un porcentaje mayor de células madre P19 cultivadas en un medio rico en glucosa en comparación con las células P19-CD también cultivadas en medio rico en glucosa y, especialmente, en comparación con las P19, madre y diferenciadas, cultivadas en medios que contienen galactosa (sin glucosa) que mostraron la mayor sensibilidad frente a la agresión oxidativa. De hecho, las células madre P19 más resistentes, las

cultivadas en medio rico en glucosa, mostraron un aumento en la tasa de proliferación y, por tanto, una recuperación más rápida ya a las 6 horas de la injuria oxidativa se incrementó el número de células. Se observa un ligero incremento en las células diferenciadas, y por el contrario no se observa ningún incremento en el caso de aquellas células cultivadas en medio con galactosa (sin glucosa) que dependen más del metabolismo mitocondrial para la producción de ATP (Fig.15C).

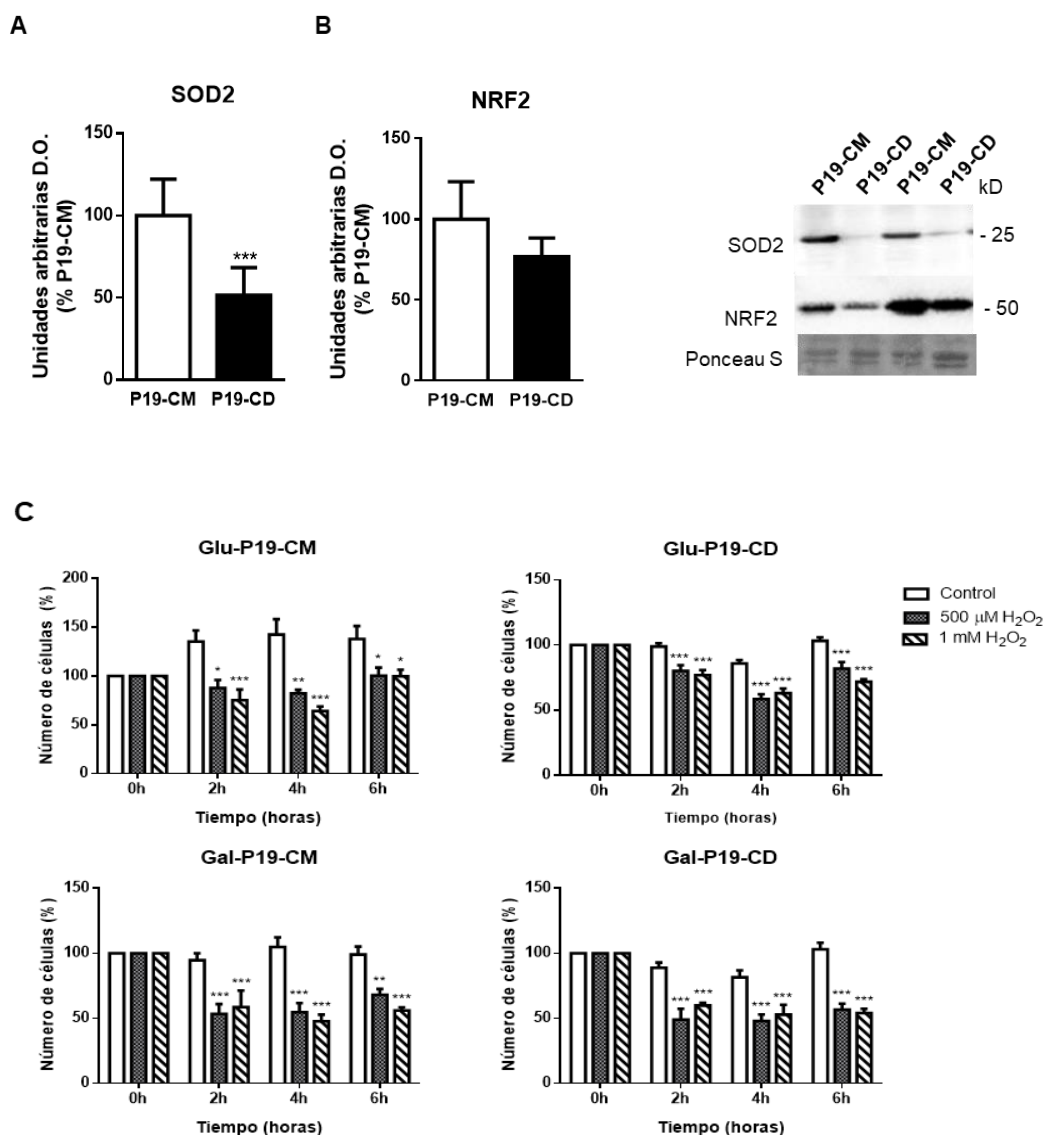


Figura 15. (A) Se analizaron los niveles proteicos de superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2) y (B) factor nuclear, derivado de eritroide 2, similar al 2 (NFE2L2/NRF2) en células madre P19 (P19-CM) y células P19 diferenciadas (P19-CD). Los gráficos de barras muestran las medias de la densidad óptica (D.O.) \pm D.E. expresado como porcentaje de la D.O. detectada en las P19-CM, de tres inmunotransferencias separadas. Ponceau S se utilizó como control de carga. *** $p < 0,001$. (C) Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad celular en células P19: indiferenciadas (P19-CM) y diferenciadas (P19-CD), que crecen en medios que contienen glucosa (Glu) y galactosa (Gal). Los datos se expresan como porcentaje de número de células respecto al control (solo vehículo) en el tiempo 0 para cada punto de tiempo (2, 4 y 6 horas post-exposición). Los datos son medias \pm D.E. calculados a partir de, al menos, tres experimentos separados realizados por triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente al control.

Al mismo tiempo se observó que, aunque las P19-CD mostraron mayor estrés oxidativo y peroxidación lipídica, las P19-CM presentaron una expresión significativamente mayor de la proteína prooxidante SHC1-1/p66SHC (proteína transformante C1 que contiene el dominio de homología src 2, isoforma de 66 kDa) y de su forma fosforilada en la Ser36, lo que indicaría una activación de esta vía de señalización prooxidante y proapoptótica en células indiferenciadas (Fig.16).

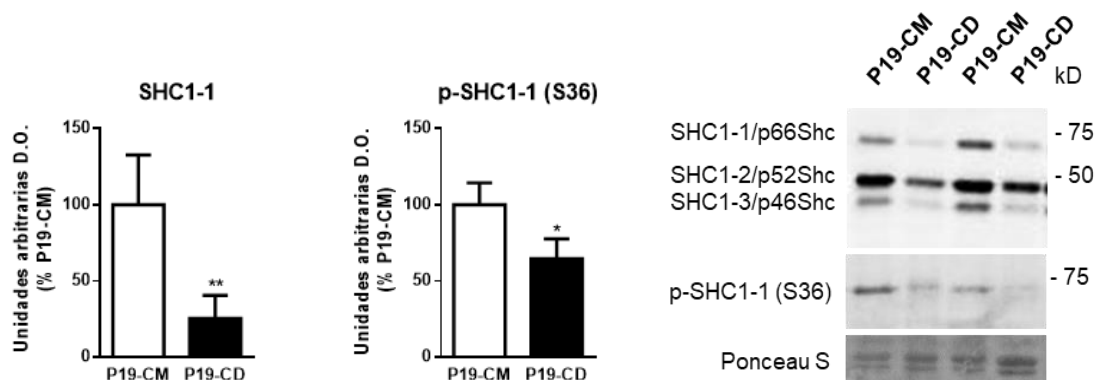


Figura 16. Se analizaron los niveles de las tres isoformas de la proteína SHC1 y de P-p66Shc (S36) en células madre P19 (P19-CM) y células P19 diferenciadas (P19-CD). Los gráficos de barras muestran las medias de la densidad óptica (D.O.) \pm D.E. expresado como porcentaje de P19-CM, de tres inmunotransferencias separadas. Ponceau S se utilizó como control de carga. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

LAS CÉLULAS MADRE P19 EXHIBEN ALTERACIONES EN LA MAQUINARIA APOPTÓTICA

A continuación, estudiamos algunos de los principales marcadores de apoptosis para detectar las posibles alteraciones que se producen en su maquinaria después de la diferenciación de las células P19, con el fin de comprender las propiedades que proporcionan larga vida a las células madre, tales como relativa quiescencia metabólica, activa reparación del ADN y resistencia a fármacos y a la muerte celular. En primer lugar, se observó, en las P19-CM, una sobreexpresión del supresor tumoral p53 (Fig.17A) y de sus dianas transcripcionales PUMA (modulador de apoptosis regulado al alza por p53) (Fig.17B) y DRAM (Modulador de autofagia regulado por daño) (Fig.17C), sugiriendo la activación de procesos de muerte celular, mientras que en las células P19 diferenciadas, los niveles proteicos de PUMA ($p < 0,01$) y DRAM ($p < 0,05$) disminuyeron significativamente. A pesar de esta situación, no se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de células P19 en los niveles de la proteína mitocondrial proapoptótica BAX (Fig.17D) y la proteína mitocondrial antiapoptótica BCL-2 (Fig.17E), cuyo papel es clave para regular la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y asegurar el correcto control en el compromiso de

la célula con la muerte celular. Sin embargo, las P19-CD exhibieron un aumento en los niveles de expresión de la proteína NIX (proteína con homología con BCL-2 en el dominio BH3) ($p < 0,01$) (Fig.17F), la cual se encuentra estrechamente relacionada con la diferenciación celular y los procesos mitofágicos.

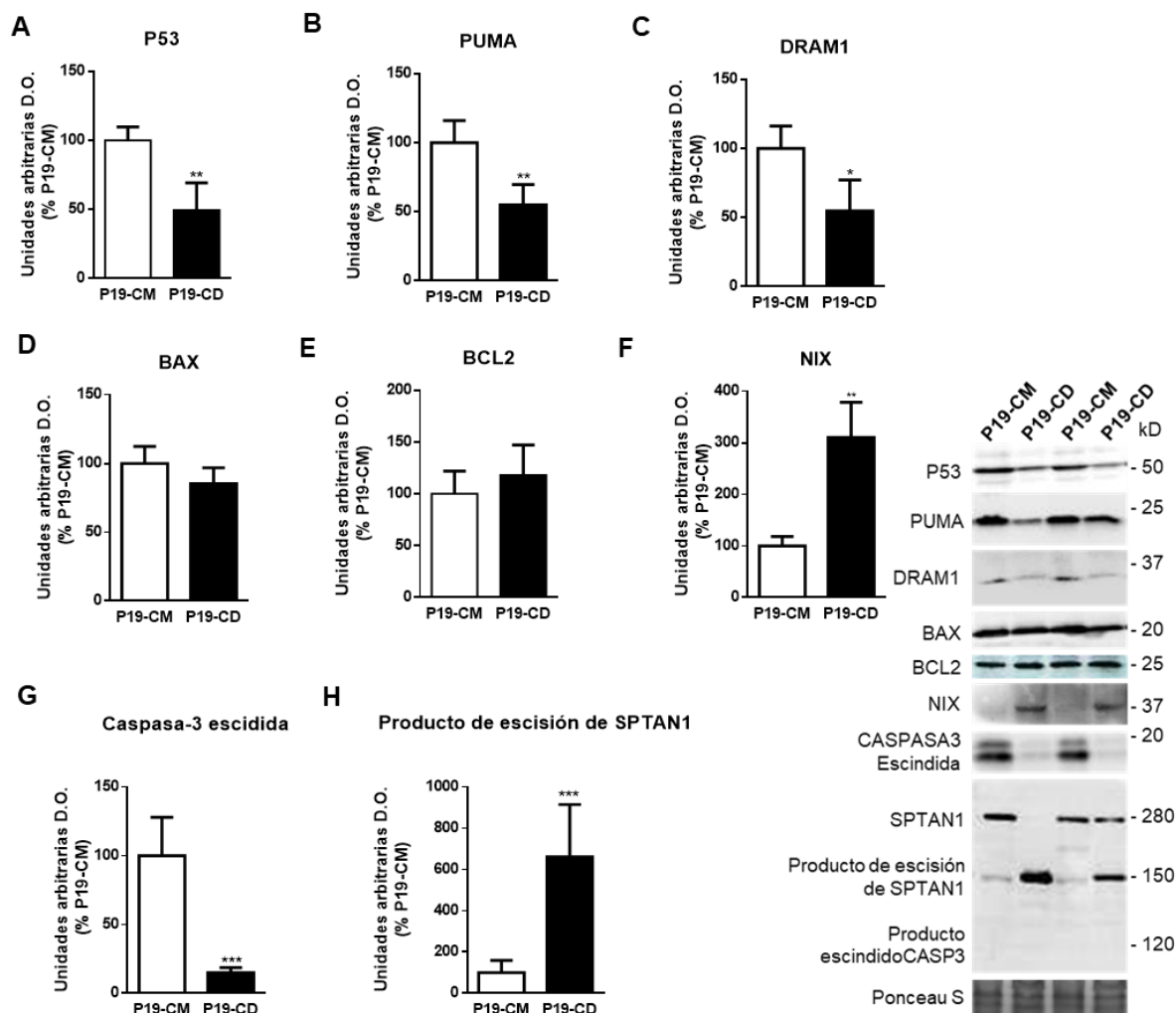


Figura 17. Análisis de los niveles de proteínas clave de la maquinaria apoptótica. Semicuantificación del contenido de proteína por inmunotransferencia de **(A)** p53, **(B)** PUMA, **(C)** DRAM1, **(D)** BAX, **(E)** BCL-2, **(F)** NIX, **(G)** Caspasa 3 escindida y **(H)** Producto de escisión SPTAN1. Los gráficos de barras muestran las medias de la densidad óptica (D.O) \pm D.E. expresado como porcentaje de P19-CM, de tres inmunotransferencias separadas. Ponceau S se utilizó como control de carga. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Para completar la caracterización de la maquinaria apoptótica, se analizaron las caspasas, enzimas que juegan un papel clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica. Para ello, en primer lugar, se evaluaron los niveles proteicos de la

caspasa-3 tras su escisión (caspasa-3 activa). Los resultados obtenidos mostraron que, aunque las P19-CM presentaron un mayor contenido en caspasa-3 escindida que las P19-CD (Fig.17G), esto no se encontró asociado con la escisión de sustratos clásicos como la α -espectrina no eritrocítica 1 (SPTAN1). Solo se detectó la banda correspondiente al producto de escisión de calpaína de SPTAN1 en las P19-CD ($p < 0,001$) (Fig.15H). De hecho, tras analizar la actividad caspasa-3 (Fig.18A) que es la efectora de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas, caspasa 8 (Fig.18B) cuya función principal es la piroptosis y caspasa 9 (Fig.18C) que actúa como proteasa iniciadora de la vía intrínseca de apoptosis, se observó que la diferenciación de las células P19 con AR cursa con un aumento significativo en las actividades de estas tres caspasas ($p < 0,001$). En general, estos datos parecen indicar que las células madre P19 presentan una supresión de la señalización apoptótica, la cual probablemente constituye una estrategia para aumentar los umbrales del inicio o disparo de los programas de muerte celular.

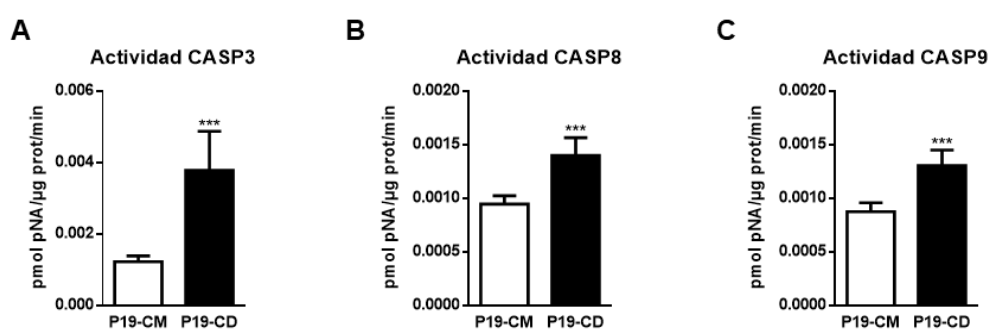


Figura 18. Las actividades de las caspasas **(A)** 3, **(B)** 8 y **(C)** 9 fueron analizadas usando sustratos específicos en las células P19 indiferenciadas (P19-CM) y diferenciadas con ácido retinoico (P19-CD). Los datos se expresan como media \pm D.E. de cinco experimentos independientes. $n=5$. *** $p < 0,001$.

LA DIFERENCIACIÓN DE LAS P19-CM ACTIVA LA REPUESTA A PROTEÍNAS MAL PLEGADAS Y SE DESPLIEGAN SISTEMAS DE DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS

Dado que la UPR probablemente juega un papel durante la reprogramación metabólica que acompaña a la diferenciación de células madre, analizamos la expresión de las tres rutas de señalización de UPR en ambos tipos de células P19, indiferenciadas y diferenciadas. Los niveles de la proteína IRE1 α fueron estadísticamente más bajos después de la diferenciación inducida por AR ($p < 0,01$) (Fig.19A). Sin embargo, los niveles de eIF2 α fosforilado se vieron incrementados ($p < 0,001$) (Fig.19B) en las células P19-CD y lo mismo observamos con el factor ATF6 α ($p < 0,05$) (Fig.19C). Ambas rutas de la UPR coordinan la transcripción del ARNr y la inhibición de la traducción, promueven la degradación de proteínas y, por

lo general, predisponen a la apoptosis o la autofagia. Ante esta situación decidimos estudiar la proteína CHOP (proteína homóloga *C/EBP*) ya que es considerado un importante factor de transcripción que inhibe la expresión de proteínas antiapoptóticas favoreciendo la muerte celular por apoptosis (Marciniak et al., 2004). A pesar del disparo de la UPR, observamos que la expresión de la proteína CHOP fue menor ($p < 0,001$) en las P19-CD (Fig.19D).

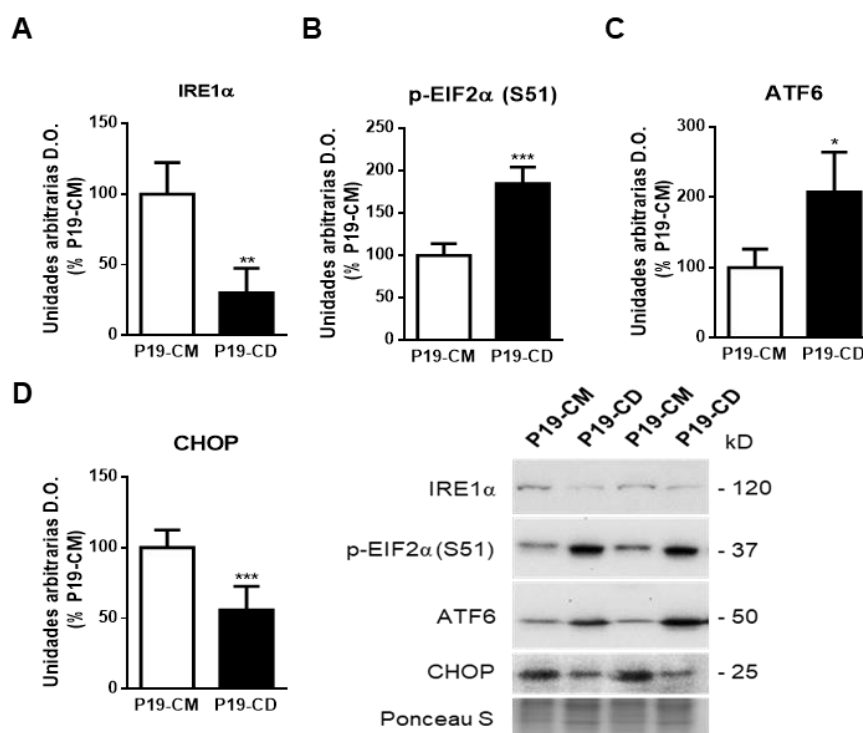


Figura 19. Análisis de los niveles de las proteínas clave que activan la respuesta al estrés del retículo endoplásmico (UPR). Semicuantificación del contenido de proteína por inmunotransferencia de **(A)** IRE1 α , **(B)** p-EIF2 α , **(C)** ATF6 α y **(D)** CHOP. Los gráficos de barras muestran las medias de la densidad óptica (D.O.) \pm D.E. expresado como porcentaje de P19-CM, de tres inmunotransferencias separadas. Ponceau S se utilizó como control de carga. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Como las células P19-CD mostraron una acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas y dañadas oxidativamente, estas probablemente pueden presentar alteraciones en la maquinaria de síntesis de proteínas y/o en los sistemas para su degradación. Estas proteínas deberían ser eliminadas por los diferentes mecanismos de control de calidad proteica, como el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y la AMC que eliminan proteínas dañadas de una en una.

Tras evaluar estos mecanismos de control de calidad proteica de baja capacidad, en primer lugar, se observó que las P19-CD mostraron un aumento de la actividad del proteasoma 20S ($p < 0,001$) (Fig.20A) y un aumento en los niveles de proteínas ubiquitinizadas ($p < 0,001$) (Fig.20B), indicando la activación de este sistema de degradación. Por otra parte, para caracterizar la AMC se realizó el análisis del

contenido proteico de su receptor, LAMP2A. Al igual que ocurre con el sistema ubiquitina-proteasoma, los niveles de expresión de la proteína LAMP2A aumentaron significativamente ($p < 0,001$) en las P19-CD (Fig.20C). Por ello, estos resultados demuestran la activación de la AMC y el UPS después de inducir la diferenciación de las células madre P19.

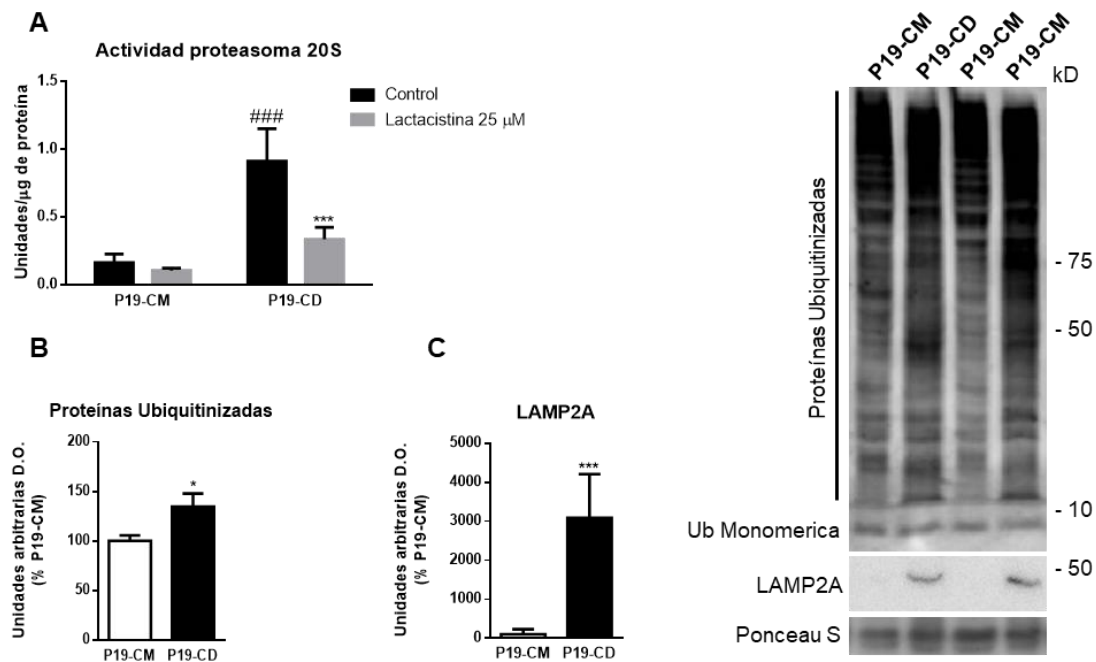


Figura 20. (A) La actividad tipo quimotripsina del proteasoma 20S se midió en células P19 indiferenciadas (P19-CM) y diferenciadas (P19-CD). Se usó lactacistina para bloquear específicamente la degradación proteasomal. Los datos son medias \pm D.E. de $n = 6$ Comparaciones estadísticas: *vs.control #vs P19-CM. El número de símbolos marca el nivel de significación: uno para $p < 0,05$, dos para $p < 0,01$ y tres para $p < 0,001$. **(B)** Las proteínas ubiquitinizadas y **(C)** el marcador de la autofagia mediada por chaperonas, LAMP2A, se semicuantificaron mediante inmunotransferencia en ambos tipos de células P19. Los gráficos de barras muestran las medias de densidad óptica (D.O) \pm D.E. expresadas como porcentaje de P19-CM, de tres experimentos separados. Ponceau S se utilizó como control de carga. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE P19 PROVOCA UNA REMODELACIÓN DE LOS COMPARTIMENTOS LISOSOMALES Y ACTIVA LA VÍA AKT/MTOR

Llegados a este punto, hemos demostrado que la diferenciación de las células P19 va acompañada de un aumento en la actividad proteolítica de las caspasas, del sistema ubiquitina-proteasoma y de la AMC. Así que para confirmar si el proceso diferenciación de las P19-CM inducía la activación de múltiples sistemas proteolíticos, a continuación, se determinó la expresión y actividad de las proteasas lisosomales catepsina D y catepsina B.

El procesamiento de la catepsina D pareció verse favorecido después de la diferenciación de las células P19, aumentando su actividad significativamente

($p < 0,001$) (Fig.21A). Además, la actividad de la catepsina B también aumentó en las células P19-CD ($p < 0,001$) (Fig.21B) e incluso la relación catepsina B/D también fue mayor en las células diferenciadas ($p < 0,01$) que en las células indiferenciadas (Fig.21C).

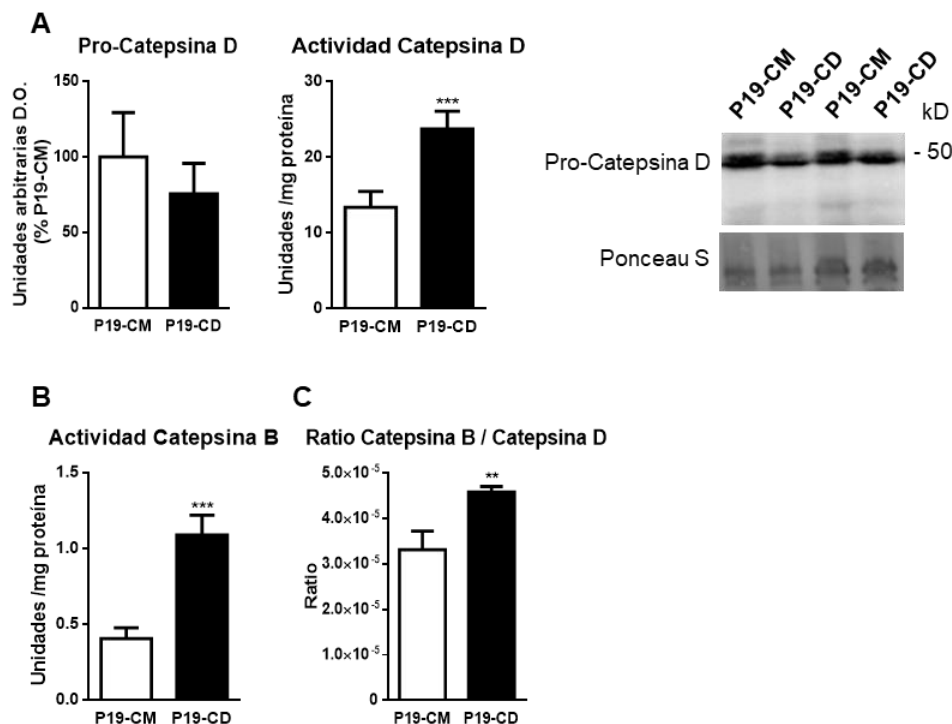


Figura 21. Análisis de las actividades de las catepsinas. **(A)** Actividad de la catepsina D, **(B)** Actividad de la catepsina B y **(C)** Ratio catepsina B/D en células madre p19 (P19-CM) y células P19 diferenciadas con ácido retinoico durante 4 días (P19-CD). Los datos se expresan como media \pm D.E. de seis experimentos independientes. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. **(D)** Los gráficos de barras muestran las medias de la densidad óptica (D.O.) \pm desviación estándar expresado como porcentaje de P19-CM, de tres inmunotransferencias separadas para seguir la maduración proteolítica de la catepsina D en ambos tipos de células P19. Ponceau S se utilizó como control de carga.

Por otro lado, el marcaje con LysoTracker (Fig.22A) y las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (MET) (Fig.22B) demostraron un mayor desarrollo del sistema endosomal-lisosomal en las P19-CD. En conjunto, los resultados obtenidos muestran la activación de múltiples sistemas para la degradación de proteínas tras la diferenciación de las P19-CM.

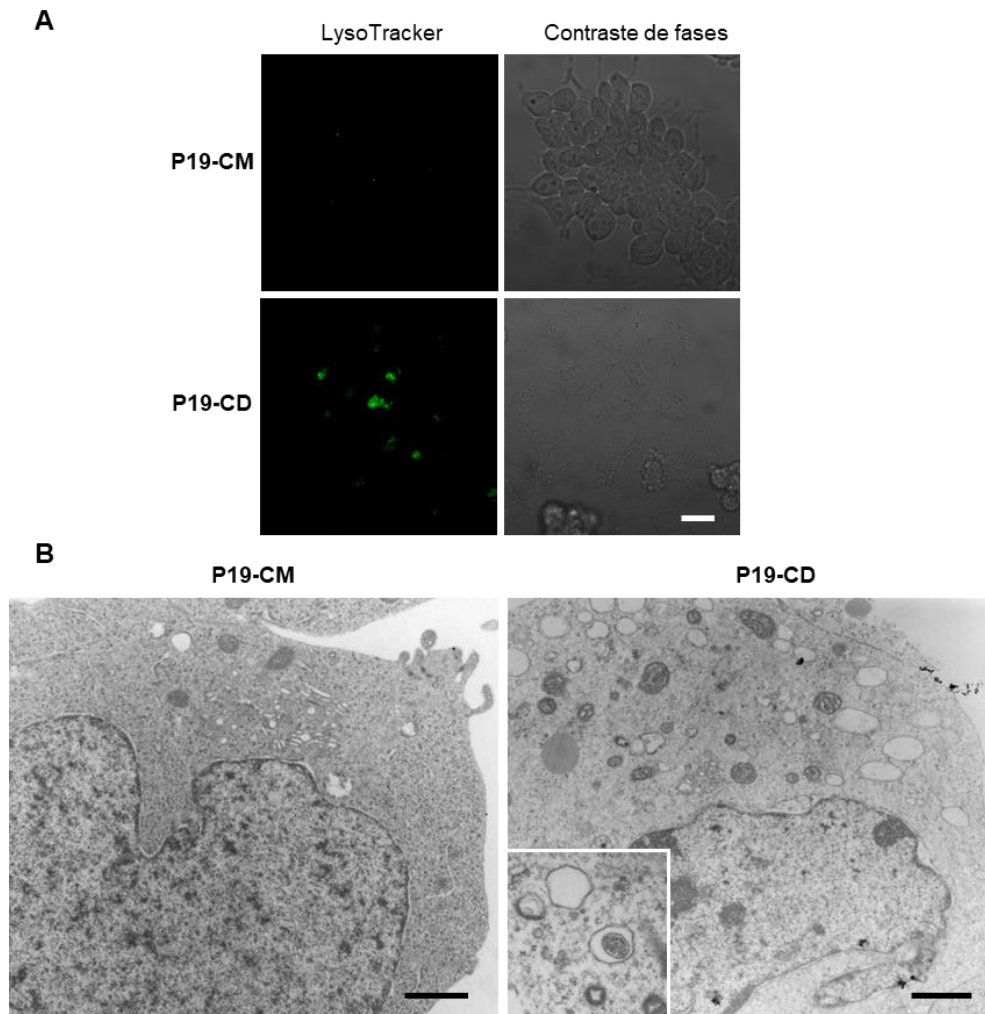


Figura 22. (A) Imágenes de microscopía confocal utilizando la sonda fluorescente LysoTracker para el marcaje de compartimentos lisosomales en células madre p19 (P19-CM) y células P19 diferenciadas con ácido retinoico durante 4 días (P19-CD). Barra de escala = 20 μm . **(B)** Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (MET) de las P19-CM y P19-CD. Barra de escala= 3 μm .

También se determinó la expresión de la proteína quinasa B (AKT) total y su fosforilación en la Ser473, MTOR total y su fosforilación en la Ser2448 y P70S6 (proteína ribosómica S6 quinasa beta-1) para evaluar el estado de activación de esta vía de señalización relacionada con la supervivencia, crecimiento y proliferación celular. Los resultados mostraron que, simultáneamente a la activación de los procesos de degradación de proteínas, las P19-CD presentaron una mayor expresión de AKT fosforilada en la Ser473 ($p < 0,001$) (Fig.23A), de MTOR fosforilada en la Ser2448 ($p < 0,05$) (Fig.23B) y de P70S6 quinasa ($p < 0,05$) (Fig.23C), lo que sugiere la activación de esta vía de supervivencia y un posible incremento en la síntesis de proteínas durante la diferenciación. En conjunto, todos los datos obtenidos hasta el momento indican una fuerte renovación y recambio de proteínas durante la diferenciación de las células P19 inducida por AR.

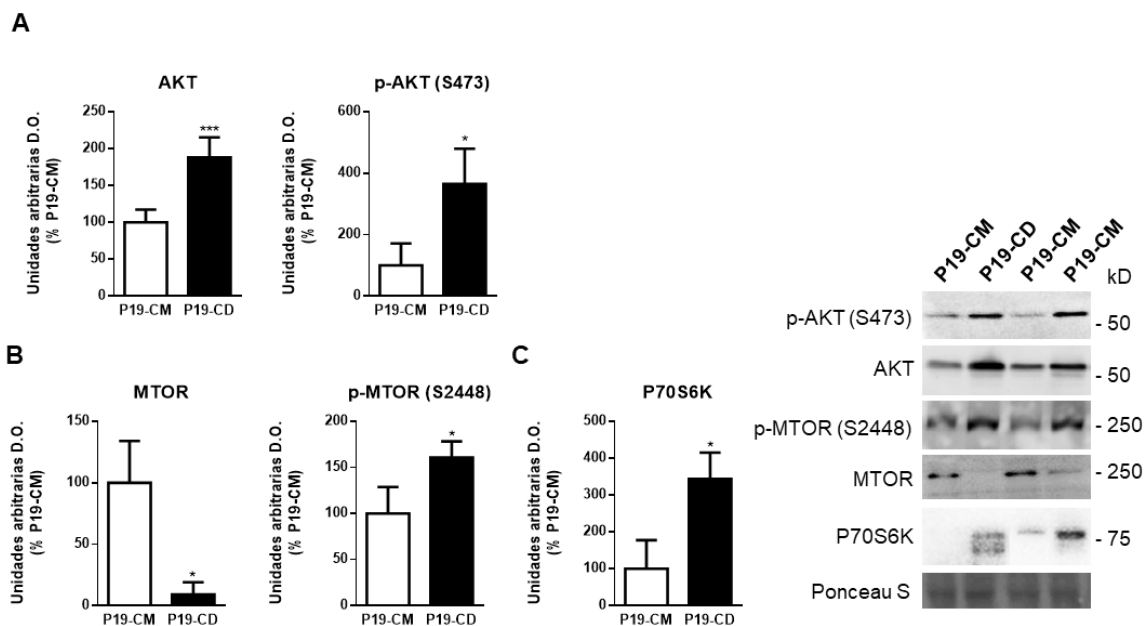


Figura 23. Semicuantificación del contenido de proteína por inmunotransferencia de **(A)** AKT y p-AKT (S473), **(B)** MTOR total, p-MTOR (S2448) y **(C)** P70S6K, en células madre p19 (P19-CM) y células P19 diferenciadas con ácido retinoico durante 4 días (P19-CD). Los gráficos de barras muestran las medias de la densidad óptica (D.O.) \pm D.E. expresado como porcentaje de P19-CM, de tres inmunotransferencias separadas. Ponceau S se utilizó como control de carga * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

LAS CÉLULAS MADRE P19 PRESENTAN UN MAYOR FLUJO AUTOFÁGICO QUE LAS P19 DIFERENCIADAS CON ÁCIDO RETINOICO

Para evaluar si también la macroautofagia aumenta durante la diferenciación de P19-CM con AR, determinamos la expresión de proteínas clave relacionadas con la autofagia (ATG, (Autofagia relacionada con proteínas) en ambos tipos de células P19. Por un lado, encontramos que Beclin-1 (ATG6), un componente central del complejo fosfatidilinositol 3-quinasa de clase III (PI3K-III) que inicia la formación de fagóforos, mostró una mayor expresión en las P19-CM (Fig.24A). Sin embargo, la proteína ATG12 y su complejo con ATG5 (ATG12-ATG5) que tiene función análoga a las E3 ubiquitina ligasas para la reacción de conjugación del LC3 a la fosfatidiletanolamina, mostró una mayor expresión en las P19-CD ($p < 0,01$) (Fig.24B-C). Además, los niveles de ATG3 (Fig.24D), LC3-II y del ratio LC3-II/LC3-I (Fig.24E), un marcador de formación de autofagosomas, permanecieron inalterados. Para examinar con claridad estos resultados aparentemente contradictorios, se evaluó el flujo autofágico global.

El análisis por inmunotransferencia de p62/SQSTM1, el cual se localiza en agregados destinados a la degradación autofágica, reveló la acumulación de esta proteína en las P19-CD ($p < 0,001$), lo que parece indicar un mayor flujo autofágico en las P19-CM (Fig.24F).

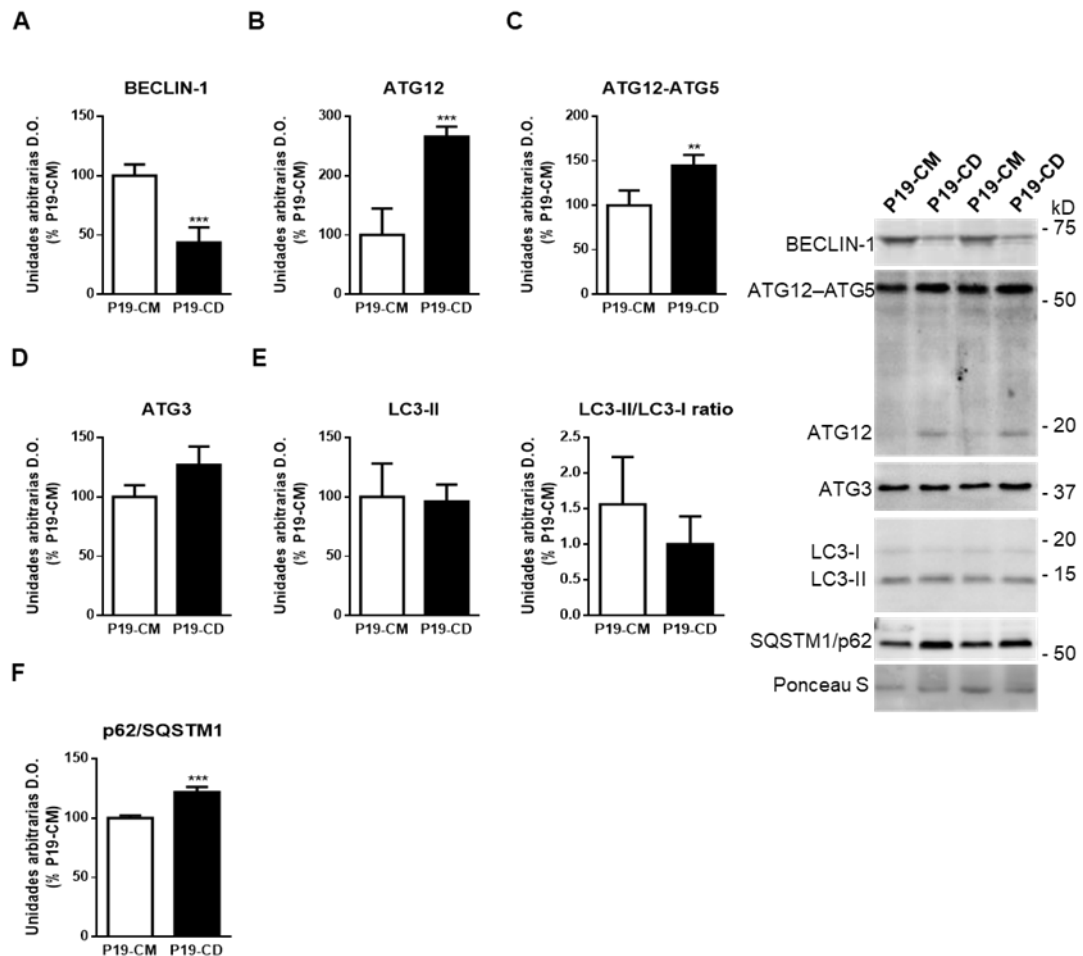


Figura 24. Semicuantificación del contenido en proteínas clave relacionadas con la autofagia (ATG) en células madre p19 (P19-CM) y células P19 diferenciadas con ácido retinoico durante 4 días (P19-CD) por inmunotransferencia de **(A)** BECLIN1, **(B)** ATG12, **(C)** ATG12-ATG5, **(D)** ATG3, **(E)** LC3-II y ratio LC3II-LC3I, **(F)** p62/SQSTM1. Los gráficos de barras muestran las medias de la densidad óptica (D.O) \pm D.E. expresado como porcentaje de P19-CM, de tres inmunotransferencias separadas. Ponceau S se utilizó como control de carga. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Debido a la diversidad de funciones de p62, para evaluar fehacientemente el flujo autofágico, inhibimos la fusión autofagosoma-lisosoma con bafilomicina A1 y detectamos por inmunodetección la acumulación de LC3-II consecuente. Se observó que, efectivamente, los niveles de LC3-II fueron mayores en las P19-CM ($p < 0,001$) (Fig. 25A). Por lo tanto, las células madre P19 presentaron tasas de autofagia más altas que las células diferenciadas, probablemente como un requisito para mantener una mejor calidad de los orgánulos debido a su quiescencia metabólica.

Estos cambios en la función autofágica entre ambos tipos de células P19 resultaron en efectos divergentes sobre la proliferación celular cuando las células se trataron con 3-metiladenina (3-MA), un inhibidor de la PI3K. El tratamiento con 3-MA redujo drásticamente la proliferación de las P19-CM ($p < 0,001$) y no tuvo efectos sobre la proliferación de las P19-CD (Fig.25B). Por otro lado, la inhibición de MTOR con

rapamicina provocó un efecto opuesto, mostrando una acción antiproliferativa solo en las P19-CD (Fig.25C). De igual forma ocurre una disminución significativa de la proliferación ($p < 0,001$) (Fig.25D) en las P19-CD cuando silenciamos la proteína ATG7 con tecnología si-ARN para inhibir la maquinaria autofágica, proteína que actúa como enzima E1 para las proteínas similares a la ubiquitina como ATG12, siendo clave para la regulación del ensamble de autofagosomas. Estos resultados indican que la señalización de PI3K es necesaria para el mantenimiento de las P19-CM mientras que la activación de mTOR y una maquinaria autofágica intacta son esenciales para mantener la tasa proliferativa de las P19-CD.

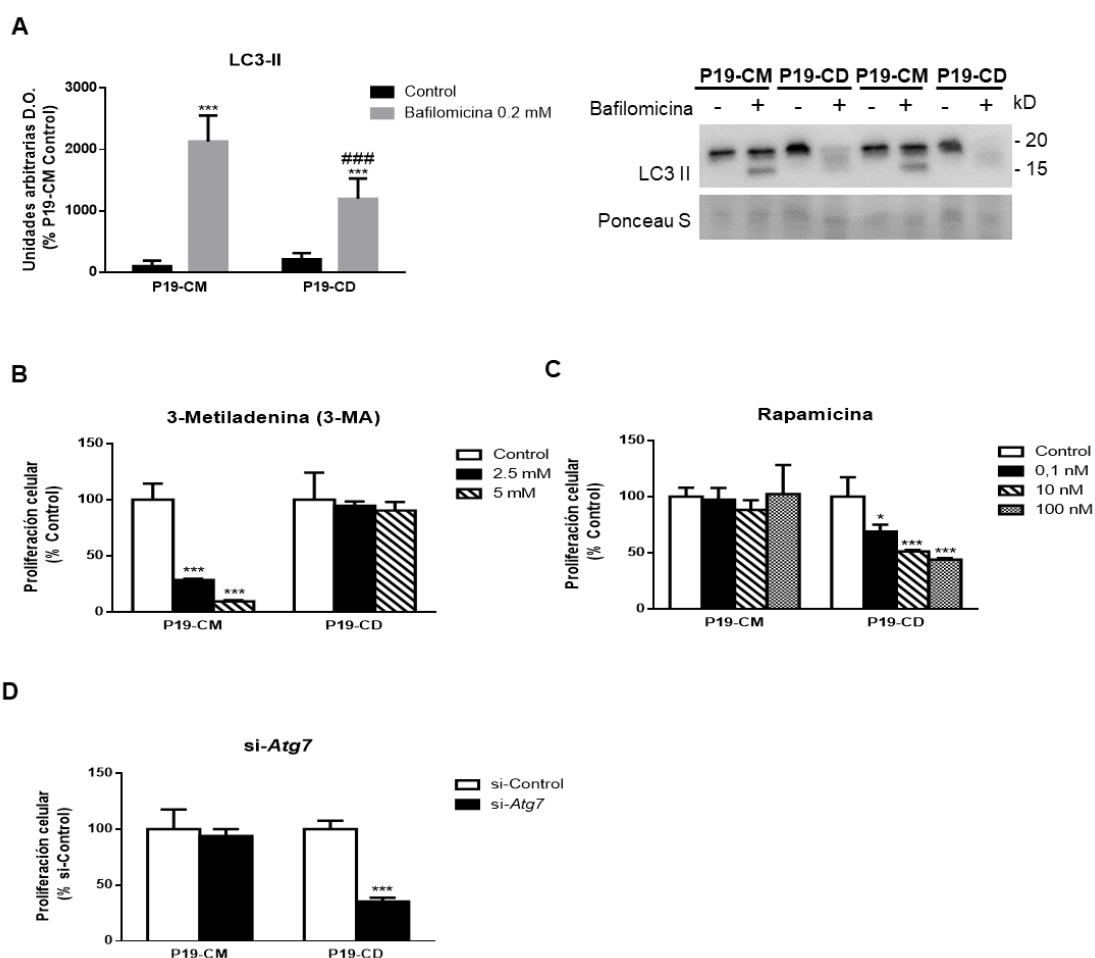


Figura 25. (A) Expresión del marcador de autofagosomas LC3-II en células madre P19 (P19-CM) y sus equivalentes diferenciadas (P19-CD) después de bloquear la autofagia de fase tardía con bafilomicina A1. Los gráficos de barras muestran las medias de la densidad óptica (D.O.) \pm D.E. expresado como porcentaje de P19-CM, de tres inmunotransferencias separadas. Se usó Ponceau S para el control de carga de gel. $***p < 0,001$ (B) Efecto del inhibidor de la fosfatidilinositol 3-quinasa, 3-metiladenina (3-MA), a 2,5 y 5 mM; (C) del inhibidor de MTOR, rapamicina, a 0,1, 10 y 100 nM; y (D) del silenciamiento de Atg7 (si-Atg7) sobre la proliferación celular en ambos tipos de células P19 después de 72 horas de tratamiento. Los datos se expresan como porcentaje del control (solo vehículo o siRNA sin sentido (si-Control)). Los datos son medias \pm D.E. de una $n=5$. Comparaciones estadísticas: * vs. control #vs. P19-CMBaf+. El número de símbolos marca el nivel de significancia * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, $***p < 0,001$.

LA ACTIVACIÓN DE LA AUTOFAGIA EN LAS CÉLULAS MADRE P19 CONTRIBUYE A MANTENER UNA ADECUADA CALIDAD MITOCONDRIAL

Las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos, capaces de cambiar su morfología mediante los procesos de fusión y fisión mitocondrial. Una dinámica mitocondrial desequilibrada se ha asociado con una degradación autofágica mitocondrial alterada que da como resultado la aparición de mitocondrias alargadas y disfuncionales.

Tras evaluar la dinámica mitocondrial, los resultados obtenidos mostraron que la diferenciación de las células P19 conduce al incremento en la expresión de la proteína OPA1 ($p < 0,001$), la cual está involucrada en mediar los procesos de fusión mitocondrial (Fig.26A), mientras que la expresión de la proteína de fisión, DRP1 permaneció inalterada (Fig.26B), sugiriendo cambios en la tasa de recambio mitocondrial. De hecho, tras el tratamiento con bafilomicina A1 para medir el flujo mitofágico, se observó que el reclutamiento de p62 a las mitocondrias fue mayor en P19-CM (Fig.26C), lo que sugiere una mayor tasa de recambio mitocondrial en las células indiferenciadas. Por ello, la activación de la autofagia en las P19-CM probablemente contribuya a mantener y seleccionar subpoblaciones mitocondriales con una calidad mitocondrial adecuada para el mantenimiento de la pluripotencia.

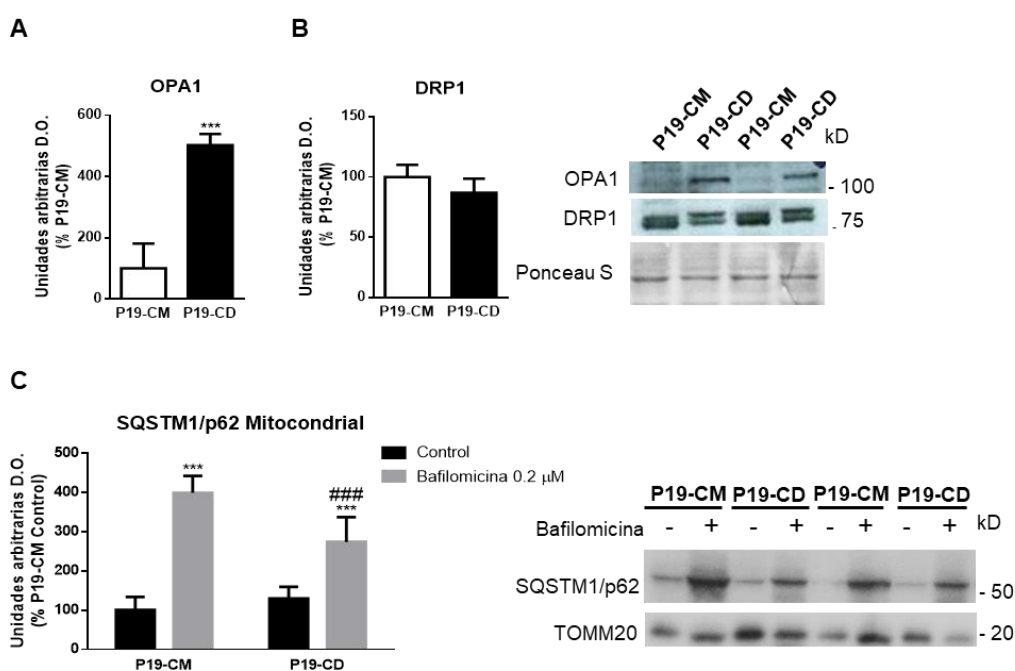


Figura 26. La diferenciación de las células promueve la fusión mitocondrial y marca a las mitocondrias para degradación autofágica. **(A)** Niveles de proteína de fusión mitocondrial OPA-1 y **(B)** niveles de proteína de fisión mitocondrial DRP-1 en células madre P19 (P19-CM) y células P19 diferenciadas con ácido retinoico (P19CD). Los gráficos de barras muestran las medias de la densidad óptica (D.O) \pm D.E. expresado como porcentaje de P19-CM, de tres inmunotransferencias separadas. Ponceau S se utilizó como control de carga del gel. *** $p < 0,001$. **(C)** Niveles de expresión de la proteína SQSTM1/p6 en

extractos mitocondriales después de bloquear la autofagia en fases tardías con bafilomicina A1. TOMM20 se utilizó como control de carga para verificar el aislamiento mitocondrial. El gráfico de barras muestra las medias de la densidad óptica (D.O) \pm D.E. (normalizadas con TOMM20) expresado como porcentaje de p62 mitocondrial detectado en P19-CM de tres experimentos realizados por separado. * vs. control # vs. P19-CMBaf+. El número de símbolos marca el nivel de significancia. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

LA SEÑALIZACIÓN DE PI3K, LA AUTOFAGIA Y LA APOPTOSIS SON NECESARIAS PARA EL MANTENIMIENTO DE LA TRONCALIDAD Y DEL POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS P19

Los experimentos por inmunoblot de los principales factores de transcripción implicados en el mantenimiento de las células madre embrionarias revelaron que la inhibición de la PI3K, la autofagia y de la apoptosis impacta sobre el mantenimiento de la pluripotencia. El tratamiento de las P19-CM con wortmanina, un inhibidor de la PI3K, disminuyó la expresión de OCT4 (factor de transcripción de unión a octámero 4) ($p < 0,001$) (Fig. 27A) y de la proteína SOX2, también conocida como SRY-box 2 (región determinante del sexo Y-box 2) ($p < 0,01$) (Fig. 27B). El silenciamiento de *Atg7* con siARN en las P19-CM ejerció el mismo efecto, reduciendo la expresión de OCT4 ($p < 0,001$) (Fig. 28A) y SOX2 ($p < 0,05$) (Fig. 28B). Por otra parte, el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK redujo la expresión de OCT4 ($p < 0,001$) (Fig.29A) sin afectar a la expresión de SOX2 (Fig.27B), y NANOG (proteína nanog homeobox) (Fig.29C). Además, los tratamientos tanto con wortmanina como con Z-VAD-FMK, aumentaron drásticamente la expresión de β III-tubulina ($p < 0,001$) (Fig.27E y Fig.29E), sugiriendo que la inhibición de la señalización PI3K y de las caspasas, además de reducir la pluripotencia, desencadena la diferenciación de las células madre embrionarias.

Para evaluar si la señalización de PI3K, la autofagia y la apoptosis son indispensables para la diferenciación celular, se diferenciaron las P19-CM en presencia de wortmanina, del oligonucleótido de siARN *Atg7* y de Z-VAD-FMK y se evaluaron los cambios en la expresión de los marcadores de diferenciación. Aunque los tratamientos con wortmanina y Z-VAD-FMK redujeron ligeramente la expresión de β III-tubulina en las P19-CD (Fig.27E y Fig.29E), el marcador trofoectodérmico KRT8/citoqueratina 8 (TROMA-1) se redujo significativamente ($p < 0,001$) (Figs.27D y 29D). Además, el silenciamiento de *Atg7* redujo los niveles de expresión de las proteínas β III-tubulina ($p < 0,001$) (Fig.28D) y TROMA-1 ($p < 0,01$) (Fig.28E) en las P19-CD, lo que confirma la interrupción en el patrón de diferenciación normal inducido por el AR. Por lo tanto, la señalización de PI3K y las vías autofágicas y apoptóticas parecen ser necesarias para mantener la pluripotencialidad e inducir una diferenciación adecuada.

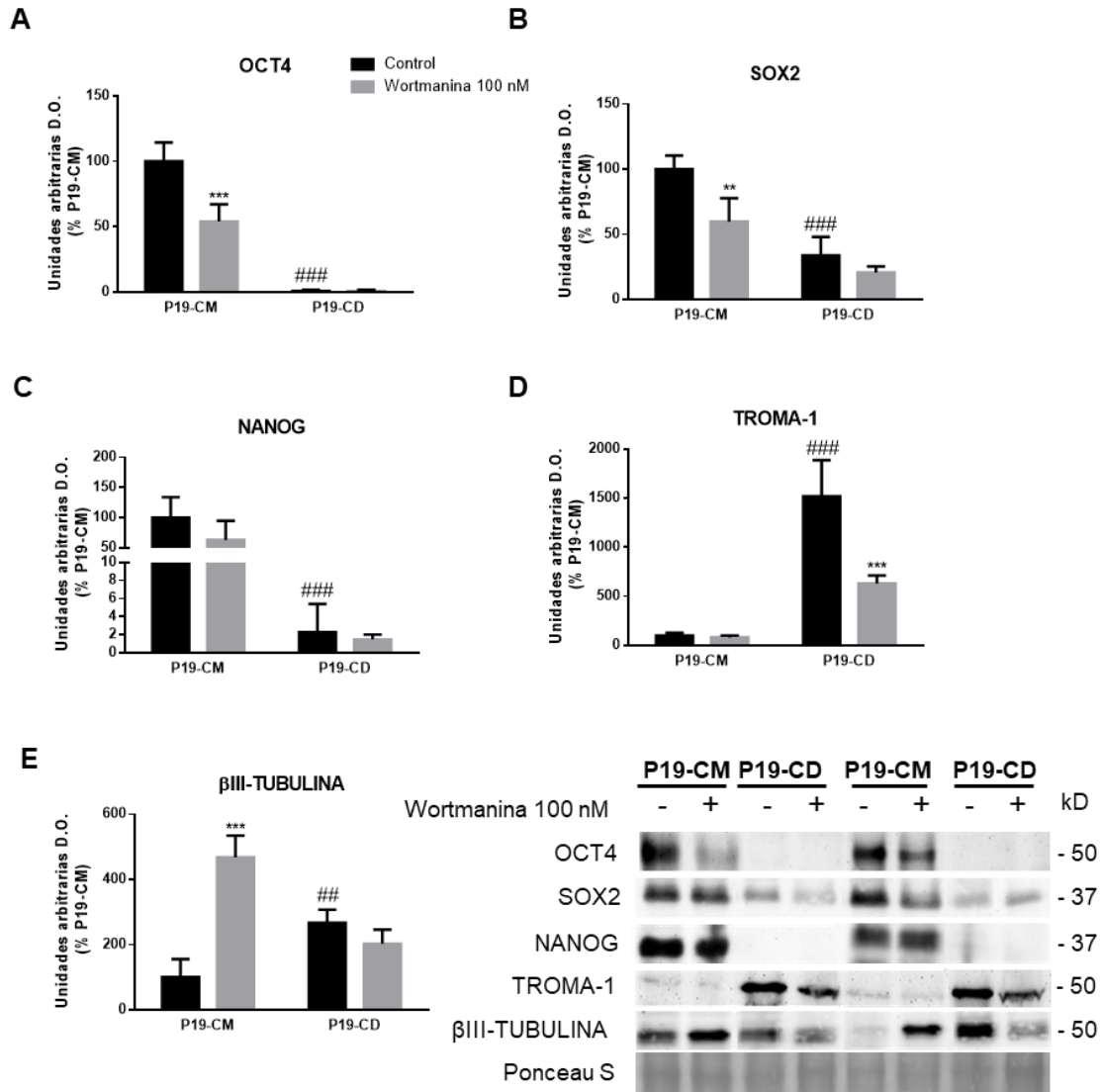


Figura 27. La inhibición de la señalización PI3K con wortmanina altera el destino celular. Niveles de expresión de los principales marcadores de pluripotencia **(A)** OCT4, **(B)** SOX2 y **(C)** NANOG y de diferenciación **(D)** TROMA1 y **(E)** β-TUBULINA III en células madre P19 (P19-CM) tratadas con wortmanina (100 nM) y en células P19 diferenciadas con ácido retinoico (P19-CD) en presencia de wortmanina (100 nM). Los gráficos de barras muestran las medias de la densidad óptica (D.O.) ± D.E. expresado como porcentaje de P19-CM no tratadas (P19-CM control), de tres inmunotransferencias separadas. Se usó Ponceau S para el control de carga de gel. Comparaciones estadísticas: * vs. control; # vs. P19-CM. El número de símbolos marca el nivel de significación: uno para $p < 0,05$, dos para $p < 0,01$ y tres para $p < 0,001$.

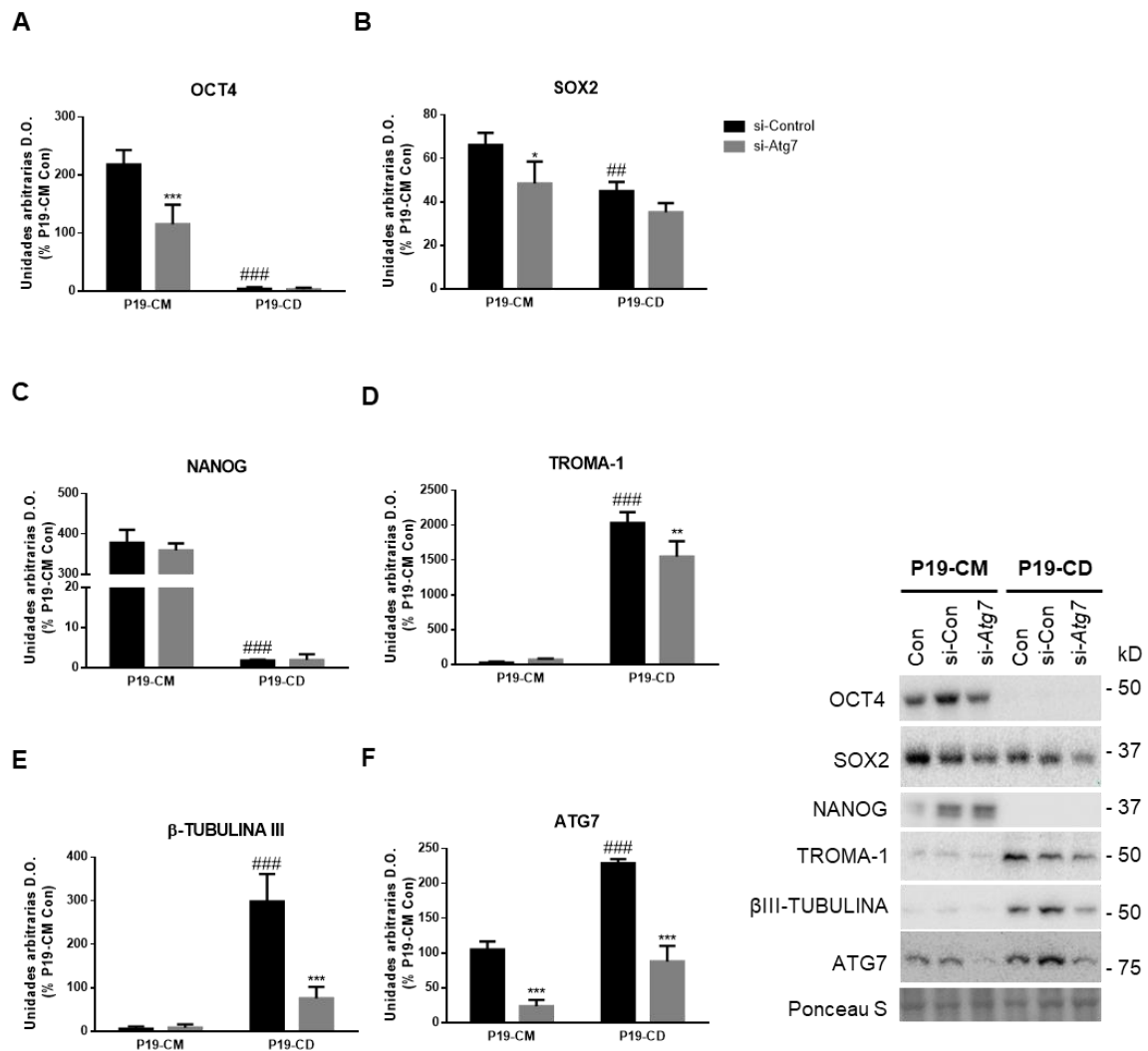


Figura 28. La inhibición de la autofagia altera el destino celular. Niveles de expresión de los principales marcadores de pluripotencia **(A)** OCT4, **(B)** SOX2 y **(C)** NANOG y de diferenciación **(D)** TROMA1 y **(E)** β -TUBULINA III en células madre P19 (P19-CM) transfectadas con oligonucleótidos de siARN *Atg7* (si-*Atg7*) o con un siARN no codificante (si-Control) y en células P19 diferenciadas (P19-CD) en presencia de oligonucleótidos de siARN. Además, se detectaron los niveles proteicos de **(F)** ATG7 para confirmar la persistencia del silenciamiento. Los gráficos de barras muestran las medias de densidad óptica (D.O) \pm D.E. expresadas como porcentaje de P19-CM si-Control, de tres inmunotransferencias separadas. Se usó Ponceau S para el control de carga de gel. Comparaciones estadísticas: * vs. control; # vs. P19-CM. El número de símbolos marca el nivel de significación: uno para $p < 0,05$, dos para $p < 0,01$ y tres para $p < 0,001$.

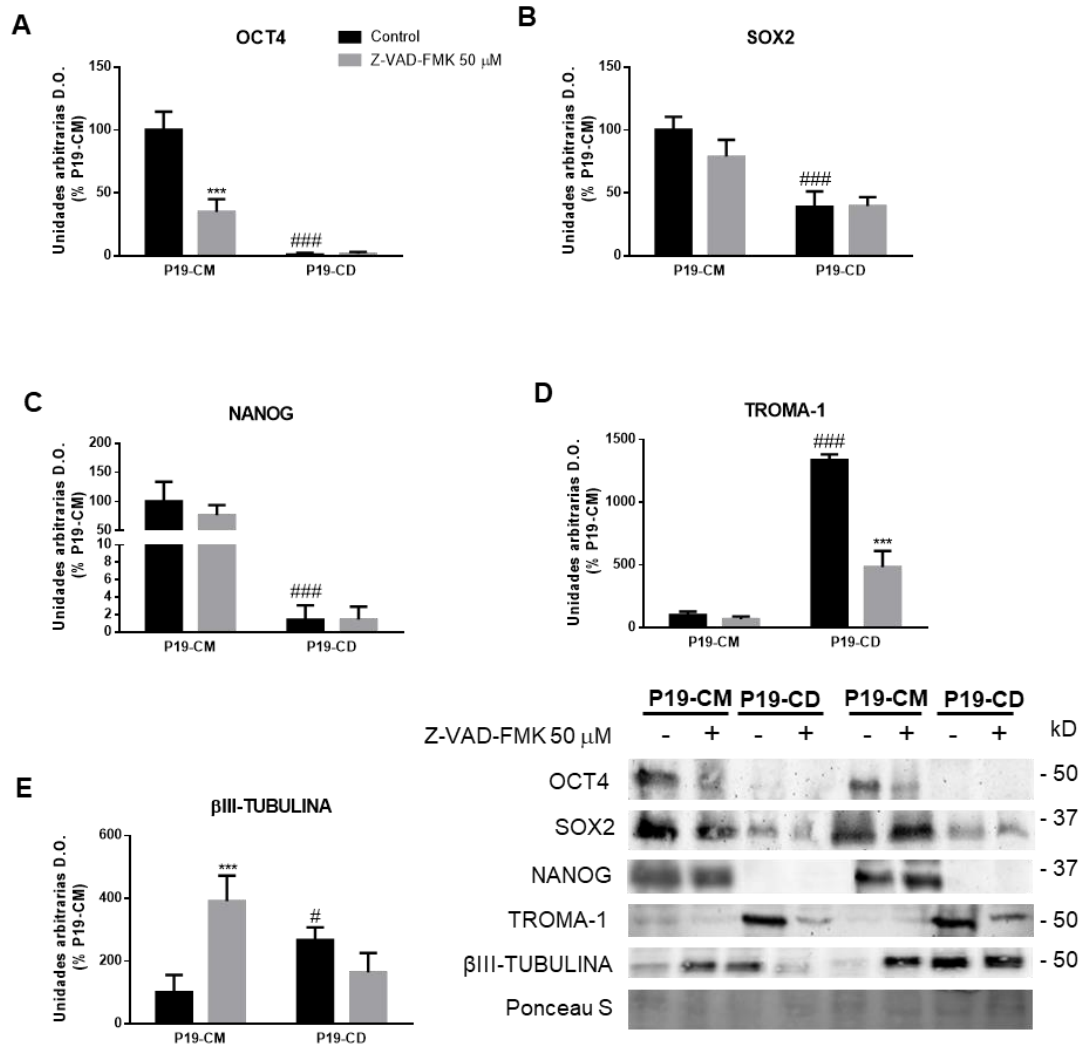


Figura 29. La inhibición de las caspasas altera el destino celular. Niveles de expresión de los principales marcadores de pluripotencia **(A)** OCT4, **(B)** SOX2 y **(C)** NANOG y de diferenciación **(D)** TROMA1 y **(E)** β III-TUBULINA en células madre P19 (P19-CM) tratadas con el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK (50 μ M) y en células P19 diferenciadas con AR (P19-CD) en presencia de Z-VAD-FMK (50 μ M). Los gráficos de barras muestran las medias de densidad óptica (D.O) \pm D.E. expresadas como porcentaje de P19-CM no tratadas, de tres inmunotransferencias separadas. Se usó Ponceau S para el control de carga de gel. Comparaciones estadísticas: * vs. control; # vs. P19-CM. El número de símbolos marca el nivel de significación: uno para $p < 0,05$, dos para $p < 0,01$ y tres para $p < 0,001$.

LAS CÉLULAS C2C12 ENTRAN EN SENESCENCIA PASADOS LOS 65 CICLOS DE DUPLICACIÓN

Para determinar el momento de entrada en senescencia de la línea celular C2C12 utilizamos el modelo de duplicación de poblaciones múltiples que nos permitió investigar *in vitro* las múltiples divisiones que ocurren *in vivo* en las células precursoras musculares. Se realizó el cálculo de los DP y TD en cada pase durante el cultivo de la línea celular. Los datos obtenidos mostraron que durante los primeros 8 DP, el TD experimentó variaciones que oscilaban entre las 20 y 15 horas hasta que las células se adaptaron a las condiciones de crecimiento. Posteriormente, el TD de las células C2C12 fue de, aproximadamente, 12 horas y se mantuvo estable hasta los 65 DP. A partir de este momento, el TD aumentó gradualmente hasta alcanzar valores entre las 18-20 horas, lo que se asoció con una disminución del potencial proliferativo debido probablemente a la detención del ciclo celular. Por lo tanto, los 65 DP fueron considerados como el punto de corte que marca la entrada en senescencia replicativa de las células C2C12 (Fig.30).

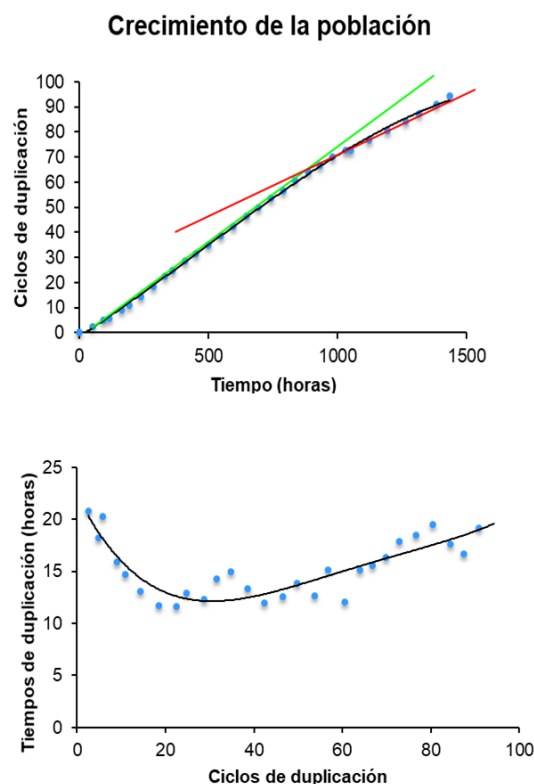


Figura 30. Evaluación de la dinámica de crecimiento mediante la determinación de los ciclos de duplicación de la población al final de cada pasaje y del tiempo de duplicación de la línea celular C2C12. Imagen cedida por la Dra. Potes. (Ochoa, 2019).

Con el fin de determinar con exactitud si las células C2C12 con DP superiores a 65 presentaban senescencia, se examinó por inmunoblot la expresión proteica de la enzima β -galactosidasa (SA- β -gal). Esta enzima, altamente incrementada tras la entrada en senescencia celular, cataliza la hidrólisis de los β -galactósidos en monosacáridos. En concordancia con los resultados obtenidos anteriormente se observó que este marcador se encontraba significativamente incrementado ($p < 0,001$) en las células C2C12 que presentaban un DP > 65 y que denominaremos senescentes (C2C12-S) con respecto a aquellas células C2C12 que presentaban un DP ≤ 65 y que denominaremos jóvenes (C2C12-J) (Fig.31).

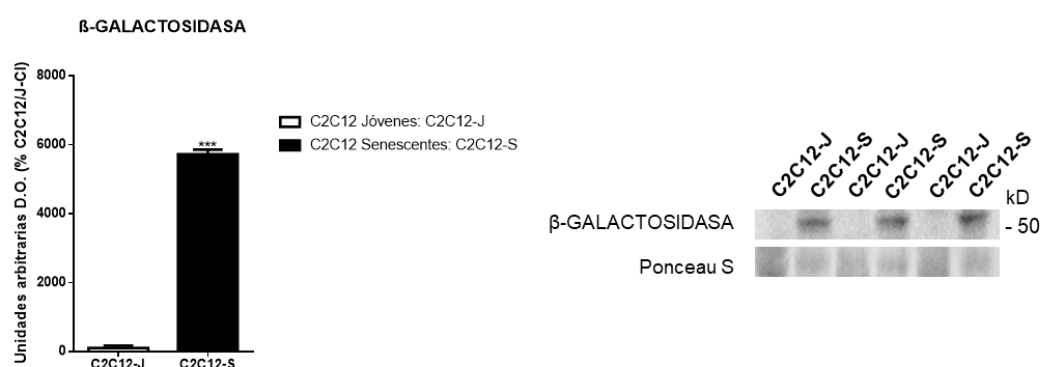


Figura 20. Análisis de los niveles de expresión del biomarcador de senescencia celular β -galactosidasa. De esta forma, se establecieron las dos condiciones experimentales: C2C12 Jóvenes = C2C12-J (< 65 ciclos de duplicación) y C2C12 Senescentes = C2C12-S (> 65 ciclos de duplicación). El gráfico de barras muestra la media de la densidad óptica (D.O.) \pm D.E. expresado como porcentaje de C2C12/J de tres inmunotransferencias independientes. Ponceau S se utilizó como control de carga. * vs. C2C12-J. *** $p < 0,001$

EL TRATAMIENTO DE MIOBLASTOS C2C12 CON MELATONINA PRODUCE EFECTOS AMBIVALENTES A NIVEL PROLIFERATIVO Y DEPENDIENTES DE LA CONCENTRACIÓN

La proliferación y diferenciación celular son eventos biológicos esenciales para la formación, reparación, mantenimiento y funcionalidad de todos los tejidos y órganos del organismo. Para determinar el papel de la melatonina en la actividad proliferativa de la línea celular C2C12 y, sobre todo, en aquellas células senescentes que presentan un aumento de la expresión de la SA- β -gal, se evaluó el efecto de la exposición a diferentes concentraciones de melatonina: 100 μ M, 50 μ M, 1 μ M, 100 nM y 1 nM durante 0, 24, 48, 72 y 96 horas utilizando el ensayo de SRB. Observamos que el tratamiento con concentraciones elevadas de melatonina, de 100 μ M ($p < 0,001$), 50 μ M ($p < 0,001$), y 1 μ M ($p < 0,001$) durante 72 horas, disminuyó drásticamente la proliferación celular de las C2C12-J (Fig.32A). En las C2C12-S

ocurre el mismo efecto antiproliferativo tras la exposición a concentraciones elevadas de melatonina ($p < 0,001$), salvo por la concentración 1 μM , la cual mantuvo, a las 72 horas, niveles de proliferación semejantes a los observados en las C2C12-S control (Fig.32B). Por otra parte, las concentraciones más bajas de melatonina, de 100 nM y 1 nM ($p < 0,01$), mantuvieron un efecto antiproliferativo en las C2C12-J (Fig.21A) pero, curiosamente, aumentaron la tasa de proliferación de las C2C12-S (Fig.32B). Cabe destacar que, a las 96 horas, el patrón proliferativo exhibido tanto por las células jóvenes como por las senescentes tras el tratamiento con las diferentes concentraciones de melatonina fue semejante al observado a las 72 horas (Fig.32AyB). Únicamente se percibió un ligero incremento en la proliferación de las células C2C12-S tras verse expuestas durante 96 horas a las concentraciones 1 μM , 100 nM y 1 nM.

Dado que la exposición a las diferentes concentraciones de melatonina provocó un papel similar pasadas las 72 y 96 horas, para los siguientes estudios se seleccionó el tiempo de exposición de 72 horas y las concentraciones 100 μM , 1 μM y 1 nM, por ser las más representativas de los diferentes efectos ejercidos por esta indolamina a nivel proliferativo.

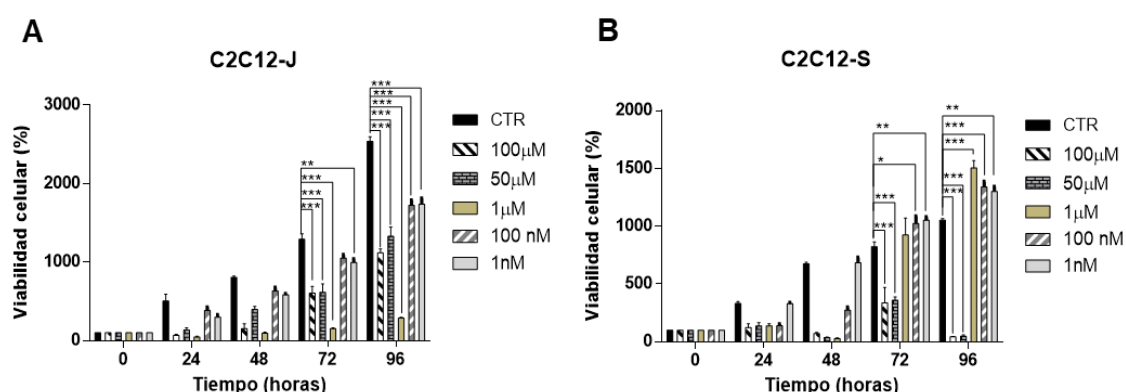


Figura 32. (A) y (B) El ensayo de Sulforhodamina B (SRB) muestra la capacidad de la melatonina para aumentar la proliferación de las células C2C12 senescentes (C2C12-S) mientras produce un efecto anti-proliferativo en las células C2C12 jóvenes (C2C12-J). Los datos representan el porcentaje promedio de absorbancia de SRB con el tiempo respectivo $0 \pm \text{D.E.}$ de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ frente al control (C2C12-J /C2C12-S no tratadas con melatonina).

Finalmente, tras analizar el efecto provocado por la melatonina en la actividad proliferativa de ambos tipos de células C2C12, jóvenes y senescentes, se evaluó mediante microscopía de contraste de fases los cambios morfológicos y se estimó la confluencia celular tras el tratamiento con las concentraciones de melatonina seleccionadas. Pese a que no se observaron diferencias morfológicas relevantes, este estudio evidenció que, efectivamente, a una concentración 1 nM de melatonina

los mioblastos senescentes no solo aumentaban su confluencia respecto a las células C2C12-S controles, sino que además adquirirían una confluencia semejante a la observada en las células C2C12-J no tratadas con la indolamina (Fig.33).

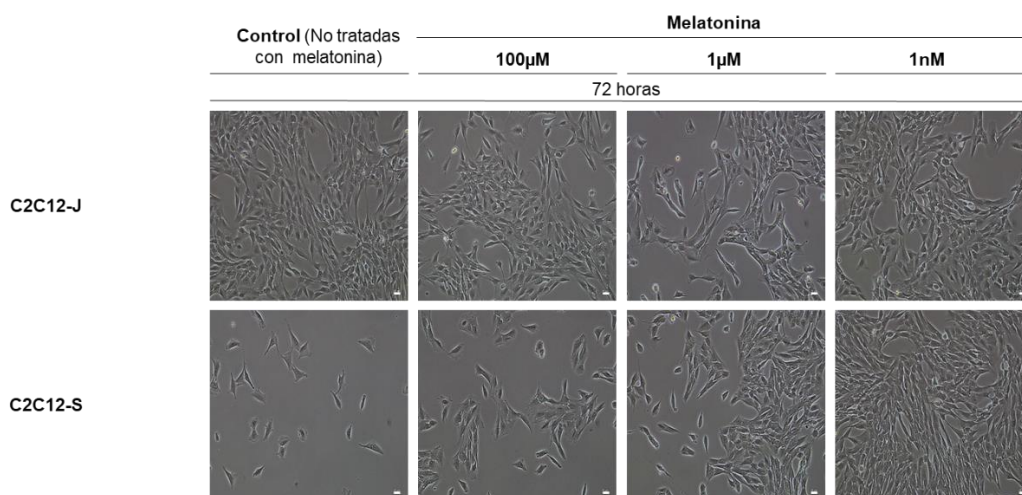


Figura 33. Microscopía de contraste de fase de mioblastos C2C12 jóvenes (C2C12-J) y senescentes (C2C12-S) tratados con diferentes concentraciones de melatonina (100 μ M, 1 μ M y 1 nM) durante 72 horas frente al grupo control tratado con vehículo. La barra de escala representa 25 μ m.

LA MELATONINA MODIFICA LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR DE LOS MIOBLASTOS C2C12

Una de las principales características de la senescencia celular, a parte de la expresión de la proteína SA- β -gal, es la detención permanente del ciclo celular. Por ello, y para profundizar en el significado biológico de los efectos proliferativos y antiproliferativos producidos por los diferentes tratamientos con melatonina en los mioblastos jóvenes y senescentes, se realizó el estudio del ciclo celular mediante un análisis de citometría de flujo con yoduro de propidio. Los resultados obtenidos mostraron que las células C2C12-J tratadas con melatonina presentaron diferencias en cuanto a la progresión del ciclo celular en comparación con el grupo no tratado. Como se puede ver en la tabla 1, las concentraciones 100 μ M y 1 μ M aumentaron significativamente el número de células en fase G1/G0 y G2/M ($p < 0,01$), disminuyendo el número de células inmersas en la fase S ($p < 0,01$), lo cual indica una fuerte detención de la progresión a lo largo del ciclo celular tras la exposición de los mioblastos jóvenes a elevadas concentraciones de melatonina. La concentración más baja de melatonina (1 nM) también detuvo la progresión del ciclo celular pero únicamente a nivel de la fase G2/M ($p < 0,01$).

Por otro lado, al comparar la progresión del ciclo celular entre mioblastos jóvenes y senescentes se observó como la senescencia induce un cambio en la distribución de las células entre las diferentes fases de forma que, en los mioblastos senescentes, el número de células en cada fase es aproximadamente el mismo, lo cual sugiere una pérdida del control del ciclo. El tratamiento de las células C2C12 senescentes con las distintas concentraciones de melatonina no afectó a dicha distribución.

Ciclo celular C2C12-J	Melatonina			
	Control	100µM	1µM	1nM
(Media ± Desviación estándar)				
G1/G0	78,7 ± 0,6	81,8 ± 1,3(**)	82,0 ± 0,3(**)	79,4 ± 0,3
S	14,9 ± 2,6	7,7 ± 1,6(**)	6,8 ± 0,5(**)	8,6 ± 0,5(**)
G2/M	6,3 ± 1,9	10,5 ± 0,4(**)	10,8 ± 0,4(**)	12,1 ± 0,8(**)
C2C12-S	Control	100µM	1µM	1nM
(Media ± Desviación estándar)				
G1/G0	31,2 ± 0,4	31,7 ± 0,5	29,9 ± 1,1	32,0 ± 0,9
S	37,7 ± 2,0	34,6 ± 0,9	38,7 ± 1,9	36,8 ± 2,4
G2/M	31,1 ± 1,7	33,7 ± 1,4	31,4 ± 0,9	31,1 ± 1,5

Tabla 1. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo utilizando yoduro de propidio en mioblastos de ratón C2C12 jóvenes (C2C12-J) y senescentes (C2C12-S), no tratados con melatonina (Control) y tratados con melatonina (100µM, 1µM y 1nM) durante 72 horas. Los datos se expresan como porcentaje de células en G1/G0, S y G2/M ± D.E. de tres experimentos independientes: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ frente al control.

LA MELATONINA AUMENTA LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO MITOCONDRIAL EN MIOBLASTOS C2C12

Diversas funciones mitocondriales como la producción de energía, la modulación del estado redox y la homeostasis del Ca^{2+} participan en procesos como la proliferación, diferenciación, muerte y senescencia celular. Por ello, hemos estudiado el efecto de la melatonina sobre la concentración de Ca^{2+} mitocondrial en los mioblastos jóvenes y senescentes. Para ello, se midió la entrada de Ca^{2+} mediante citometría de flujo después de los tratamientos con melatonina en ambos grupos experimentales. Como se muestra en la figura 34, el nivel del Ca^{2+} mitocondrial en las C2C12-J se vió incrementado significativamente en presencia de las tres concentraciones de melatonina: 100 µM ($p < 0,05$), 1 µM ($p < 0,001$) y 1 nM ($p < 0,01$). En las C2C12-S, la melatonina ejerció un efecto similar aumentando los niveles de Ca^{2+} cuando se administró a 100 µM y 1 µM ($p < 0,001$). Cabe destacar que los mioblastos senescentes tratados con la concentración más baja de melatonina 1 nM fue la única

condición experimental en la que la melatonina no aumentó los niveles de Ca^{2+} mitocondrial.

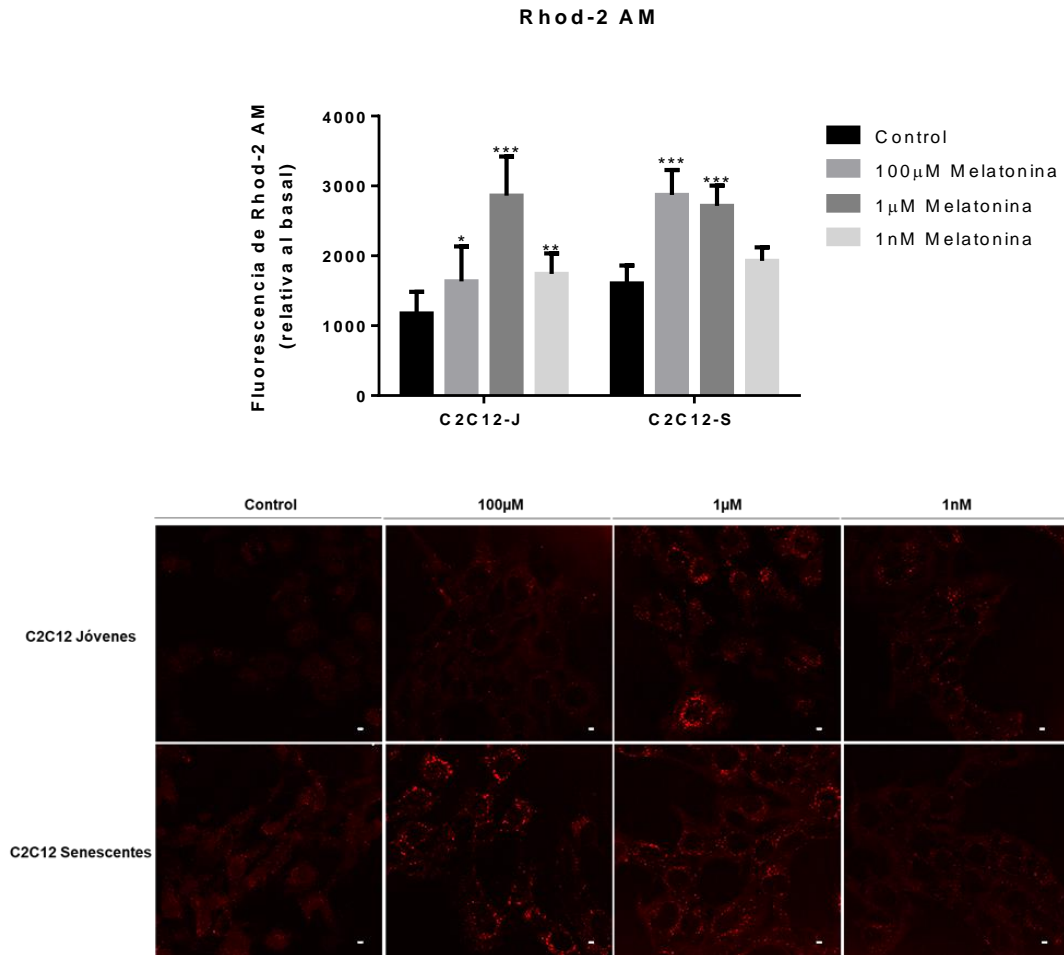


Figura 34. El gráfico de barras muestra la intensidad de fluorescencia del indicador de calcio Rhod-2 AM en mioblastos de ratón C2C12 jóvenes (C2C12-J) y senescentes (C2C12-S). Los datos se expresan como la media de Unidades Relativas de Fluorescencia \pm D.E. de tres experimentos independientes: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ frente al control no tratado con melatonina. Imágenes de microscopia confocal de todos los grupos experimentales marcados con el fluoróforo Rhod-2 AM. La barra de escala representa 25 μm .

LA MELATONINA NO ALTERA EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL DE LAS CÉLULAS C2C12

Como la mitocondria es capaz de secuestrar Ca^{2+} utilizando el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi\text{m}$) y, dado que hemos detectado importantes cambios en los niveles de Ca^{2+} mitocondrial tras el tratamiento con las diferentes concentraciones de melatonina, se decidió analizar si la melatonina también inducía cambios en la función mitocondrial midiendo el $\Delta\psi\text{m}$ por citometría de flujo utilizando la sonda TMRM. Los datos mostraron que las C2C12-S presentan un menor $\Delta\psi\text{m}$ en comparación con las

C2C12-J ($p < 0,001$) lo que sugiere una menor función mitocondrial. Los tratamientos con las diferentes concentraciones de melatonina no provocaron ningún cambio en el $\Delta\psi_m$ de los dos tipos de células C2C12 (Fig.35).

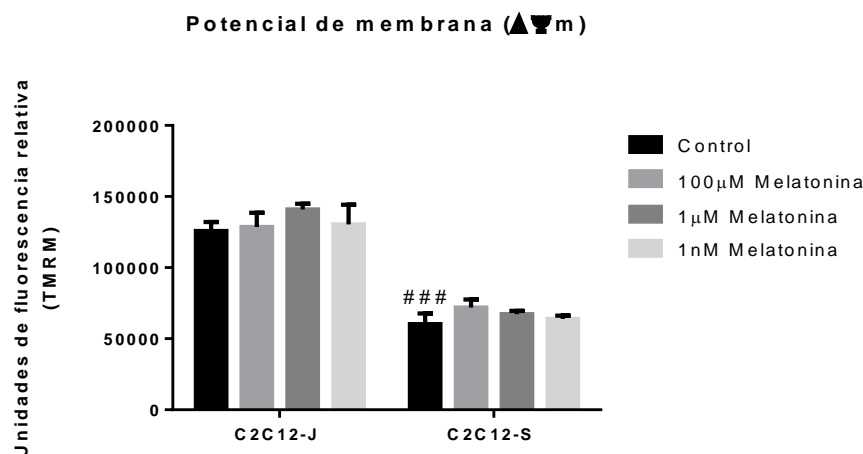


Figura 35. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) en células C2C12 jóvenes (C2C12-J) y senescentes (C2C12-S) no tratadas (control) y tratadas con melatonina (100 μ M, 1 μ M y 1 nM) durante 72 horas. Al final de la incubación, las muestras se mezclaron con TMRM 50 nM y la fluorescencia se cuantificó mediante citometría de flujo. Los datos son la media \pm D.E. de tres experimentos independientes. Comparaciones estadísticas: # vs. C2C12-J no tratado con melatonina. ### $p < 0,001$.

EL TRATAMIENTO CON MELATONINA AUMENTA EL FLUJO AUTOFÁGICO EN LOS MIOBLASTOS C2C12 SENESCENTES

A la vista de los resultados obtenidos en las células P19 sobre la relevancia de la autofagia para el mantenimiento de las células madre en condiciones óptimas de calidad para su correcto funcionamiento decidimos estudiar el flujo autofágico en nuestro modelo de senescencia de células precursoras musculares. Para evaluar el flujo de autofagia, inhibimos la fusión autofagosoma-lisosoma con bafilomicina A1 y detectamos la acumulación de LC3-II. Observamos que, de acuerdo con nuestra premisa, los mioblastos jóvenes, los cuales presentan mayor capacidad miogénica que los senescentes (Ochoa, 2019), exhibieron un mayor flujo autofágico ($p < 0,001$). Los tratamientos de los mioblastos jóvenes con melatonina no alteraron dicho flujo, exceptuando la concentración 1 nM que produjo una menor acumulación de LC3-II ($p < 0,001$). En el caso de los mioblastos C2C12 senescentes, observamos que cualquiera de los tres tratamientos con melatonina (100 μ M, 1 μ M y 1 nM) consiguió aumentar la acumulación de LC3-II ($p < 0,001$) a niveles similares a los detectados en mioblastos jóvenes (Fig.36).

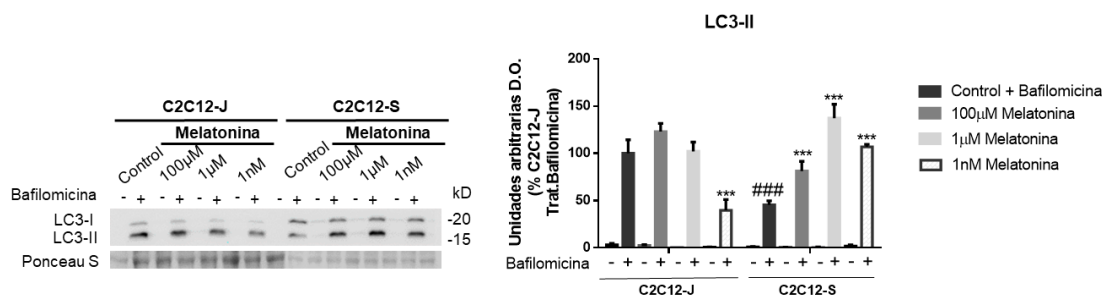


Figura 36. Niveles de acumulación del marcador autofagosomal LC3-II en mioblastos C2C12 jóvenes (C2C12-J) y senescentes (C2C12-S) no tratados (control) y tratados con melatonina (100µM, 1µM y 1nM) durante 72 horas, después de bloquear la autofagia de fase tardía con bafilomicina A1. Los gráficos de barras muestran las medias de densidad óptica (D.O.) ± D.E. expresadas como porcentaje de mioblastos C2C12-J tratados con bafilomicina, de tres inmunotransferencias separadas. Se usó Ponceau S para el control de carga de gel. Comparaciones estadísticas: # vs. C2C12-J no tratado con melatonina + tratamiento con bafilomicina A1. ### $p < 0,001$ y * vs. control. *** $p < 0,001$.

EL TRATAMIENTO CON MELATONINA AUMENTA LA VIABILIDAD DE LOS MIOBLASTOS C2C12 SENESCENTES

Tras observar que las diferentes concentraciones de melatonina provocaban efectos diversos a nivel proliferativo y de ciclo celular en ambos tipos de células precursoras musculares C2C12 y que, además, aumentaban la autofagia en las C2C12 senescentes, decidimos analizar la muerte/viabilidad celular por citometría de flujo utilizando Anexina V junto con yoduro de propidio para identificar el porcentaje de células necróticas, apoptóticas y viables en cada condición experimental.

En los mioblastos jóvenes, las tres concentraciones de melatonina mostraron un potente efecto anti-proliferativo que podía ser producido por retenciones en el ciclo celular en G_0/G_1 para las dosis más altas (100µM y 1µM) además de en G_2/M para las tres concentraciones testadas. Al analizar los resultados obtenidos en el ensayo con Anexina V y yoduro de propidio, se observó que las concentraciones de 100µM y 1µM no alteraron el porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas respecto al control (Tabla 2). Por tanto, el efecto anti-proliferativo de las concentraciones elevadas de melatonina sobre los mioblastos jóvenes está mediado por retenciones del ciclo celular, sin afectar a la viabilidad y muerte celular. De hecho, en estas condiciones experimentales el mantenimiento de la viabilidad celular podría estar favorecido por el mantenimiento de unas tasas elevadas de autofagia. Sin embargo, el tratamiento de mioblastos jóvenes con 1nM de melatonina tuvo un efecto diferente: además de provocar una parada únicamente en G_2/M y de reducir la tasa de

autofagia, aumentó el porcentaje de células apoptóticas disminuyendo así el porcentaje de células viables (Tabla 2).

Los mioblastos C2C12 senescentes mostraron respecto a sus equivalentes jóvenes casi más de diez puntos porcentuales de células apoptóticas (14,52 vs. 4,66%) de forma que su viabilidad se redujo con la senescencia desde un 92,62% hasta un 83%. Cuando estos mioblastos senescentes fueron tratados con la concentración más elevada de melatonina (100µM) no se apreciaron cambios destacables en los porcentajes de células viables y apoptóticas respecto al control, a pesar de que, como vimos anteriormente, esta concentración producía un fuerte efecto anti-proliferativo. Por el contrario, las concentraciones 1µM y 1nM de melatonina aumentaron la proliferación de los precursores musculares senescentes, un efecto que fue acompañado, además de por un aumento en el flujo autofágico, de una reducción en el número de células apoptóticas y un aumento en el número de células viables que alcanzaron niveles similares a los observados en los mioblastos jóvenes (Tabla 2).

C2C12-J	Anexina FITC	Control	Melatonina		
			100µM	1µM	1nM
			% Células		
	Viabilidad	92,62%	92,39%	92,63%	88,26%
	Apoptosis Basal	1,05%	1,02%	1,14%	1,25%
	Apoptosis Tardía	4,66%	3,63%	3,83%	7,76%
	Necrosis	1,67%	2,96%	2,40%	2,73%

C2C12-S	Anexina FITC	Control	Melatonina		
			100µM	1µM	1nM
			% Células		
	Viabilidad	83,00%	81,91%	90,90%	91,65%
	Apoptosis Basal	0,75%	0,86%	0,89%	1,41%
	Apoptosis Tardía	14,52%	14,91%	5,66%	4,73%
	Necrosis	1,73%	2,24%	2,55%	2,21%

Tabla 2. Análisis de la apoptosis por citometría de flujo utilizando Anexina V y yoduro de propidio en mioblastos de ratón C2C12 Jóvenes (C2C12-J) y Senescentes (C2C12-S) no tratados con melatonina (Control) y tratados con melatonina (100 µM, 1 µM y 1 nM) durante 72 horas. Los datos se expresan como porcentaje de células en viabilidad, apoptosis basal, apoptosis tardía y necrosis.

LA MELATONINA ALTERA LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA

Para comprobar si los tratamientos con melatonina provocaban un efecto positivo sobre la miogénesis de las células C2C12-S decidimos estudiar la expresión proteica de marcadores de diferenciación miogénica como los factores de transcripción de la familia caja emparejada, PAX3 y PAX7 y los factores reguladores miogénicos (MRFs), MYF5, MYOD y miogenina (MYOG).

En primer lugar, con respecto a los tratamientos con melatonina, observamos que el tratamiento de mioblastos jóvenes con 100 μM de melatonina, además de reducir la proliferación celular y generar una detención del ciclo celular, aumentó significativamente la expresión de PAX7 ($p < 0,001$) (Fig.37B), lo que podría sugerir que estos mioblastos se encuentran en la fase de mantenimiento del nicho celular. Otra posibilidad sería que la melatonina, a elevadas concentraciones, estuviera induciendo en mioblastos jóvenes la diferenciación miogénica. Sin embargo, no se observó un aumento en la expresión de los factores miogénicos tempranos claves para la determinación miogénica como MYF5 y MYOD. De hecho, la expresión del marcador de diferenciación tardía MYOG presentó incluso una leve tendencia a la baja. Nuevamente, se observó que el tratamiento de mioblastos jóvenes con bajas concentraciones de melatonina ejerce un efecto opuesto. El tratamiento con 1 nM, además de producir una parada del ciclo celular en G2/M, reducir la autofagia y aumentar el porcentaje de células apoptóticas, aumentó la expresión de MYF5 y MYOG ($p < 0,001$) (Fig.37 C y E) induciendo así la determinación y diferenciación de los mioblastos.

Por otra parte, las células C2C12 senescentes mostraron un patrón totalmente diferente. La concentración de 100 μM tendió a aumentar la expresión de los factores MYF5 y MYOD (Fig.37 C y D), pero no fue capaz de aumentar la expresión de MYOG, siendo este esencial para el compromiso con la diferenciación miogénica. De hecho, MYOG presentó una reducción significativa en su expresión proteica ($p < 0,05$) (Fig. 37E). Por otra parte, no se observó ninguna diferencia en la expresión de los marcadores de diferenciación tras el tratamiento con 1 μM de melatonina con respecto a sus equivalentes no tratadas, pero sí con la concentración más baja de melatonina. Sorprendentemente, la exposición de mioblastos senescentes a 1 nM de melatonina fue capaz de aumentar la expresión de la proteína PAX3 ($p < 0,05$) (Fig.37A), un marcador temprano de precursores miogénicos del dermomiótomo (Bober, Franz, Arnold, Gruss, & Tremblay, 1994). Aunque las funciones de PAX3 no están bien esclarecidas en la regeneración muscular, sí que se ha observado que puede desempeñar funciones similares en la activación de genes miogénicos como MYOD (Relaix et al., 2006). Además, se observó que esta misma concentración de melatonina disminuyó la expresión de MYOG (Fig.37E), alcanzando niveles semejantes a los observados en las células C2C12-J no tratadas. Estos datos sugieren, junto con los resultados expuestos anteriormente donde se muestra una mayor autofagia, viabilidad y una menor apoptosis, que los mioblastos senescentes tratados con bajas concentraciones de melatonina se encuentran en mejores

condiciones que los no tratados para afrontar un proceso de diferenciación a miotubos.

Por último, no se observaron grandes diferencias al comparar el patrón de expresión de estos marcadores miogénicos entre mioblastos jóvenes y senescentes, salvo en la expresión de MYOG que fue significativamente mayor en las C2C12 senescentes ($p < 0,01$) (Fig.37E), probablemente debido al empuje hacia la diferenciación celular en respuesta al daño acumulado por la senescencia y como alternativa a la muerte celular que hemos visto también aumentada.

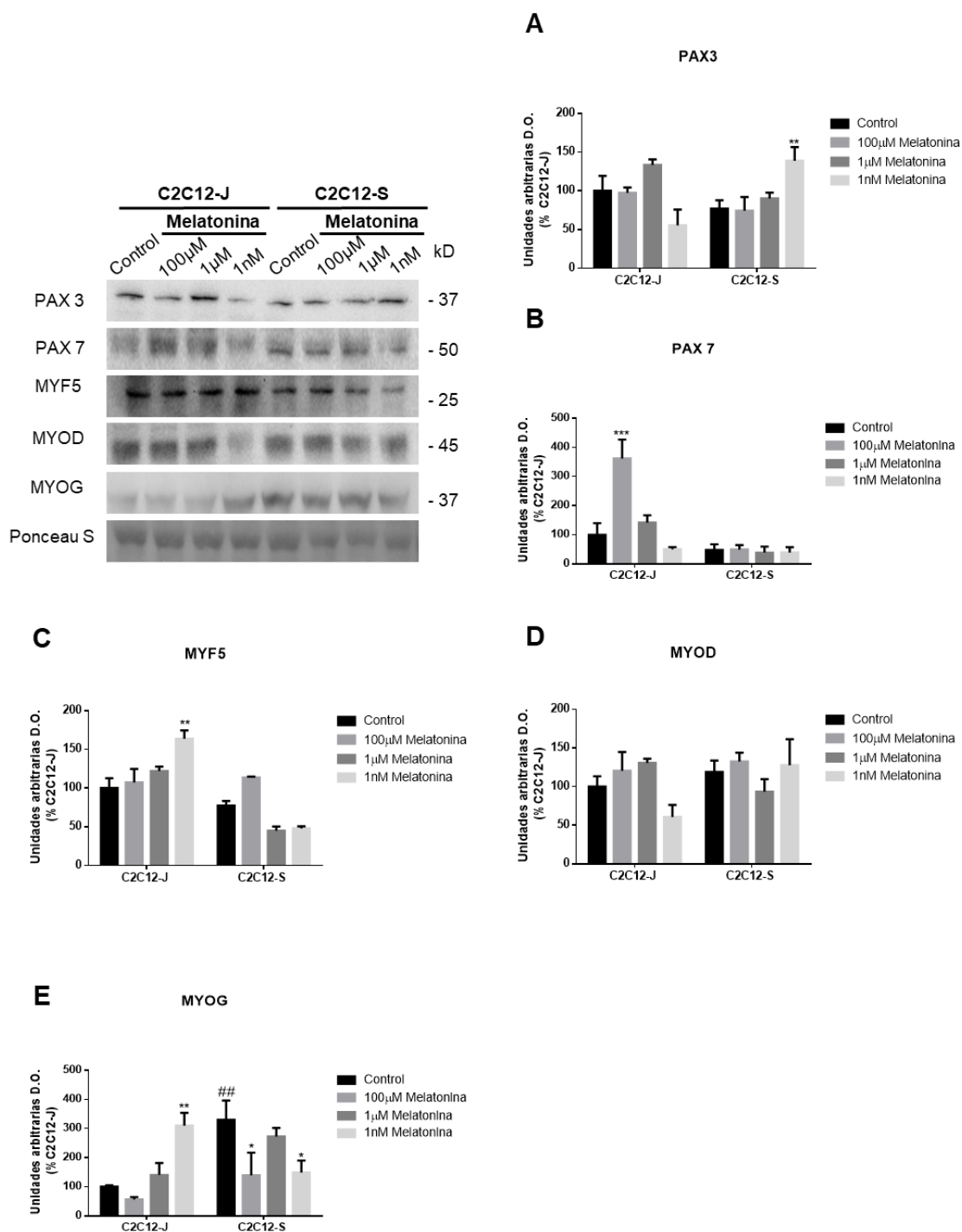


Figura 37. Análisis de los niveles de expresión de los marcadores de miogénesis muscular **(A)** PAX3, **(B)** PAX7, **(C)** MYF5, **(D)** MYOD y **(E)** MYOG en células C2C12 jóvenes (C2C12-J) y senescentes (C2C12-S) tratadas con diferentes concentraciones de melatonina (100 µM, 1 µM y 1 nM). Ponceau S se utilizó como control de carga de gel. Los gráficos de barras muestran las medias de densidad óptica (D.O) ± D.E. expresadas como porcentaje de C2C12-J no tratadas, de tres inmunotransferencias separadas. Comparaciones estadísticas: * vs. control; # vs. C2C12-J no tratado con melatonina. El número de símbolos marca el nivel de significación: uno para $p < 0,05$, dos para $p < 0,01$ y tres símbolos $p < 0,001$.

LA MELATONINA RECUPERA LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS C2C12 SENESCENTES

Los resultados obtenidos hasta este momento nos llevaron a plantear la posibilidad de que la melatonina, a una baja concentración, pudiese ayudar en el rescate de mioblastos senescentes a un estado de mayor capacidad funcional.

En este contexto, resultados anteriores de nuestro grupo de investigación demostraron que la diferenciación de mioblastos C2C12 a miotubos estaba acompañada de una reducción general del metabolismo energético y que la activación de la autofagia era esencial para esa reprogramación metabólica (Ochoa, 2019). Por ello, para averiguar si la melatonina favorece una remodelación metabólica asociada al proceso de diferenciación decidimos evaluar los niveles de ATP, de chaperonas BIP, de proteínas ubiquitinizadas, de Beclín-1 y de flujo autofágico. Para ello, analizamos tanto el pretratamiento durante 72 horas de los mioblastos C2C12 jóvenes y senescentes con la concentración más baja de melatonina (1nM) testada con anterioridad, como con la concentración más alta (100 μ M), tras el cual se indujo la diferenciación miogénica con suero de caballo al 2% durante 7 días.

Efectivamente, se observó que el tratamiento de mioblastos C2C12 jóvenes y senescentes con las dos concentraciones de melatonina contribuyó a una reducción en los niveles de ATP ($p < 0,001$) tras los 7 días de diferenciación a miotubos (Fig.38A). Respecto a los sistemas de control de calidad de proteínas, observamos que el tratamiento con 1 nM de melatonina aumentó los niveles de BiP (Fig.38B), al mismo tiempo que redujo los niveles de proteínas ubiquitinizadas (Fig.38C), tanto en miotubos procedentes de mioblastos C2C12-J como en los procedentes de C2C12-S. Sin embargo, el tratamiento con 100 μ M de melatonina aumentó los niveles de BiP en ambos tipos de miotubos C2C12, pero únicamente redujo el nivel de proteínas ubiquitinizadas en los miotubos C2C12 senescentes. Posteriormente, al analizar la expresión proteica del regulador autofágico Beclín-1, se observó que el pretratamiento con 1 nM de melatonina consigue aumentar su expresión significativamente tanto en los miotubos jóvenes ($p < 0,01$) como en los senescentes ($p < 0,001$) respecto a los miotubos control no tratados (Fig.38D). No obstante, al evaluar el flujo autofágico tras el bloqueo con bafilomicina observamos que el pretratamiento con la dosis más baja de melatonina redujo significativamente la acumulación de LC3-II tanto en miotubos C2C12-J ($p < 0,001$) como en miotubos C2C12-S ($p < 0,001$) (Fig.38E), indicando un efecto inhibitor de esta concentración de melatonina sobre la autofagia. Curiosamente, la concentración 100 μ M no alteró el flujo autofágico respecto al detectado en los miotubos control. Cabe destacar en este contexto que los miotubos

senescentes presentaron un flujo autofágico mayor que los jóvenes que podría relacionar la necesidad de reciclar estructuras dañadas con su reducida capacidad miogénica. Por ello, los resultados obtenidos parecen sugerir que la melatonina a una concentración 1nM podría mejorar la calidad de los mioblastos senescentes y su capacidad miogénica haciendo innecesario el disparo de los sistemas de reciclaje de proteínas.

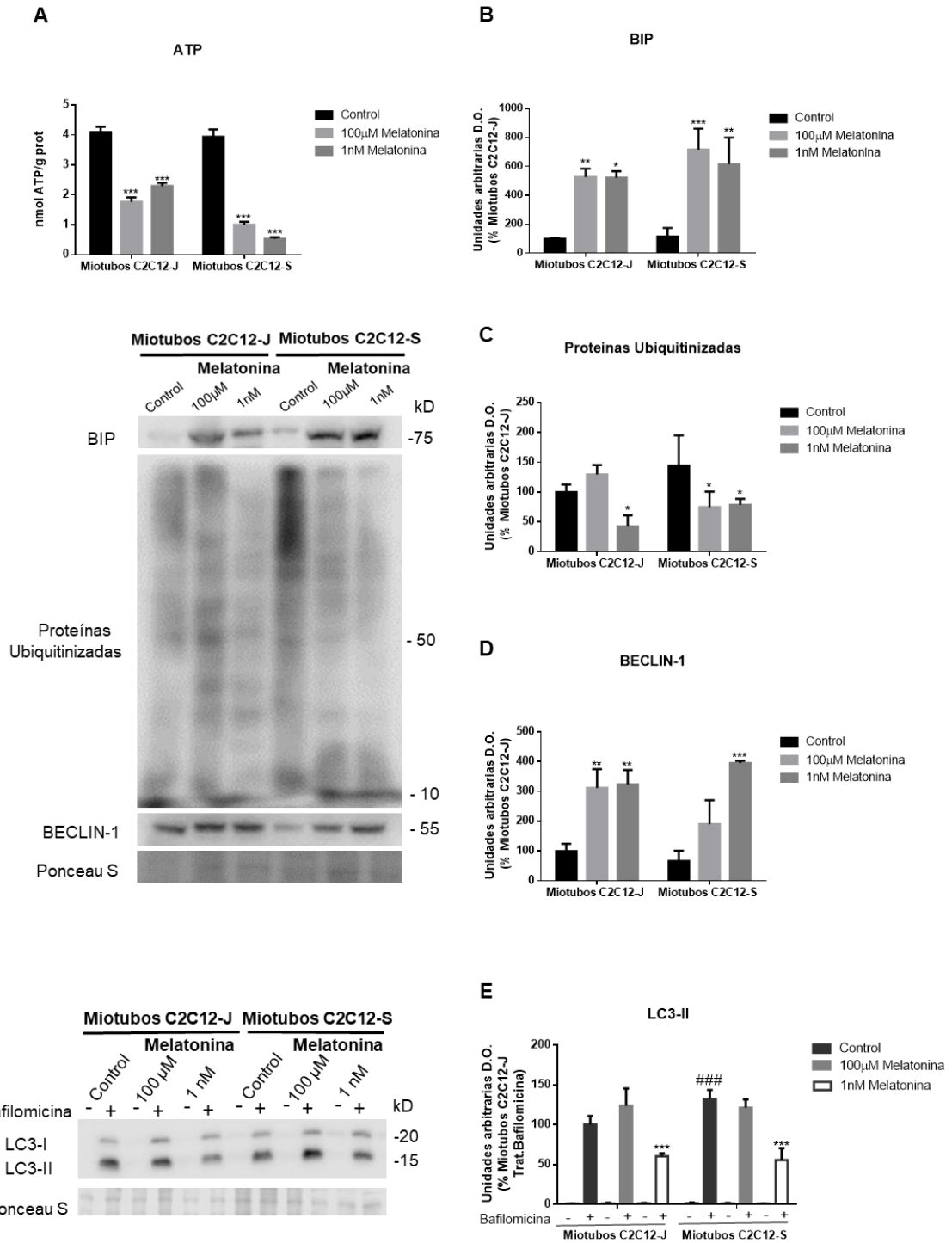


Figura 38. (A) El contenido de ATP se evaluó por bioluminiscencia. El gráfico de barras muestra la cuantificación de los niveles de ATP intracelular (nmol/g de proteína) representados como medias \pm D.E. de tres experimentos independientes. **(B)** Los niveles de expresión proteica de BIP, **(C)** proteínas ubiquitinizadas y **(D)** BECLIN-1 en miotubos C2C12 jóvenes (Miotubos C2C12-J) y miotubos senescentes (Miotubos C2C12-S) tratados con melatonina (100 μ M y 1nM) durante 72 horas y después cultivadas durante 7 días con suero de caballo al 2% para inducir la diferenciación de mioblastos a miotubos se determinaron por western blot. Ponceau S se utilizó como control de carga de gel. Los gráficos de barras muestran las medias de densidad óptica (D.O) \pm D.E. expresadas como porcentaje de la condición experimental miotubos C2C12-J control, de tres inmunotransferencias separadas. Comparaciones estadísticas: * vs. control; # vs. Miotubos C2C12-J no tratado con melatonina. El número de símbolos marca el nivel de significación: * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001. **(D)** Niveles de acumulación del marcador autofagosomal LC3-II en miotubos C2C12-J y miotubos C2C12-S después de bloquear la autofagia de fase tardía con bafilomicina A1 y previamente tratados con melatonina (100 μ M y 1nM)

durante 72 horas y después cultivados durante 7 días con suero de caballo al 2% para inducir la diferenciación de mioblastos a miotubos, Los gráficos de barras muestran las medias de densidad óptica (D.O.) \pm D.E. expresadas como porcentaje respecto al detectado en el grupo experimental de miotubos C2C12-J tratado con bafilomicina y sin tratamiento previo con melatonina, de tres inmunotransferencias separadas. Comparaciones estadísticas: # vs. Miotubos C2C12-J no tratado con melatonina + tratamiento con bafilomicina A1. * vs. control. *** $p < 0,001$; # vs. Miotubos C2C12-J no tratado con melatonina, ### $p < 0,001$

A continuación, para averiguar si efectivamente el pretratamiento con una baja concentración de melatonina mejora la capacidad miogénica de los mioblastos senescentes, se decidió estudiar la capacidad de diferenciación de los mioblastos C2C12 a miotubos mediante el análisis de los principales marcadores de diferenciación: PAX3, PAX7, MYF5, MYOD y MYOG mediante western blot.

Los resultados obtenidos mostraron que las células C2C12-J diferenciadas en presencia de ambas concentraciones de melatonina, además de exhibir una menor expresión de PAX3 y PAX7 (Fig.39 A y B), presentaron, respecto a los miotubos C2C12-J control, una menor expresión proteica de los factores de diferenciación miogénica MYF5 y MYOG ($p < 0.001$) (Fig.39 C y E), lo que podría indicar una retención del proceso de diferenciación. Sin embargo, la expresión del marcador de diferenciación temprana MYOD se vio incrementado, especialmente con la concentración de 100 μ M, lo que sugiere la inducción de rutas alternativas independientes de MYF5 para el rescate del programa miogénico (Fig.39D).

En contraste, el pretratamiento de los mioblastos C2C12-S con 1 nM de melatonina previo a la inducción de la diferenciación hacia miotubos consiguió aumentar la expresión de MYF5 ($p < 0,05$) y MYOG (Fig.39 C y E) respecto a los miotubos C2C12-S control, efecto que no fue observado en las células pretratadas con la concentración de melatonina 100 μ M. Estos datos sugieren, en concordancia con los resultados previos, que la concentración de melatonina 1nM mejora la calidad celular favoreciendo la recuperación de la capacidad de diferenciación perdida durante el envejecimiento celular.

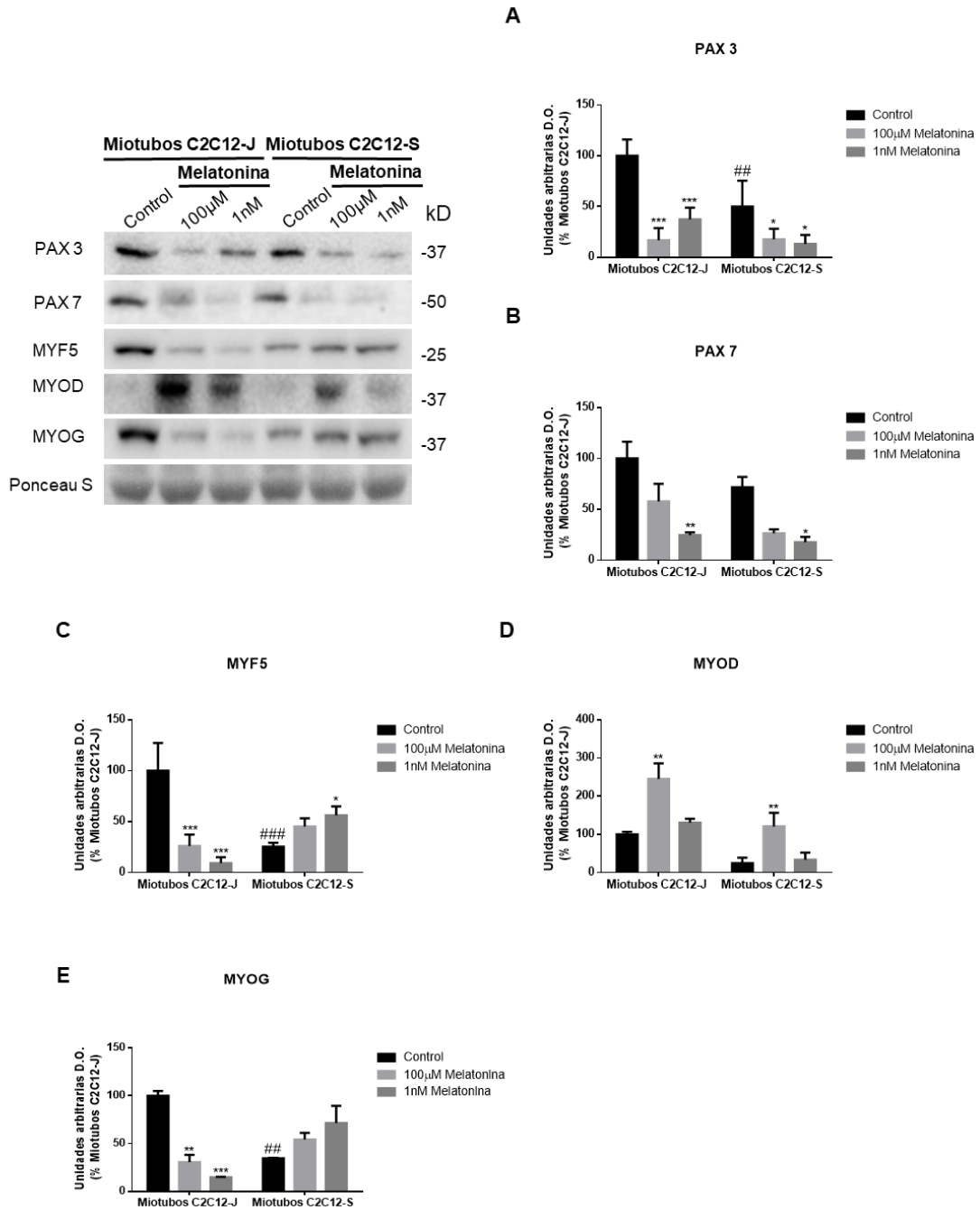


Figura 39. Análisis de los niveles de expresión proteica de los marcadores de diferenciación miogénica **(A)** PAX3, **(B)** PAX7, **(C)** MYF5, **(D)** MYOD y **(E)** MYOG en miotubos C2C12 jóvenes (Miotubos C2C12-J) y senescentes (Miotubos C2C12-S) tratados con melatonina (100 μM y 1 nM) durante 72 horas y después cultivadas durante 7 días con suero de caballo al 2% para inducir la diferenciación de mioblastos a miotubos. Ponceau S se utilizó como control de carga de gel. Los gráficos de barras muestran las medias de densidad óptica (D.O.) ± D.E. expresadas como porcentaje de la condición experimental miotubos C2C12-J control, de tres inmunotransferencias separadas. Comparaciones estadísticas: * vs. control; # vs. Miotubos C2C12-J no tratados con melatonina. El número de símbolos marca el nivel de significación: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

DISCUSIÓN

Actualmente existen muchas investigaciones enfocadas en el descubrimiento e invención de aplicaciones clínicas o industriales de las células madre, como terapias de reemplazo o fabricación de órganos, tejidos o constructos tisulares manipulados por bioingeniería. Muchas de ellas están basadas en la potencialidad que tienen las CME de generar todo tipo de células procedentes de las tres líneas germinales (D. H. Lee & Chung, 2011). Como ejemplos de aplicaciones podemos mencionar la obtención de células funcionales productoras de insulina *in vitro* a partir de CME humanas para el tratamiento de la diabetes tipo I (Jiang et al., 2007) o la (re)generación de fibras musculares para el tratamiento de distrofias musculares o incluso para producir carne mediante cultivo celular (**Skrivergaard, Rasmussen, Therkildsen, & Young, 2021**). Las principales características que aúnan estas investigaciones son la potencialidad y capacidad de diferenciación que definen a una célula madre, pero han sido muy pocos los estudios que han centrado su investigación sobre los mecanismos moleculares y celulares que gobiernan el mantenimiento de la troncalidad de las células madre y su capacidad de diferenciación hacia los diferentes destinos. Este es un hecho importante a tomar en cuenta para incrementar el desarrollo y el impacto de trabajos de investigación que conlleven un avance significativo en el desarrollo de nuevas terapias, estrategias o procesos basados en células madre.

En base a ello, hemos estudiado la relevancia de los mecanismos de control de calidad de proteínas, las vías de señalización relacionadas con la muerte y supervivencia celular, así como la interacción entre los mecanismos de homeostasis de proteínas como la UPR, el sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia con la función mitocondrial para el mantenimiento de las células madre y de su potencial de diferenciación. En esta tesis doctoral hemos utilizado dos tipos de células madre murinas con diferente potencialidad para la generación de distintos linajes celulares: como modelo experimental de células madre pluripotentes hemos utilizado las de células madre embrionarias P19 y como modelo de células madre multipotentes hemos utilizado las células progenitoras miogénicas C2C12.

En estudios anteriores publicados por nuestro grupo de investigación sobre la diferenciación de células madre embrionarias P19 comparamos la fisiología y metabolismo mitocondrial entre las células P19 en su estado indiferenciado y tras un proceso de diferenciación temprana utilizando ácido retinoico y encontramos una

huella metabólica que asociaba la actividad mitocondrial con la diferenciación y troncalidad celular. En comparación con sus equivalentes diferenciados (P19-CD), la pluripotencia de las células madre P19 (P19-CM) se correlacionó con un fuerte perfil glicolítico y una reducida biogénesis y complejidad mitocondrial caracterizada por la presencia de pequeños cuerpos mitocondriales redondeados, perinucleares, con un bajo potencial de membrana mitocondrial e inactivos con un poro de permeabilidad transitoria en una conformación cerrada. Esta quiescencia mitocondrial incrementó la resistencia de estas células frente al dicloroacetato, un inhibidor de la piruvato deshidrogenasa quinasa que obliga a la célula a utilizar la fosforilación oxidativa para producir energía y estimula la apoptosis intrínseca. Cuando se obligó a las células P19-CM a realizar un metabolismo oxidativo para obtener energía mediante su cultivo en un medio sin glucosa, pero con piruvato y glutamina se redujo su perfil glicolítico, se activaron las mitocondrias y, paralelamente a esta reprogramación metabólica, las células perdieron su pluripotencia comprometiendo su potencial de diferenciación y se volvieron sensibles al dicloroacetato (Vega-Naredo et al., 2014). Estos hallazgos resaltaron la importancia del metabolismo energético para la troncalidad, proliferación, diferenciación y resistencia a la muerte de las células madre embrionarias.

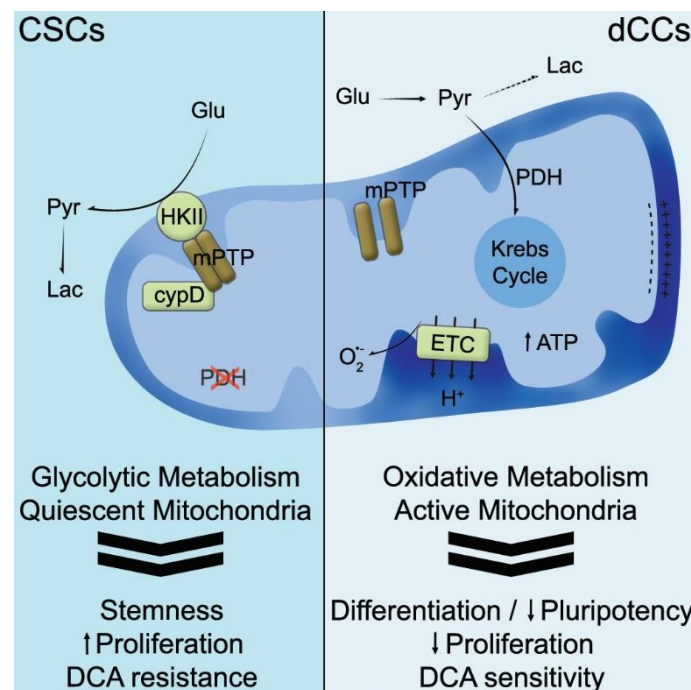


Figura 40. Representación esquemática de los resultados previos obtenidos en las células de carcinoma embrionario 19 que relacionan el metabolismo mitocondrial con la troncalidad y diferenciación celular. CSCs: Carcinoma Stem Cells; cCCs: Differentiated Carcinoma Cells; HKII: Hexoquinasa II; mPTP: mitocondrial permeability transition pore; cypD: ciclophilin D; PDH: piruvate deshydrogenase; ETC: Electron Transport Chain. (Vega-Naredo et al., 2014)

Una compleja red de vías entrecruza la homeostasis energética, redox y de proteínas con las vías de muerte celular y son esenciales para una correcta función y viabilidad celular. Por ello, en esta tesis doctoral continuamos este estudio, evaluando el papel del sistema redox, de las vías de señalización de muerte celular y de la homeostasis proteínica durante la diferenciación de las células madre P19.

En primer lugar, nuestros resultados mostraron una mayor protección antioxidante en las P19-CM en comparación con sus homólogos diferenciados (P19-CD) y, consecuentemente, la promoción de un entorno prooxidante durante su diferenciación. Estudios anteriores han señalado la importancia del sistema redox para la diferenciación de las P19-CM. De hecho, cuando las células P19 se diferencian en presencia del antioxidante N-acetilcisteína se observan alteraciones en los marcadores de diferenciación de forma que esta se retiene en una etapa trofoectodérmica (Vega-Naredo et al., 2014). Además, también se ha observado que la activación de un entorno prooxidante mediante un aumento en la producción de ROS estimula la diferenciación de células madre (Cao et al., 2016). No obstante, el estado de las vías de señalización redox NRF2 y SHC1-1/p66SHC resaltan el delicado equilibrio de las células madre para equilibrar la resistencia y la sensibilidad a la muerte celular. A pesar de la gran cantidad de investigaciones que confirman las funciones pro-apoptóticas de SHC1-1/p66SHC algunos estudios atribuyen un papel de esta vía en la promoción de la supervivencia de células madre bajo hipoxia y en el mantenimiento de la autorenovación (Sansone et al., 2007). De forma que, se ha sugerido que SHC1-1 podría actuar como un arma de doble filo en la regulación de la muerte celular, en función de las condiciones microambientales, el estado redox y el contexto metabólico (Galimov, 2010), desempeñando un papel fundamental en la coordinación de la autofagia de supervivencia, la autofagia muerte y la apoptosis, dependiendo del estado bioenergético. De hecho, se detectaron niveles aberrantes de P53 y SHC1-1 en células madre cancerosas y en sus contrapartes más diferenciadas que facilitan la adquisición de fenotipos de resistencia (Pani & Galeotti, 2011), (Veeramani, Yuan, Lin, & Lin, 2008), un mecanismo que probablemente también opera en un subconjunto de células pluripotentes.

A menudo las células madre suelen presentar alteraciones relevantes en la maquinaria apoptótica que podrían tener un papel en la producción de señales mitogénicas (Ryoo & Bergmann, 2012) y en el inicio del proceso regenerativo endógeno de un tejido dañado (Jorge Bartolucci). En este contexto, la acumulación, en las P19-CM, de P53, proteína supresora de tumores, clave para inducir la apoptosis y para el control del ciclo celular como respuesta ante un daño en el ADN,

fue también observada en otros tipos de CME, encontrándose en un estado inactivo y ubicado en el citoplasma (Qin et al., 2007) (Solozobova, Rolletschek, & Blattner, 2009) y constituyendo una fuerza impulsora para su diferenciación al suprimir, cuando se transloca al núcleo y a través de sus actividades transcripcionales, la expresión de NANOG y OCT4 (Loh et al., 2006) (Lin et al., 2005). Nuestros resultados sugieren que la diferenciación de P19-CM activa P53, haciendo que las células diferenciadas sean competentes para desencadenar respuestas eficientes mediadas por P53, como la activación de enzimas de reparación del ADN, la detención del ciclo celular o la activación de la apoptosis. Además, la mayor expresión de CASP3 observada en las P19-CM, sin estar asociada a la escisión de sus sustratos habituales, apoya la hipótesis sobre el papel alternativo de P53 en las células madre. De hecho, también se ha descrito que la CASP3 participa en el desarrollo embrionario y en los procesos de regeneración de tejidos al estimular la proliferación de células madre y progenitoras (Dick et al., 2015) (Fujita et al., 2008). Así, se ha descrito que las caspasas desempeñan funciones críticas durante la inducción de iPSC a partir de fibroblastos humanos (Li et al., 2010), y que su inhibición disminuye la capacidad de las células P19 para diferenciarse en cardiomiocitos (Abdul-Ghani et al., 2011). También se ha descrito que las células P19 experimentan apoptosis durante la diferenciación neuronal inducida por el ácido retinoico (Miho et al., 1999) y que la inhibición de las caspasas reduce su habilidad para diferenciar en cardiomiocitos (Abdul-Ghani et al., 2011). Todos estos resultados sugieren que los principales componentes de la vía apoptótica, como las caspasas y P53, presentan funciones independientes de la apoptosis en las células madre, probablemente desempeñando un papel en el mantenimiento de un fenotipo embrionario o primitivo, regulando la diferenciación de las células madre y aumentando el umbral apoptótico, lo que confiere una resistencia particular frente a los inductores clásicos de apoptosis.

La activación de las calpaínas (enzima responsable de la proteólisis neutra calcio-dependiente) en las P19-CD apunta a una sobrecarga de Ca^{2+} intracelular y a la participación en esta sobrecarga tanto del RE como de las mitocondrias. El RE tiene la capacidad de adaptarse a ciclos periódicos asociados con demandas metabólicas de duración limitada, como la falta de nutrientes, hipoxia o cambios en el estado de glicosilación (Fu, Watkins, & Hotamisligil, 2012). Se ha propuesto la participación del estrés del RE en la diferenciación de las CME a través de los sistemas disparados por la UPR (Y. Yang, Cheung, Tu, Miu, & Chan, 2016). Por ello, nuestros resultados que muestran la activación de las vías ATF6 y EIF2 α de la UPR durante la diferenciación de las P19-CM, sugieren el desencadenamiento de respuestas al

estrés del RE asociadas con la síntesis global de proteínas y la mejora de su plegamiento, que probablemente estén relacionadas con la remodelación metabólica, descrita previamente por nuestro grupo de investigación (Vega-Naredo et al., 2014), hacia un metabolismo más oxidativo. De hecho, se ha observado que EIF2 α promueve la supervivencia celular en respuesta al estrés oxidativo ya que al disminuir la carga de proteínas en el RE evita la formación ilegítima de enlaces disulfuro, produciendo así una cantidad suficiente de equivalentes reductores. Por lo tanto, la atenuación de la síntesis de proteínas mediada por EIF2 α probablemente previene la proliferación excesiva de las P19-CD, el agotamiento de ATP, la estimulación de la fosforilación oxidativa mitocondrial y la producción de ROS (Rajesh et al., 2015). La síntesis de proteínas y la producción de ROS son procesos estrechamente interdependientes en células estresadas, de forma que, si la restauración de la síntesis de proteínas ocurre antes de la recuperación de la capacidad de plegamiento de proteínas del RE, el aumento de la producción de ROS producido por el mal plegamiento de proteínas utiliza el ATF4 para orquestar el programa apoptótico (Han et al., 2013).

Como acabamos de mencionar, cuando el estrés del RE se prolonga y el RE no puede recuperar su función, la apoptosis generalmente se activa al inducir la transcripción de CHOP para eliminar las células dañadas. Aunque la transcripción de CHOP es inducida por los tres sensores de la UPR, la vía EIF2 α /ATF4, que se activó en las P19-CD, juega un papel dominante. A pesar de esto, las P19-CD presentaron niveles más bajos de CHOP que las células indiferenciadas. En muchos tipos celulares CHOP no es una proteína pro-muerte, sino que forma parte de un paso obligado de la vía EIF2 α que enmarca el enigma de esta vía favorable a la supervivencia pero que mata a las células (Southwood et al., 2016). En consecuencia, el nivel más alto de CHOP en las P19-CM probablemente constituye una respuesta adaptativa para mantener la integridad clonal mediante la eliminación de células madre individuales que han sufrido eventos fuertemente estresantes evitando así la propagación de células madre dañadas (Ogata et al., 2006). Además, también se ha descrito que las células deficientes en EIF2 α y ATF6, como las P19-CM, activan una autofagia de supervivencia para contrarrestar el estrés del RE (Ogata et al., 2006). Esta particular adaptación de la UPR probablemente contribuya a seleccionar y mantener el nicho de células madre con las propiedades y calidad requeridas. Por lo tanto, la mayor expresión de IRE1 y CHOP observada en las P19-CM indica una alteración en la función del RE en las células madre y probablemente tiene significados adicionales, como la regulación positiva de la autofagia (B'Chir et al., 2014). Además, como IRE1

desempeña una función en la señalización durante el desarrollo embrionario (Iwawaki, Akai, Yamanaka, & Kohno, 2009), podría desempeñar un papel en la quiescencia metabólica y mantenimiento de las células madre (Chaube, 2015). Por otro lado, su agotamiento en las P19-CD probablemente contribuya a la protección de esas células contra la muerte celular inducida por el estrés del RE. En general, esto indica que el estrés del RE acompaña a la diferenciación de las células madre y que la activación de las vías ATF6 y EIF2 α de la UPR probablemente facilita la adaptación al estrés inducido por la acumulación de proteínas desplegadas/mal plegadas destinadas a la degradación por el proteasoma o la autofagia mediada por chaperonas.

La catepsina D es un mediador de la activación de caspasas (Johansson, Steen, Ollinger, & Roberg, 2003) y el ratio entre las actividades catepsina B: catepsina D se usa a menudo como indicador de viabilidad lisosomal. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la diferenciación de las células P19 está acompañada de una expansión controlada del compartimento lisosomal, lo que puede facilitar el aumento de la actividad de ambas catepsinas observado por nosotros sin desencadenar procesos de muerte celular lisosomal. Esta mayor actividad lisosomal observada en las P19-CD, junto con la regulación positiva del sistema ubiquitina-proteasoma y de la autofagia mediada por chaperonas, sugerirían la activación de sistemas de control de calidad de proteínas adicionales, como la macroautofagia, para adaptar/remodelar a las células madre durante su diferenciación y contrarrestar a su vez el estrés del RE asociado. La macroautofagia es un proceso catabólico que desempeña un papel en el mantenimiento del fenotipo indiferenciado de las células madre al controlar el recambio de proteínas a través de MTOR (Phadwal, Watson, & Simon, 2013). La activación de la vía PI3K/AKT1/MTOR/P70S6 durante la diferenciación de las células madre probablemente suprime la apoptosis, promueve el crecimiento celular e impulsa la proliferación celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, factores de crecimiento y energía celular, a través de la modulación de la traducción, transcripción, biogénesis ribosomal, transporte de nutrientes y, como se mencionó más arriba, de la autofagia. Por lo tanto, esta vía de señalización celular puede ser importante en la regulación de la quiescencia, la proliferación, el potencial de diferenciación y la longevidad de las células madre y, probablemente, su activación durante la diferenciación se asocie con la reprogramación metabólica hacia un metabolismo mitocondrial que produce mayores cantidades de ATP para satisfacer los requisitos energéticos de las progenies diferenciadas.

La relación entre el estrés oxidativo, la función mitocondrial, el estrés del RE y los mecanismos de control de la calidad de proteínas depende del tipo de célula (J. Lee, Giordano, & Zhang, 2012) y aún permanece sin esclarecer por completo en el caso de las células madre. Nuestros datos sugieren que las células indiferenciadas y las diferenciadas presentan mecanismos diferentes para mantener la homeostasis de proteínas: mientras que el control de calidad de las proteínas se realiza principalmente mediante macroautofagia en las P19-CM, la respuesta a proteínas mal plegadas, el sistema ubiquitina-proteasoma, las chaperonas y las proteasas ejercen un papel destacado en sus contrapartes diferenciadas. La activación de macroautofagia en las P19-CM probablemente inhibe el estrés del RE, mantiene la viabilidad de las mitocondrias quiescentes, inhibe la apoptosis y retiene a las células en un estado indiferenciado.

Aunque la complejidad inherente del eje PI3K/AKT/MTOR, sus múltiples ramas y efectos posteriores constituyen un obstáculo para dilucidar los detalles moleculares concretos involucrados durante el desarrollo embrionario temprano, nuestros resultados contribuyen a mejorar nuestra comprensión sobre el papel de PI3K, MTOR y la autofagia en las células madre embrionarias y durante su diferenciación temprana. La PI3K ha sido ampliamente estudiada en el contexto del cáncer y de la autofagia. Sin embargo, se subestima su importancia en el desarrollo a pesar de que cualquier pérdida de alguno de los componentes centrales de PI3K a menudo resulta en letalidad embrionaria (Bi, Okabe, Bernard, & Nussbaum, 2002) (Bi, Okabe, Bernard, Wynshaw-Boris, & Nussbaum, 1999). Estudios recientes han comenzado a explorar la contribución de la PI3K en el mantenimiento de las células madre embrionarias (Yu & Cui, 2016), haciendo evidentes las funciones críticas que esta vía de señalización tiene para la autorenovación de las células madre, tal como confirmamos en esta tesis al tratar las P19-CM con 3-MA, que perdieron su elevada tasa de proliferación que es esencial para la autorenovación. Además, se ha descrito que la activación de la PI3K en las células madre embrionarias a menudo puede ocurrir a través de medios no canónicos (Yu & Cui, 2016) y que su eliminación o inhibición compromete la pluripotencialidad y el potencial de diferenciación de células madre embrionarias humanas y murinas (Kingham & Welham, 2009) (Paling, Wheadon, Bone, & Welham, 2004), como también observamos nosotros en las P19-CM tratadas con wortmanina. Toda esta información sugiere que la PI3K favorece la retención de las propiedades de las células madre embrionarias. Por otro lado, la diferenciación de P19-CM activó AKT y MTOR acoplado el crecimiento y la proliferación celular con los cambios inducidos en el metabolismo energético tras la

diferenciación. Nuestro grupo ha demostrado previamente que el metabolismo energético juega un papel esencial en la regulación de la pluripotencia en las P19-CM que presentan una preferencia por un metabolismo glucolítico en comparación con sus contrapartes diferenciadas, que tienen altas tasas glucolíticas pero también utilizan la fosforilación oxidativa (Vega-Naredo et al., 2014). De hecho, y de acuerdo con los resultados mostrados en esta tesis doctoral, se describió que la PI3K desempeña un papel importante en la regulación de la captación de glucosa y en la estimulación de varios enzimas glucolíticos, como la hexoquinasa (Ward & Thompson, 2012), mientras que MTOR regula tanto la glucólisis como la fosforilación oxidativa y regula negativamente la autofagia (Morita et al., 2013). Además, también se ha demostrado que se requiere MTOR para la maduración y diferenciación de múltiples linajes (Xiang, Zhao, Xu, Li, & Zhang, 2011) (S. Zhang et al., 2011). En consecuencia, el tratamiento con el inhibidor de MTOR rapamicina disminuyó la tasa de proliferación de las células P19 diferenciadas. De hecho, aunque no existen anomalías graves del desarrollo asociadas con la deficiencia de proteínas señalizadoras que se encuentran por debajo de MTOR en esta cascada de señalización, la eliminación de componentes clave de MTOR conduce a fenotipos letales, lo que destaca su importancia para la diferenciación celular (Yu & Cui, 2016). Aunque las P19-CM presentan una menor activación de MTOR y un mayor flujo autofágico que las P19-CD, la inhibición de la maquinaria autofágica mediante el uso de siARN contra *Atg7* no tuvo efectos perjudiciales sobre la proliferación celular, como también observaron otros autores en CME humanas y murinas en condiciones de cultivo con abundancia de nutrientes (Cho et al., 2014) (Mizushima et al., 2001). Por el contrario, las células P19 diferenciadas requieren una maquinaria de autofagia intacta para mantener su proliferación. A pesar de esto, el siARN *Atg7* comprometió el estado pluripotente de las P19-CM de manera similar a como actuó la wortmanina, lo que confirma que las deficiencias en la maquinaria de la autofagia en las células madre embrionarias conducen a una acumulación perjudicial de proteínas que impide el mantenimiento de la pluripotencia (Mizushima et al., 2001). En consecuencia, la reducción de la señalización de MTOR y el aumento de la autofagia parecen ser necesarios para mantener la homeostasis de las CME a través de la expresión de genes de pluripotencia (Cho et al., 2014) (Mizushima et al., 2001). En conjunto, los resultados mostrados en este trabajo revelan las nuevas funciones de la vía PI3K/AKT1/MTOR y de la autofagia en el control de la pluripotencia, la autorrenovación, la diferenciación y la determinación del destino celular de las células de carcinoma embrionario P19. Las funciones de la cascada de señalización PI3K/AKT/MTOR en la regulación de la proliferación, supervivencia y metabolismo

celular en el contexto de la tumorigenesis están bien definidas y solo recientemente es que nuevos estudios, en particular aquellos que utilizan células madre pluripotentes como este, apuntan a la importancia de esta ruta para el desarrollo y la diferenciación celular (Yu & Cui, 2016), además de para el mantenimiento de las células madre cancerígenas (Yoon et al., 2021).

Las células P19 en su estado indiferenciado presentan cuerpos mitocondriales pequeños, redondos y poco polarizados que se vuelven filamentosos y completamente polarizados después de la diferenciación. Además, detectamos en las P19-CD una regulación positiva de la biogénesis mitocondrial, la función y la producción de ROS (Vega-Naredo et al., 2014), junto con una promoción de la fusión mitocondrial. La degradación autofágica de las mitocondrias disfuncionales se considera un componente de los mecanismos de control de calidad celular y los modelos actuales proponen que las mitocondrias incompetentes bioenergéticamente también se hacen incompetentes para la fusión y son objeto de mitofagia debido al aumento de la producción de radicales libres (Narendra & Youle, 2011). Analizamos el reclutamiento de SQSTM1/p62 a las mitocondrias en ambos tipos de células p19 y detectamos un mayor flujo mitofágico en las P19-CM, lo que sugiere una mayor calidad/aclaramiento mitocondrial en las células indiferenciadas y la acumulación de mitocondrias fusionadas y estresadas en las diferenciadas. Por lo tanto, el recambio mitocondrial dependiente de la autofagia es una característica que diferencia a las células madre de sus homólogos más diferenciados, probablemente contribuye a mantener un fenotipo mitocondrial que impulsa la troncalidad (Vega-Naredo et al., 2014) y constituye, además, un elemento clave para establecer las diferentes susceptibilidades a la muerte celular.

En resumen, mediante el importante papel que juegan la autofagia y la apoptosis en el nicho de las células madre eliminando macromoléculas y células dañadas y preservando la homeostasis celular y tisular, la autofagia y la apoptosis se coordinan de una manera que evita la pérdida de quiescencia, aumenta la resistencia al estrés y al daño y minimiza la transmisión de estructuras dañadas a células de la progenie. Por lo tanto, la inhibición de PI3K y de las caspasas afecta el destino de las P19-CD al perder estas su pluripotencia, empujándolas a diferenciarse lejos de un destino endodérmico y hacia un destino neuronal, y perjudicando así su capacidad para diferenciarse adecuadamente cuando son tratadas con AR. Por otro lado, la inhibición de la autofagia mediante el silenciamiento de *Atg7* también induce una pérdida de pluripotencia en las P19-CM alterando su capacidad de diferenciación, pero sin forzar una diferenciación neuronal espontánea. Así, nuestros resultados demuestran un

papel clave para la vía PI3K/AKT/MTOR en la determinación de la pluripotencia y el destino celular y que la pluripotencia de las P19-CM está asociada con una alta protección antioxidante, una desregulación en la maquinaria apoptótica y una activación de los sistemas proteolíticos que probablemente contribuyan a preservar la calidad celular, aumentando el umbral para la activación de la muerte celular.

En otros tipos de células madre, con diferente potencialidad o procedentes de orígenes que no sean embrionarios, el papel de los sistemas redox y del control de calidad celular no tiene por qué ser equivalente al demostrado en las CME. Es importante distinguir entre los distintos tipos de células madre, no solo respecto al órgano o tejido en el que están alojadas, sino respecto a su pluripotencia. En un extremo están las células en estadios embrionarios tempranos, cuya diferenciación depende de programas de desarrollo basados en expresiones secuenciales de genes cuya alteración podría cambiar el curso del desarrollo, y en el otro extremo estarían las células madre unipotentes que están comprometidas en un linaje celular concreto y no estarían sujetas a programas de diferenciación alternativos, pero en las que los procesos de autorrenovación, activación y diferenciación cobran especial interés. Por ejemplo, las células satélite del músculo esquelético se diferencian, después de su activación, únicamente a mioblastos y luego a miocitos, los cuales se fusionan para formar miotubos, los precursores de las miofibras. La única alternativa a este programa celular es la división asimétrica para la autorrenovación de la subpoblación de células satélite. La falta de pluripotencia de las células satélite podría ser entonces considerada como una ventaja para la regeneración muscular ya que la decisión para este linaje ya tuvo lugar en un paso anterior, cuando se forman las células satélite a partir de sus células precursoras pluripotentes (Chal et al., 2016; Schmidt, Schuler, Huttner, von Eyss, & von Maltzahn, 2019).

Nuestro grupo de investigación ha estudiado la relevancia de la vía de señalización sensible a redox p66Shc y de los sistemas de control de calidad celular durante la diferenciación de mioblastos de ratón C2C12, observando tanto semejanzas como diferencias en diversas respuestas celulares respecto a las descritas previamente en las CME. Concretamente, los resultados obtenidos en este estudio demostraron que las células madre adultas C2C12 activan la vía de señalización prooxidante p66Shc, al mismo tiempo que exhiben una fuerte protección antioxidante y presentan un perfil bioenergético basado predominantemente en la fosforilación oxidativa y que, durante su diferenciación a miotubos, todas estas características celulares se ven disminuidas. Asimismo, nuestros estudios han respaldado que la autofagia constituye un mecanismo esencial del proceso de diferenciación de los mioblastos C2C12 a

miotubos.(Ochoa, 2019). Sin embargo, el rol que desempeña la autofagia en este caso es inverso al observado en las células embrionarias P19. Los mioblastos C2C12 presentan un flujo autofágico bajo que aumenta tras la diferenciación a miotubos. Además, la inhibición de la autofagia mediada por el silenciamiento de Atg7 promueve la proliferación de los mioblastos mientras que reduce la viabilidad de los miotubos, confirmando así que su regulación genera un cambio metabólico que determina el destino celular. La relevancia funcional de la autofagia en el metabolismo energético durante la diferenciación celular ha sido previamente estudiada por otros autores en otro tipo de células madre adultas, concretamente en las células madre hematopoyéticas, donde se encontró que la autofagia es esencial para la eliminación selectiva de mitocondrias durante la diferenciación (Mortensen et al., 2010); (Chang, 2020). Por tanto, en conjunto estos estudios evidencian que la regulación de la autofagia parece tener un papel crucial durante la diferenciación de diversos tipos de células madre adultas y, en el caso de las células madre adultas C2C12, el mantenimiento de unos niveles bajos de autofagia favorece el mantenimiento y autorrenovación de los mioblastos, y su activación se hace imprescindible para la correcta formación de los miotubos. Uno de los principales problemas de las células precursoras musculares relacionado con el envejecimiento es su entrada en senescencia de forma prematura lo que impide que se dividan para generar nuevas células madre y regenerar el músculo dañado (Sousa-Victor, Garcia-Prat, Serrano, Perdiguero, & Munoz-Canoves, 2015). La senescencia celular es el proceso fisiológico que abarca el envejecimiento de las células hasta que dejan de dividirse. Durante este proceso se producen una serie de cambios en las células con el fin de frenar su proliferación y/o eliminarlas, si es posible, cuando ya no son necesarias. Sin embargo, con el tiempo grandes cantidades de células envejecidas o senescentes se acumulan en los tejidos del cuerpo, permaneciendo activas y liberando sustancias dañinas (y señalizadoras) que producen inflamación y lesiones en las células vecinas. Estudios pioneros han centrado sus estrategias en desarrollar terapias de rejuvenecimiento con células madre basadas en inducir la activación y diferenciación de mioblastos senescentes (Neves, Sousa-Victor, & Jasper, 2017). En este contexto, se hace especialmente relevante conocer los mecanismos celulares que regulan la miogénesis, así como los mecanismos primarios que subyacen a la diferenciación alterada que ocurre en los mioblastos senescentes.

Nuestro grupo de investigación previamente a esta tesis doctoral comenzó a utilizar el modelo de duplicación de población múltiple en células C2C12, el cual nos ofreció la oportunidad de tener un modelo *in vitro* para investigar la diferenciación miogénica,

el metabolismo energético, la señalización redox y el control de calidad celular mediante autofagia durante las múltiples divisiones de las células madre musculares, imitando lo que ocurre *in vivo* con el envejecimiento. Los primeros datos de esos estudios indicaron que la presencia de senescencia replicativa en las células C2C12 aparece pasados los 65 ciclos de duplicación asociada a una disminución del potencial proliferativo probablemente debido a la detención o desregulación del ciclo celular (Ochoa, 2019). En este contexto, en comparación con los mioblastos C2C12 jóvenes, los mioblastos senescentes presentaron un mayor estrés oxidativo pero una desactivación de la vía prooxidante p66Shc, un mayor metabolismo energético caracterizado con una mayor dependencia de la glucolisis y un menor flujo autofágico. Todo ello impacta en la capacidad de diferenciación de los mioblastos senescentes que se ve notablemente reducida probablemente debido a la incapacidad de completar el programa de remodelación metabólica (Figura 41).

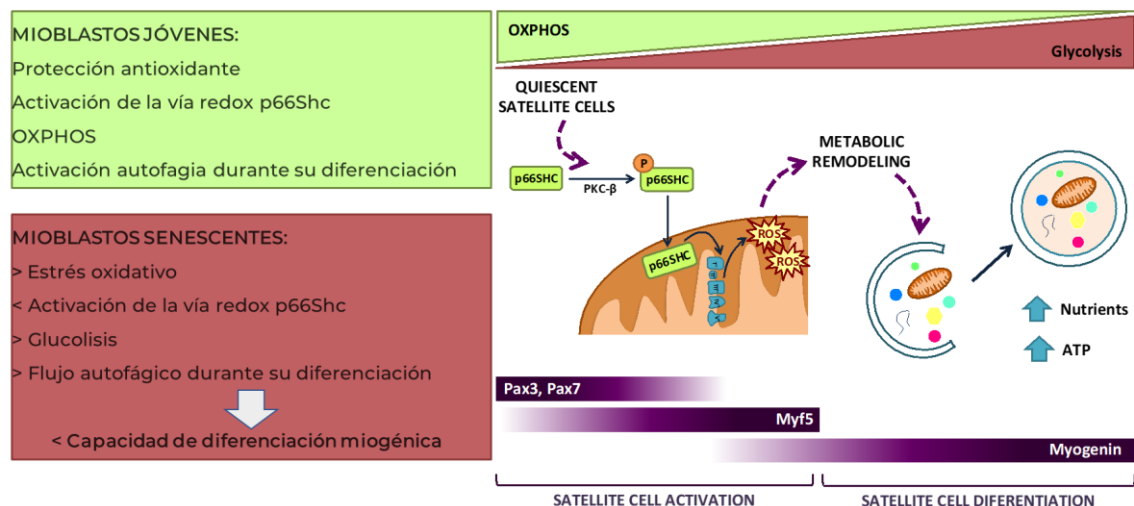


Figura 41. Representación esquemática de los resultados previos obtenidos en mioblastos C12C12 jóvenes (con menos de 65 ciclos de duplicación) y senescentes (con más de 65 ciclos de duplicación) que relacionan el sistema redox, el metabolismo energético y la autofagia con la capacidad de diferenciación miogénica. Adaptado de (Ochoa, 2019).

En la presente tesis doctoral, para caracterizar aún más la condición de senescencia de los mioblastos C2C12, estudiamos la expresión de la proteína SA-β-Gal β-galactosidasa, un marcador ampliamente utilizado para identificar la senescencia *in vitro* e *in vivo*, que está relacionado con el aumento del contenido de lisosomas (B. Y. Lee et al., 2006). Nuestros resultados mostraron un aumento de la expresión de este biomarcador de senescencia en las células C2C12-S, es decir, en aquellas células C2C12 que presentaban DP>65, confirmando con ello su entrada en un estado de senescencia replicativa. Se ha demostrado en ratones que las células madre

musculares geriátricas expresan elevados niveles de SA- β -Gal, no son capaces regenerar el músculo tras un daño y si se trasplantan incluso en un ratón joven también se ve reducida su capacidad regenerativa (Saito & Chikenji, 2021), sugiriendo así su contribución a la pérdida de masa muscular asociada a la edad. Aunque los mecanismos que inducen la senescencia de estas células son desconocidos, se ha postulado, como hemos mencionado en el apartado anterior, que esta entrada en senescencia puede resultar de una reducida capacidad del sistema autofágico de control de calidad de las estructuras celulares.

A partir de este punto, donde nos encontramos con una disminución del potencial proliferativo y un aumento de la expresión del biomarcador de senescencia β -galactosidasa decidimos estudiar e identificar el posible papel de un tratamiento con melatonina en células C2C12-S con el fin de inducir su activación/diferenciación. La melatonina interacciona con varios tipos de células madre de múltiples formas, estimulando su proliferación, manteniendo la troncalidad y la autorrenovación, protegiendo la supervivencia celular, programando y determinando la diferenciación hacia diferentes linajes y, en células comprometidas con un único linaje de desarrollo, promoviendo el último paso de la diferenciación (Hardeland, 2022). Así, diversos estudios han observado el potencial uso que tiene la melatonina como coadyuvante sobre diferentes tipos celulares como los cardiomiocitos y las células madre mesenquimales, mostrando beneficios a nivel proliferativo, de conservación y regenerador (Ma et al., 2021); (F. Yang et al., 2017); (Hardeland, 2022), pero han sido muy pocos los estudios enfocados en la evaluación del papel de la melatonina sobre las células madre musculares y su envejecimiento. Basándonos en estos estudios previos y recopilando aquellas concentraciones de melatonina que fueron relativamente positivas para la proliferación y diferenciación de los tipos celulares ya mencionados, seleccionamos las diferentes concentraciones de melatonina a estudiar: 100 μ M, 50 μ M, 1 μ M, 100 nM y 1 nM. Nuestros resultados mostraron resultados dispares en ambos tipos de mioblastos, jóvenes y senescentes. Por una parte, concentraciones altas de melatonina, como 100 μ M y 50 μ M, disminuían la tasa de proliferación de los mioblastos C2C12-S a las 72 horas de exposición. Sin embargo, observamos que, curiosamente, el tratamiento de las células senescentes con concentraciones más bajas de melatonina, como 100 nM y 1nM, aumentaba la tasa de proliferación. Por otra parte, cuando se aplicaba el tratamiento de melatonina con cualquiera de las dosis estudiadas (100 μ M, 50 μ M, 1 μ M, 100 nM y 1 nM) en mioblastos C2C12-J, ésta indolamina ejercía un efecto antiproliferativo. Estos

resultados se contraponen a los observados por Chen *et al.* (PMID: 31682812) que observaron un aumento de la proliferación de las células C2C12 y la inhibición de su diferenciación. Sin embargo, es necesario destacar que Chen *et al.* utilizaron concentraciones más elevadas de melatonina (desde 0,01 a 2 mM) y el efecto proliferativo solo fue observado utilizando 1 mM de melatonina y con 2 mM observaron un incremento de la muerte celular.

A la vista del importante efecto antiproliferativo que producen las concentraciones de melatonina testadas por nosotros sobre los mioblastos jóvenes, decidimos analizar su significado para la viabilidad de estas células. Primero estudiamos los efectos sobre el ciclo celular y observamos que las concentraciones más elevadas como 100 μ M y 1 μ M produjeron una parada en G₀/G₁. Una situación similar se produjo con la concentración más baja de melatonina 1 nM. Sin embargo, en este caso la parada se registró en G₂/M. Estos datos sugieren la posibilidad de que concentraciones altas de melatonina, como las aquí mostradas, favorezcan un estado más temprano o inactivo de los mioblastos C2C12, es decir, se retornen quiescentes. En consonancia con lo descrito hasta el momento, observamos que las concentraciones altas de melatonina analizadas por nosotros no aumentaron la muerte celular ni la autofagia. Además, observamos que cualquiera de los tres tratamientos con melatonina administrados en los mioblastos C2C12-J aumentaron la concentración de Ca²⁺ mitocondrial sin modificar el potencial de membrana mitocondrial. Estos datos convergen con estudios previos de nuestro grupo de investigación donde demostramos que el flujo autofágico se encuentra reducido en los mioblastos C2C12 y que su aumento ocurre con la diferenciación (Ochoa, 2019) situación que también ha sido descrita en otros tipos de células madre (Esteban-Martinez *et al.*, 2017). Además, estudios recientes han indicado que la captación de Ca²⁺ mitocondrial mantiene las mitocondrias activas y puede controlar el destino de células madre. De hecho, se ha identificado que niveles altos de Ca²⁺ favorecen el mantenimiento del nicho de células madre hematopoyéticas (Bonora, Kahsay, & Pinton, 2021). Con estos datos sobre la mesa estudiamos los factores reguladores miogénicos para corroborar la premisa de que el tratamiento con concentraciones altas de melatonina en mioblastos C2C12-J tornaba a los mioblastos a un estado quiescente sugiriendo la posibilidad de aumentar su nicho.

En condiciones fisiológicas, las células madre musculares se encuentran en un estado de reposo y expresan los factores de transcripción de la familia caja emparejada PAX3 y PAX7, los cuales son determinantes para mantener el estado quiescente e influenciar el destino celular. De hecho, se ha demostrado que la ausencia de ambos factores provoca la muerte celular o lleva a asumir un destino no

miogénico (Relaix et al., 2006). Por otra parte, bajo factores estresantes o lesiones, las células madre musculares se activan, vuelven a entrar en el ciclo celular y estimulan la expresión de factores reguladores miogénicos con el fin de favorecer la regeneración y la reparación muscular. Por ello, el correcto funcionamiento de estas respuestas desempeña un papel importante en la diferenciación miogénica como fuente renovable de células musculares, especialmente a lo largo de la vida adulta. Al comienzo de esta etapa, las células madre musculares expresan PAX7. Aquellas células activadas que proliferan y comienzan el proceso de diferenciación reducen la expresión de PAX7 y comienzan a expresar los marcadores de diferenciación temprana MYOD y MYF5, y el marcador de diferenciación tardía MYOG (Relaix et al., 2006). Tanto MYOD como MYF5 son considerados como marcadores tempranos de diferenciación que no suelen expresarse simultáneamente, si no que su expresión dependerá del tipo de músculo. Esto se debe probablemente a la redundancia funcional de MYF5. De hecho, en ausencia de MYF5, MYOD puede rescatar el programa de diferenciación miogénica. (Relaix et al., 2006). Por otra parte, no todas aquellas células precursoras musculares que proliferan continúan con el proceso de diferenciación. Algunas de ellas se retiran del ciclo celular, regresan al estado de reposo y restauran el nicho inicial de células madre musculares. De hecho, estudios recientes han demostrado que las células madre musculares pasan de la inactividad a la senescencia experimentando una disminución de PAX7 y de los factores de regulación miogénica durante el envejecimiento, lo que dificulta el mantenimiento y la diferenciación de las células madre musculares (Gastesi, 2018).

Los datos que hemos obtenido en nuestro estudio evidencian una clara acción moduladora de la melatonina a este nivel. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con una concentración de melatonina 100 μ M aumenta la expresión de PAX7 en células madre adultas C2C12 jóvenes. Dado que ha sido previamente demostrado que la inducción de la expresión de PAX7 en células C2C12 PAX7- (negativas) está involucrada en el mantenimiento de la proliferación y la prevención de diferenciación precoz (Zammit et al., 2006), nuestros resultados parecen indicar que el incremento de los niveles de PAX7 mediado por el tratamiento con melatonina parece favorecer el mantenimiento del nicho celular. De hecho, se ha descrito incluso que concentraciones más elevadas que las utilizadas en este trabajo (1-2 mM) producen una degradación autofágica de MYOD (Kim, Kim, & Yoo, 2012). Otra posibilidad sería que la melatonina, a elevadas concentraciones, estuviera induciendo en mioblastos jóvenes la diferenciación miogénica. Sin embargo, a elevadas concentraciones nosotros no observamos cambios en la expresión de los factores

miogénicos tempranos MYF5 y MYOD, claves para la determinación miogénica, ni en las tasas de autofagia. De hecho, la expresión del marcador de diferenciación tardía MYOG presentó incluso una leve tendencia a la baja.

Sin embargo, cuando evaluamos el efecto del tratamiento de las células C2C12-J con la concentración más baja de 1 nM de melatonina, hemos observado una parada del ciclo celular en G₂/M. La parada del ciclo celular en esta fase se ha relacionado, entre otros, con el punto de control de daño del ADN justo antes de la entrada en mitosis en respuesta a estrés genotóxico (Taylor & Stark, 2001). Aunque observamos parámetros similares con respecto a los niveles de Ca²⁺ mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial a aquellos mostrados por los mioblastos C2C12-J tratados con las concentraciones de melatonina 100 μM y 1 μM, se detectó una disminución de la viabilidad celular y una disminución del flujo autofágico tras el tratamiento con una concentración 1 nM, sugiriendo con ello que esta concentración es perjudicial para los mioblastos jóvenes y, siendo necesaria la activación de mecanismos de eliminación de células dañadas como la apoptosis. Es más, esta situación parece servir como impulsora, a modo de estrategia de supervivencia, de la diferenciación de los mioblastos que consiguen mantenerse, ya que al analizar los factores de regulación miogénica observamos un aumento de la expresión de MYF5 y MYOG. Los efectos antiproliferativos y citotóxicos de la melatonina están ampliamente descritos en la literatura en células cancerígenas, relacionados con la producción de ROS (Sainz et al., 2003) (Onder, Sezer, Ozdamar, & Yay, 2022), pero también han sido observados en células normales a niveles mucho menores (Kocyigit, Guler, Karatas, Caglar, & Bulut, 2018). Esta acción inhibitoria sobre crecimiento celular está relacionada con el grado de diferenciación y el metabolismo en el caso de las células P19. En las células P19 más diferenciadas y con un metabolismo más oxidativo la melatonina dispara un tipo de muerte celular mediado por la mitocondria que se caracteriza por una parada del ciclo celular en fase S, una reducción en la actividad de la cadena de transporte de electrones, una elevada producción de ROS, una regulación a la baja en la expresión de BCL2 y una liberación al citosol del factor inductor de la apoptosis (Loureiro et al., 2015).

Como hemos mencionado anteriormente, los estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han mostrado que los mioblastos C2C12-S presentan un perfil altamente metabólico, que depende de elevadas tasas tanto de la fosforilación oxidativa como de la glucólisis y, que la pérdida o reducción de la capacidad de diferenciación de las células C2C12-S podría deberse tanto a una deficiente señalización de p66Shc como de la respuesta autofágica. (Ochoa, 2019) En la

presente tesis doctoral hemos evaluado la progresión del ciclo celular. Pese a que una de las características más citadas de la presencia de senescencia celular es la parada del ciclo celular (Hernandez-Segura, Nehme, & Demaria, 2018) (Ogrodnik, 2021), nosotros no hemos observado que la senescencia desencadene una parada en un punto concreto del ciclo celular, sino un aumento del tiempo de duplicación junto con un cambio en la distribución de las células a lo largo de las diferentes fases, lo que sugiere una incapacidad de llevar a cabo ese ciclo de forma correcta o una pérdida del control del mismo.

Continuando con la evaluación de los mecanismos celulares que regulan la senescencia de los mioblastos C2C12 y del posible potencial terapéutico que tiene la melatonina contra el envejecimiento de estas células madre, anteriormente ya habíamos indicado que las concentraciones bajas de melatonina, como 100 nM y 1 nM, parecían tener un efecto beneficioso en las células C2C12-S al promover su proliferación. En esta ocasión, al contrario de lo que pasaba en las C2C12-J tratadas con melatonina, observamos una disminución del Ca^{2+} mitocondrial tras el tratamiento con la concentración de melatonina 1 nM. Esta disminución no evidenció cambios en el potencial de membrana mitocondrial al igual que ocurre con todas las concentraciones de melatonina estudiadas. Sin embargo, si observamos que la senescencia, ya de por sí, induce la disminución de dicho potencial de membrana en comparación con el de las células C2C12-J. Esta situación sugiere, como hemos demostrado anteriormente, que las células senescentes C2C12 presentan una menor eficiencia de la fosforilación oxidativa en comparación con las células C2C12-J (Ochoa, 2019), dependiendo su metabolismo más de la glucólisis. Esta situación se enmarca en el contexto de la presencia de una disfunción mitocondrial, un aumento de los niveles de ROS y una menor actividad antioxidante (Ochoa, 2019). Por ello, nuestros resultados sugieren que las dosis bajas de melatonina podrían estar ejerciendo un papel antioxidante, como antioxidante directo, disminuyendo los niveles ROS, mejorando la función mitocondrial y aumentando la proliferación celular como ocurre en las células MC3T3-E1 que presentan daño oxidativo inducido por H_2O_2 (H. D. Liu et al., 2022).

La autofagia es una vía de degradación celular que desempeña un papel crucial en la regulación de la quiescencia, autorenovación y diferenciación de las células madre (Ho et al., 2017). Durante la diferenciación de las células madre cumple dos funciones, la primera implica una remodelación celular y eliminación de componentes innecesarios durante la diferenciación, y la segunda se centra en proporcionar a las células materiales esenciales de construcción como aminoácidos y ácidos grasos que

son necesarios durante la remodelación celular mediante el reciclaje de componentes celulares innecesarios (Lampert & Gustafsson, 2020). Sin embargo, hallazgos recientes han descrito que una disminución en la actividad de la autofagia relacionada con la edad es clave en la disminución funcional de las células madre. (Garcia-Prat et al., 2016). En consonancia, en el presente trabajo encontramos que los mioblastos C2C12 senescentes tienen un menor flujo autofágico, efecto que parece ser determinante para el deterioro de su capacidad de proliferación y diferenciación (Ochoa, 2019). Sin embargo, la administración de melatonina en cualquiera de las concentraciones utilizadas para este estudio (100 μ M, 1 μ M y 1 nM) aumentó la acumulación de LC3-II tras el tratamiento con bafilomicina, sugiriendo con ello la eliminación de componentes innecesarios o dañados y favoreciendo así un reciclaje de componentes celulares que aumentaría la calidad celular de los mioblastos senescentes. De hecho, observamos que las concentraciones 1 μ M y 1 nM fueron capaces de disminuir el porcentaje de células C2C12-S apoptóticas, alcanzando niveles de viabilidad celular similares a los observados en mioblastos C2C12-J. Debido a ello, cabe la posibilidad que la autofagia sea una posible vía para mediar una actuación terapéutica con el fin de regular la activación celular y la consecución de un correcto programa miogénico.

Al analizar los factores de regulación miogénica en las células C2C12-S observamos que la concentración 1 nM de melatonina fue capaz de aumentar la expresión de la proteína PAX3, un marcador temprano de precursores miogénicos del dermomiótomo (Bober et al., 1994). Aunque las funciones de PAX3 no están esclarecidas por completo en la regeneración muscular, sí que se ha demostrado que puede desempeñar funciones similares en la activación de genes miogénicos como MYOD (Relaix et al., 2006). Además, se observó que esta misma concentración de melatonina disminuyó la expresión de MYOG, alcanzando niveles semejantes a los observados en las células C2C12-J no tratadas, sugiriendo con ello y junto con los resultados hasta el momento descritos, que los mioblastos senescentes tratados con bajas concentraciones de melatonina se encuentran en mejores condiciones que los no tratados para afrontar un proceso de diferenciación a miotubos. Cabe destacar que no se observaron grandes diferencias en la expresión de estos marcadores miogénicos entre mioblastos jóvenes y senescentes, salvo en el caso de los niveles de MYOG, los cuales fueron mayores en las células C2C12-S, probablemente debido al empuje hacia la diferenciación celular en respuesta al daño acumulado por la senescencia y como alternativa a la muerte celular que hemos visto también aumentada.

En conjunto, todos los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que el tratamiento con concentraciones bajas de melatonina ayuda a recuperar un estado de mayor funcionalidad en los mioblastos senescentes C2C12. En este contexto, nuestro grupo de investigación demostró que la diferenciación de mioblastos C2C12 a miotubos estaba acompañada de una reducción general del metabolismo energético y que la activación de la autofagia era esencial para esa reprogramación metabólica y por ende para la diferenciación (Ochoa, 2019). En el presente trabajo hemos evidenciado una reducción de los niveles de ATP tras el pretratamiento de los mioblastos C2C12 jóvenes y senescentes con melatonina (100 μ M y 1 nM) y tras 7 días de diferenciación a miotubos. Como hemos señalado anteriormente, la UPR acompaña a la diferenciación de las P19-CM, además, cada una de las tres proteínas transmembrana que posee la UPR activa mecanismos destinados a recuperar la homeostasis y lograr la supervivencia celular (Potes et al., 2017). Nosotros hemos observado que el pretratamiento con 100 μ M y 1 nM de melatonina aumenta la expresión de los niveles de BIP en miotubos jóvenes y senescentes. Esta situación vuelve a sugerir nuevamente, como pasó en las células P19, que el desencadenamiento de respuestas de estrés del RE asociadas con la síntesis global de proteínas y con la mejora del plegamiento de proteínas estén probablemente relacionadas con la remodelación metabólica asociada a la diferenciación. La reducción en la cantidad proteínas ubiquitinizadas observada en los miotubos procedentes de células C2C12-S pretratadas con melatonina se enmarca también en este contexto de una mejor calidad proteica. Al analizar la autofagia tras la diferenciación de mioblastos C2C12 jóvenes y senescentes pretratados con 1 nM de melatonina, observamos un aumento significativo del regulador autofágico Beclin-1. Sin embargo, al analizar el flujo autofágico confirmamos un efecto inhibitor de esta concentración de melatonina sobre la autofagia en miotubos senescentes. Cabe puntualizar que aunque en nuestros estudios previos hemos demostrado que la diferenciación de los mioblastos C2C12 jóvenes precisa del aumento del flujo autofágico (Ochoa, 2019), al igual que ocurre durante la diferenciación de otros tipos de células madre (Esteban-Martinez et al., 2017), observamos que la mejora de la capacidad miogénica de los mioblastos senescentes cuando son tratados con 1 nM de melatonina podría estar relacionada con una mejora de la calidad de estas células inducida directamente por el tratamiento, haciendo que no sea preciso el disparo de los sistemas de reciclaje de proteínas o estructuras defectuosas. De hecho, en resultados previos observamos que durante la diferenciación de las células C2C12-S el flujo autofágico era mayor que durante la diferenciación de las células C2C12-J. A pesar de ello, el programa miogénico no se desarrollaba de forma correcta, lo que

sugiere que esa autofagia exacerbada de los mioblastos senescentes durante el proceso de diferenciación está más relacionada con el reciclaje de estructuras dañadas que con la remodelación celular hacia un destino concreto.

De hecho, a la hora de analizar los marcadores miogénicos tras la diferenciación inducida con suero de caballo y el pretratamiento de los mioblastos con melatonina (100 μ M y 1 nM), observamos que los miotubos C2C12-J presentaban una retención del proceso de diferenciación en comparación con los miotubos procedentes de mioblastos C2C12-J sin pretratamiento, confirmando nuevamente lo postulado anteriormente sobre los efectos de estas elevadas concentraciones de melatonina en el mantenimiento del nicho de células madre. Cabe recordar que previamente a estudio, se había caracterizado el proceso de diferenciación de las células C2C12 inducido por la exposición a suero de caballo al 2%. En ese trabajo se observó que la diferenciación disparada era dependiente de MYF5 y no tanto de MYOD (Ochoa, 2019). En el presente trabajo observamos, especialmente con la concentración de 100 μ M, una menor expresión de los factores miogénicos MYF5 y MYOG junto con un aumento de la expresión del marcador de diferenciación temprana MYOD, lo que sugiere la inducción de rutas alternativas de diferenciación independientes de MYF5 para el rescate del programa miogénico que la melatonina a elevadas concentraciones está inhibiendo. En consonancia con esta hipótesis se ha observado recientemente que MYOD es el único factor de transcripción que puede establecer un programa complejo de expresión génica para la adquisición de un fenotipo diferenciado, siendo capaz de reprogramar el destino celular (Battistelli, Garbo, & Maione, 2022).

Por otro lado, observamos que la concentración 1 nM en miotubos procedentes de C2C12-S es capaz de recuperar el proceso de diferenciación perdido durante la senescencia celular, de forma que aumenta la expresión de MYF5 y MYOG en comparación con los miotubos procedentes de C2C12-S sin pretratar con melatonina. De hecho, estos resultados se enmarcan en los estudios de Relaix sobre células satélite, en los cuales indican que la diferenciación de este tipo de células depende de la expresión de MYF5 (Relaix et al., 2006).

El exceso de ROS durante la diferenciación, proliferación y senescencia celular reducen significativamente la funcionalidad de las células progenitoras musculares para reparar lesiones. La melatonina es una hormona con funciones antiinflamatorias, antioxidantes, oncostáticas y de regulación de la autofagia y de los ritmos circadianos entre otras. Evidencias actuales han demostrado que la melatonina a través de sus efectos como regulador del estado redox o mediados por receptor es capaz de

mejorar la capacidad de proliferación y eliminar la apoptosis de células madre sometidas a microrambientes lesionados *in vivo* e *in vitro*. Además, también se ha demostrado su utilidad en la (re)programación de células madre promoviendo, por ejemplo, en células madre mesenquimales, la osteogénesis y condrogénesis e inhibiendo la adipogénesis ((Hu & Li, 2019) (Hardeland, 2022)). En esta tesis hemos abordado la posibilidad del uso de la melatonina para el rescate de la capacidad miogénica de células precursoras musculares senescentes, demostrando con ello la necesidad de determinar en el futuro la concentración y momento de administración óptimos para cada tipo de célula progenitora y para cada finalidad concreta (proliferación, autorrenovación o diferenciación) con el objetivo último de convertir a la melatonina en un agente inductor atractivo para la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos.

La capacidad antioxidante de las células madre es particularmente relevante para su mantenimiento y función. Sin embargo, bajo condiciones fisiológicas, las células madre producen niveles basales de ROS para mantener la proliferación y diferenciación celular pero cuando, por cualquier causa como la senescencia, se produce un aumento de ROS, la función de las células madre se ve alterada a través de múltiples vías relacionadas con los sistemas de control de calidad de proteínas, como la autofagia, y con el resto de los sistemas de control de calidad celular, como la apoptosis (Ksiazek, 2009). En este contexto, la administración de melatonina podría mejorar la manipulación de las células madre *ex vivo* e *in vivo* al servir como agente protector frente a la oxidación, inflamación, apoptosis y envejecimiento y como agente programador del destino celular mediante la regulación de la generación de ROS y de la autofagia (Hu & Li, 2019).

Aunque aún quedan muchas incógnitas por resolver con relación a los mecanismos implicados en el mantenimiento de la troncalidad y capacidad de diferenciación de las células madre, a partir de este estudio podemos concluir que existe una estrecha relación entre el metabolismo energético, la autofagia y la proteostasis con el mantenimiento de la autorrenovación, troncalidad y capacidad de diferenciación de las células madre. De forma que hemos observado que el metabolismo energético, el sistema redox, la autofagia y el resto de componentes de los sistemas de control de calidad de proteínas son factores determinantes en el control del destino celular y en las decisiones la vida o muerte celular. En consonancia, una eficiente degradación de proteínas, estructuras o células dañadas desempeña un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis celular, interactuando con la maquinaria apoptótica y con varias cascadas de transducción de señales para detectar fluctuaciones en

parámetros metabólicos y redox clave y adaptar así a las células a condiciones adversas, como el suministro limitado de nutrientes, la privación de oxígeno o la senescencia celular. Por todo ello y dada la vida relativamente larga de las células madre, la eficiencia de los mecanismos de control de calidad celular es clave para equilibrar la supervivencia celular y la resistencia al daño, preservando así el grupo de células madre en condiciones óptimas para su actuación a lo largo de toda la vida del individuo y especialmente durante el envejecimiento.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas de esta tesis doctoral se enumeran a continuación:

1. La supervivencia de las células madre P19 ante situaciones adversas es dependiente tanto de una fuerte respuesta antioxidante como del aumento de los umbrales de disparo de muerte celular.
2. La activación de los procesos autofágicos es clave para el mantenimiento de la troncalidad de las células madre P19, al preservar una adecuada calidad mitocondrial y homeostasis proteica, minimizando así, la transmisión de estructuras dañadas a células progenitoras.
3. La diferenciación de las células madre P19 requiere, además de un metabolismo oxidativo, de la activación de la UPR y del sistema ubiquitina-proteasoma para mantener la homeostasis proteica durante la remodelación celular.
4. La activación de la vía PI3K/AKT/mTOR/P70S6K, es esencial para la diferenciación de las células madre P19 al suprimir la apoptosis y promover el crecimiento celular, asociando la reprogramación metabólica hacia un metabolismo oxidativo con el mantenimiento de la proteostasis, de forma que se satisfagan los requerimientos de las progenies diferenciadas.
5. El tratamiento de mioblastos C2C12 jóvenes con elevadas concentraciones de melatonina favorece el mantenimiento del nicho células precursoras.
6. El tratamiento de mioblastos C2C12 senescentes con 1 nM de melatonina aumenta la proliferación celular, disminuye la apoptosis, aumenta la respuesta autofágica y recupera el programa miogénico perdido durante la senescencia celular.
7. Los mecanismos de control de calidad de proteínas equilibran la supervivencia celular y la resistencia al daño preservando así el mantenimiento y la capacidad de diferenciación de las células madre en general y de las células madre envejecidas en particular.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Ghani, M., Dufort, D., Stiles, R., De Repentigny, Y., Kothary, R., & Megeney, L. A. (2011). Wnt11 promotes cardiomyocyte development by caspase-mediated suppression of canonical Wnt signals. *Mol Cell Biol*, *31*(1), 163-178. doi:10.1128/MCB.01539-09
- Antico Arciuch, V. G., Elguero, M. E., Poderoso, J. J., & Carreras, M. C. (2012). Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxid Redox Signal*, *16*(10), 1150-1180. doi:10.1089/ars.2011.4085
- Arnao, M. B., Cano, A. C., & Acosta, A. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, *73*(2), 239-244. doi:[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1)
- B'Chir, W., Chaveroux, C., Carraro, V., Averous, J., Maurin, A. C., Jousse, C., . . . Bruhat, A. (2014). Dual role for CHOP in the crosstalk between autophagy and apoptosis to determine cell fate in response to amino acid deprivation. *Cell Signal*, *26*(7), 1385-1391. doi:10.1016/j.cellsig.2014.03.009
- Bach, D., Pich, S., Soriano, F. X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., ... & Zorzano, A. (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism: a novel regulatory mechanism altered in obesity. *Journal of Biological Chemistry*, *278* 17190-17197(19), 17190-17197.
- Baker, J. S., McCormick, M. C., & Robergs, R. A. (2010). Interaction among Skeletal Muscle Metabolic Energy Systems during Intense Exercise. *J Nutr Metab*, *2010*, 905612. doi:10.1155/2010/905612
- Battistelli, C., Garbo, S., & Maione, R. (2022). MyoD-Induced Trans-Differentiation: A Paradigm for Dissecting the Molecular Mechanisms of Cell Commitment, Differentiation and Reprogramming. *Cells*, *11*(21). doi:10.3390/cells11213435
- Bereiter-Hahn, J., & Voth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech*, *27*(3), 198-219. doi:10.1002/jemt.1070270303
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, *2*(6), 326-332. doi:10.1038/35014014
- Bi, L., Okabe, I., Bernard, D. J., & Nussbaum, R. L. (2002). Early embryonic lethality in mice deficient in the p110beta catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mamm Genome*, *13*(3), 169-172. doi:10.1007/BF02684023
- Bi, L., Okabe, I., Bernard, D. J., Wynshaw-Boris, A., & Nussbaum, R. L. (1999). Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, *274*(16), 10963-10968. doi:10.1074/jbc.274.16.10963
- Bober, E., Franz, T., Arnold, H. H., Gruss, P., & Tremblay, P. (1994). Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development*, *120*(3), 603-612. doi:10.1242/dev.120.3.603
- Bonora, M., Kahsay, A., & Pinton, P. (2021). Mitochondrial calcium homeostasis in hematopoietic stem cell: Molecular regulation of quiescence, function, and differentiation. *Int Rev Cell Mol Biol*, *362*, 111-140. doi:10.1016/bs.ircmb.2021.05.003
- Boyd, S., Gutiérrez, A. y McCulley, J. . (2011). *Atlas y texto de patología y cirugía corneal*. (D. E. Médicas Ed.). Ciudad de Panama.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., & Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309(5965), 255-256. doi:10.1038/309255a0
- Brawn, K., & Fridovich, I. (1980). Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense. *Acta Physiol Scand Suppl*, 492, 9-18. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6261531>
- Byrne, J., Simonsson, S., Western, PS, Gurdon, JB (2003). *Los núcleos de células somáticas de mamíferos adultos se reprograman directamente a la expresión génica de células madre oct-4 por ovocitos de anfibios* (B. actual Ed. Vol. 13).
- Cao, Y., Fang, Y., Cai, J., Li, X., Xu, F., Yuan, N., . . . Wang, J. (2016). ROS functions as an upstream trigger for autophagy to drive hematopoietic stem cell differentiation. *Hematology*, 21(10), 613-618. doi:10.1080/10245332.2016.1165446
- Caplan, A. I., & Hariri, R. (2015). Body Management: Mesenchymal Stem Cells Control the Internal Regenerator. *Stem Cells Transl Med*, 4(7), 695-701. doi:10.5966/sctm.2014-0291
- Chal, J., Al Tanoury, Z., Hestin, M., Gobert, B., Aivio, S., Hick, A., . . . Pourquie, O. (2016). Generation of human muscle fibers and satellite-like cells from human pluripotent stem cells in vitro. *Nat Protoc*, 11(10), 1833-1850. doi:10.1038/nprot.2016.110
- Chang, N. C. (2020). Autophagy and Stem Cells: Self-Eating for Self-Renewal. *Front Cell Dev Biol*, 8, 138. doi:10.3389/fcell.2020.00138
- Chatgililoglu, C., & O'Neill, P. (2001). Free radicals associated with DNA damage. *Exp Gerontol*, 36(9), 1459-1471. doi:10.1016/s0531-5565(01)00132-2
- Chaube, R. (2015). Can UPR integrate fasting and stem cell regeneration? *Front Chem*, 3, 5. doi:10.3389/fchem.2015.00005
- Cho, Y. H., Han, K. M., Kim, D., Lee, J., Lee, S. H., Choi, K. W., . . . Han, Y. M. (2014). Autophagy regulates homeostasis of pluripotency-associated proteins in hESCs. *Stem Cells*, 32(2), 424-435. doi:10.1002/stem.1589
- Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Li, T., Maserati, M., Lu, S. J., . . . Lanza, R. (2008). Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell*, 2(2), 113-117. doi:10.1016/j.stem.2007.12.013
- Cohnheim, J. P., A. . (1907). Vorlesungen über allgemeine Pathologie: ein Handbuch für Aerzte und Studierende. Teil 1. *Fol. Haematopeues* 4, 301-308.
- Condic, M. L. (2014). Totipotency: what it is and what it is not. *Stem Cells Dev*, 23(8), 796-812. doi:10.1089/scd.2013.0364
- Coto-Montes, A., Boga, J. A., Rosales-Corral, S., Fuentes-Broto, L., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2012). Role of melatonin in the regulation of autophagy and mitophagy: a review. *Mol Cell Endocrinol*, 361(1-2), 12-23. doi:10.1016/j.mce.2012.04.009
- Coto-Montes, A., & Hardeland, R. (1999). Antioxidative effects of melatonin in *Drosophila melanogaster*: antagonization of damage induced by the inhibition of catalase. *J Pineal Res*, 27(3), 154-158. doi:10.1111/j.1600-079x.1999.tb00610.x
- Cristofalo, V. J., Volker, C., Francis, M. K., & Tresini, M. (1998). Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 8(1), 43-80. doi:10.1615/critreveukargeneexpr.v8.i1.30
- Cuervo, A. M. (2004). Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem*, 263(1-2), 55-72. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15524167>
- Cuervo, A. M., & Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res*, 24(1), 92-104. doi:10.1038/cr.2013.153

- De Duve, C., & Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev*, 46(2), 323-357. doi:10.1152/physrev.1966.46.2.323
- de Oliveira, V. N., Bessa, A., Jorge, M. L., Oliveira, R. J., de Mello, M. T., De Agostini, G. G., . . . Espindola, F. S. (2012). The effect of different training programs on antioxidant status, oxidative stress, and metabolic control in type 2 diabetes. *Appl Physiol Nutr Metab*, 37(2), 334-344. doi:10.1139/h2012-004
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., & Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, 324 (Pt 1)(Pt 1), 1-18. doi:10.1042/bj3240001
- Dick, S. A., Chang, N. C., Dumont, N. A., Bell, R. A., Putinski, C., Kawabe, Y., . . . Megeney, L. A. (2015). Caspase 3 cleavage of Pax7 inhibits self-renewal of satellite cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(38), E5246-5252. doi:10.1073/pnas.1512869112
- Donovan, P. J., & Gearhart, J. (2001). The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*, 414(6859), 92-97. doi:10.1038/35102154
- Esteban-Martinez, L., Sierra-Filardi, E., McGreal, R. S., Salazar-Roa, M., Marino, G., Seco, E., . . . Boya, P. (2017). Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation. *EMBO J*, 36(12), 1688-1706. doi:10.15252/embj.201695916
- Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*, 186, 407-421. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2233308>
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154-156. doi:10.1038/292154a0
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., & Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 279(5356), 1528-1530. doi:10.1126/science.279.5356.1528
- Flores-Figueroa, E., Montesinos, Juan José, & Mayani, Héctor. (2006). Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Revista de investigación clínica*, 58(5), 498-511.
- French, A. J., Adams, C. A., Anderson, L. S., Kitchen, J. R., Hughes, M. R., & Wood, S. H. (2008). Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells*, 26(2), 485-493. doi:10.1634/stemcells.2007-0252
- Frieden, M., James, D., Castelbou, C., Danckaert, A., Martinou, J. C., & Demaurex, N. (2004). Ca²⁺ homeostasis during mitochondrial fragmentation and perinuclear clustering induced by hFis1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 22704-22714.
- Fu, S., Watkins, S. M., & Hotamisligil, G. S. (2012). The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell Metab*, 15(5), 623-634. doi:10.1016/j.cmet.2012.03.007
- Fujita, J., Crane, A. M., Souza, M. K., Dejosez, M., Kyba, M., Flavell, R. A., . . . Zwaka, T. P. (2008). Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2(6), 595-601. doi:10.1016/j.stem.2008.04.001
- Furth, J., Kahn, MC y Breedis, C. . (1937). La transmisión de la leucemia de ratones con una sola célula. *El diario americano del cáncer*, 31(2), 276-282.
- Galimov, E. R. (2010). The Role of p66shc in Oxidative Stress and Apoptosis. *Acta Naturae*, 2(4), 44-51. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22649663>
- Garcia-Prat, L., Martinez-Vicente, M., Perdiguero, E., Ortet, L., Rodriguez-Ubreva, J., Rebollo, E., . . . Munoz-Canoves, P. (2016). Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature*, 529(7584), 37-42. doi:10.1038/nature16187
- García de Insausti, C. L. (2012). *Aislamiento y caracterización de las células madre de la membrana amniótica: una nueva fuente para terapia celular e inmuno-modulación.* .
- Gastesi, T. N. N. (2018). *Caracterización celular y molecular de la miogénesis dérmica de ratón y su posible traslación al humano.* Universidad del País Vasco,

- Gerard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Regnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J. C., & Chaudiere, J. (1998). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol*, *11*(10), 1176-1183. doi:10.1021/tx9701790
- Gomis, R. (2011). ¿El final de la diabetes?: Células madre, la esperanza de la biomedicina
- Gotoh, T., Endo, M., & Oike, Y. (2011). Endoplasmic reticulum stress-related inflammation and cardiovascular diseases. *Int J Inflamm*, *2011*, 259462. doi:10.4061/2011/259462
- Gozuacik, D., & Kimchi, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, *23*(16), 2891-2906. doi:10.1038/sj.onc.1207521
- Grisham, M. B., Johnson, G. G., & Lancaster, J. R., Jr. (1996). Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol*, *268*, 237-246. doi:10.1016/s0076-6879(96)68026-4
- Groll, M., & Potts, B. C. (2011). Proteasome structure, function, and lessons learned from beta-lactone inhibitors. *Curr Top Med Chem*, *11*(23), 2850-2878. doi:10.2174/156802611798281320
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., . . . Mulligan, R. C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, *401*(6751), 390-394. doi:10.1038/43919
- Han, J., Back, S. H., Hur, J., Lin, Y. H., Gildersleeve, R., Shan, J., . . . Kaufman, R. J. (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol*, *15*(5), 481-490. doi:10.1038/ncb2738
- Harary, I., & Farley, B. (1960). In vitro studies of single isolated beating heart cells. *Science*, *131*(3414), 1674-1675. doi:10.1126/science.131.3414.1674
- Hardeland, R. (2022). Melatonin and the Programming of Stem Cells. *Int J Mol Sci*, *23*(4). doi:10.3390/ijms23041971
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, *25*, 585-621. doi:10.1016/0014-4827(61)90192-6
- Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*, *28*(6), 436-453. doi:10.1016/j.tcb.2018.02.001
- Hershko, A., & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, *67*, 425-479. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425
- Hirokawa, N., & Takemura, R. (2005). Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci*, *6*(3), 201-214. doi:10.1038/nrn1624
- Ho, T. T., Warr, M. R., Adelman, E. R., Lansinger, O. M., Flach, J., Verovskaya, E. V., . . . Passegue, E. (2017). Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature*, *543*(7644), 205-210. doi:10.1038/nature21388
- Hollenbeck, P. J., & Saxton, W. M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci*, *118*(Pt 23), 5411-5419. doi:10.1242/jcs.02745
- Hoyer-Hansen, M., & Jaattela, M. (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ*, *14*(9), 1576-1582. doi:10.1038/sj.cdd.4402200
- Hu, C., & Li, L. (2019). Melatonin plays critical role in mesenchymal stem cell-based regenerative medicine in vitro and in vivo. *Stem Cell Res Ther*, *10*(1), 13. doi:10.1186/s13287-018-1114-8
- Hurtley, S., & Alderton, G. (2019). Quality control in cell biology. *Science*, *366*(6467), 816-817. doi:10.1126/science.aba0302
- Iwawaki, T., Akai, R., Yamanaka, S., & Kohno, K. (2009). Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(39), 16657-16662. doi:10.1073/pnas.0903775106

- Jackson, K. A., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., . . . Goodell, M. A. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, *107*(11), 1395-1402. doi:10.1172/JCI12150
- Jiang, W., Shi, Y., Zhao, D., Chen, S., Yong, J., Zhang, J., . . . Deng, H. (2007). In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Res*, *17*(4), 333-344. doi:10.1038/cr.2007.28
- Johansson, A. C., Steen, H., Ollinger, K., & Roberg, K. (2003). Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine. *Cell Death Differ*, *10*(11), 1253-1259. doi:10.1038/sj.cdd.4401290
- Jorge Bartolucci, F. J. V., Ricardo Larrea¹, Flavio Carrión, Rubén Lamich, Pablo Pedreros, Manuel Delgado, Patricio Sanhueza, Maroun Khoury, Fernando E. Figueroa. Stem cells for the treatment of cardiovascular diseases. An update. *Rev. méd. Chile*, *142*(8).
- Kawabata, M., Kawabata, T., & Saeki, K. (2004). DNA rearrangement activity during retinoic acid-induced neural differentiation of P19 mouse embryonal carcinoma cells. *Acta Med Okayama*, *58*(6), 263-270. doi:10.18926/AMO/32091
- Kim, C. H., Kim, K. H., & Yoo, Y. M. (2012). Melatonin-induced autophagy is associated with degradation of MyoD protein in C2C12 myoblast cells. *J Pineal Res*, *53*(3), 289-297. doi:10.1111/j.1600-079X.2012.00998.x
- Kingham, E., & Welham, M. (2009). Distinct roles for isoforms of the catalytic subunit of class-IA PI3K in the regulation of behaviour of murine embryonic stem cells. *J Cell Sci*, *122*(Pt 13), 2311-2321. doi:10.1242/jcs.046557
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., . . . Zughaier, S. M. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, *12*(1), 1-222. doi:10.1080/15548627.2015.1100356
- Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., . . . Deter, R. L. (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, *4*(2), 151-175. doi:10.4161/auto.5338
- Kocyigit, A., Guler, E. M., Karatas, E., Caglar, H., & Bulut, H. (2018). Dose-dependent proliferative and cytotoxic effects of melatonin on human epidermoid carcinoma and normal skin fibroblast cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, *829-830*, 50-60. doi:10.1016/j.mrgentox.2018.04.002
- Komatsu, M. (2011). Potential role of p62 in tumor development. *Autophagy*, *7*(9), 1088-1090. doi:10.4161/auto.7.9.16474
- Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., . . . Sharkis, S. J. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, *105*(3), 369-377. doi:10.1016/s0092-8674(01)00328-2
- Ksiazek, K. (2009). A comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence. *Rejuvenation Res*, *12*(2), 105-116. doi:10.1089/rej.2009.0830
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., . . . Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*, *6*(11), 1229-1234. doi:10.1038/81326
- Lampert, M. A., & Gustafsson, A. B. (2020). Mitochondria and autophagy in adult stem cells: proliferate or differentiate. *J Muscle Res Cell Motil*, *41*(4), 355-362. doi:10.1007/s10974-019-09542-w
- Lavallard, V. J., Meijer, A. J., Codogno, P., & Gual, P. (2012). Autophagy, signaling and obesity. *Pharmacol Res*, *66*(6), 513-525. doi:10.1016/j.phrs.2012.09.003
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., . . . Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, *5*(2), 187-195. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x

- Lee, D. H., & Chung, H. M. (2011). Differentiation into Endoderm Lineage: Pancreatic differentiation from Embryonic Stem Cells. *Int J Stem Cells*, 4(1), 35-42. doi:10.15283/ijsc.2011.4.1.35
- Lee, H. C., Kim, S. J., Kim, K. S., Shin, H. C., & Yoon, J. W. (2000). Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature*, 408(6811), 483-488. doi:10.1038/35044106
- Lee, J., Giordano, S., & Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J*, 441(2), 523-540. doi:10.1042/BJ20111451
- Leon, G., Holuigue, L., & Jordana, X. (2007). Mitochondrial complex II is essential for gametophyte development in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 143(4), 1534-1546. doi:10.1104/pp.106.095158
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., . . . Stadtman, E. R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 186, 464-478. doi:10.1016/0076-6879(90)86141-h
- Li, F., He, Z., Shen, J., Huang, Q., Li, W., Liu, X., . . . Li, C. Y. (2010). Apoptotic caspases regulate induction of iPSCs from human fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 7(4), 508-520. doi:10.1016/j.stem.2010.09.003
- Liang, S. H., Zhang, W., McGrath, B. C., Zhang, P., & Cavener, D. R. (2006). PERK (eIF2alpha kinase) is required to activate the stress-activated MAPKs and induce the expression of immediate-early genes upon disruption of ER calcium homeostasis. *Biochem J*, 393(Pt 1), 201-209. doi:10.1042/BJ20050374
- Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S. J., Murphy, M. E., Appella, E., & Xu, Y. (2005). p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol*, 7(2), 165-171. doi:10.1038/ncb1211
- Liu, H. D., Ren, M. X., Li, Y., Zhang, R. T., Ma, N. F., Li, T. L., . . . Yang, M. (2022). Melatonin alleviates hydrogen peroxide induced oxidative damage in MC3T3-E1 cells and promotes osteogenesis by activating SIRT1. *Free Radic Res*, 56(1), 63-76. doi:10.1080/10715762.2022.2037580
- Liu, S., Zhou, J., Zhang, X., Liu, Y., Chen, J., Hu, B., Zhang, Y. (2016). Estrategias para optimizar la terapia con células madre adultas para la regeneración de tejidos. *Revista internacional de ciencias moleculares*. *Revista internacional de ciencias moleculares* 17(6), 982.
- Loh, Y. H., Wu, Q., Chew, J. L., Vega, V. B., Zhang, W., Chen, X., . . . Ng, H. H. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*, 38(4), 431-440. doi:10.1038/ng1760
- Lopez-Lluch, G., Irusta, P. M., Navas, P., & de Cabo, R. (2008). Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp Gerontol*, 43(9), 813-819. doi:10.1016/j.exger.2008.06.014
- Losa, C. P. (2010). *Modificaciones relacionadas con la edad en el sistema ubiquitina-proteasoma y en la respuesta a proteínas mal plegadas en el hipocampo de rata: relación de procesos neurodegenerativos*. Universidad de Sevilla,
- Loureiro, R., Magalhaes-Novais, S., Mesquita, K. A., Baldeiras, I., Sousa, I. S., Tavares, L. C., . . . Vega-Naredo, I. (2015). Melatonin antiproliferative effects require active mitochondrial function in embryonal carcinoma cells. *Oncotarget*, 6(19), 17081-17096. doi:10.18632/oncotarget.4012
- Lubinsky, S., & Bewley, G. C. (1979). Genetics of Catalase in DROSOPHILA MELANOGASTER: Rates of Synthesis and Degradation of the Enzyme in Flies Aneuploid and Euploid for the Structural Gene. *Genetics*, 91(4), 723-742. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17248908>
- Lucas, R. L. (2005). Explícame la bioética: Guía explicativa de los temas más controvertidos sobre la vida humana. In Palabra (Ed.).

- M., H. (1992). Embryonal stem cells: introducing planned changes into the germline. *J Biotechnol* 98, 145-160.
- Ma, W. Y., Song, R. J., Xu, B. B., Xu, Y., Wang, X. X., Sun, H. Y., . . . Cai, B. Z. (2021). Melatonin promotes cardiomyocyte proliferation and heart repair in mice with myocardial infarction via miR-143-3p/Yap/Ctnnd1 signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin*, 42(6), 921-931. doi:10.1038/s41401-020-0495-2
- Maehle, A. H. (2011). Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. *Notes Rec R Soc Lond*, 65(4), 359-378. doi:10.1098/rsnr.2011.0023
- Maguire, G. (2016). Terapéutica a partir de células madre adultas y la curva del hype. . *Cartas de química médica de la ACS*, 7(5), 441-443.
- Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., . . . Ogawa, S. (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 103(5), 697-705. doi:10.1172/JCI5298
- Marañez, G. (2010). *Potencialidad queratinocítica de las células madre de la gelatina de wharton para su utilización en ingeniería tisular*. (Doctoral). Universidad de Granada, Bogotá, Colombia
- Marciniak, S. J., Yun, C. Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., . . . Ron, D. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 18(24), 3066-3077. doi:10.1101/gad.1250704
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12), 7634-7638. doi:10.1073/pnas.78.12.7634
- Martin, J. P., Jr., Dailey, M., & Sugarman, E. (1987). Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch Biochem Biophys*, 255(2), 329-336. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3036004>
- McBurney, M. W., Jones-Villeneuve, E. M., Edwards, M. K., & Anderson, P. J. (1982). Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature*, 299(5879), 165-167. doi:10.1038/299165a0
- McBurney, M. W., & Rogers, B. J. (1982). Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev Biol*, 89(2), 503-508. doi:10.1016/0012-1606(82)90338-4
- Miho, Y., Kouroku, Y., Fujita, E., Mukasa, T., Urase, K., Kasahara, T., . . . Momoi, T. (1999). bFGF inhibits the activation of caspase-3 and apoptosis of P19 embryonal carcinoma cells during neuronal differentiation. *Cell Death Differ*, 6(5), 463-470. doi:10.1038/sj.cdd.4400506
- Misaka, T., Miyashita, T., & Kubo, Y. (2002). Primary structure of a dynamin-related mouse mitochondrial GTPase and its distribution in brain, subcellular localization, and effect on mitochondrial morphology. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 15834-15842.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., . . . Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol*, 152(4), 657-668. doi:10.1083/jcb.152.4.657
- Morita, M., Gravel, S. P., Chenard, V., Sikstrom, K., Zheng, L., Alain, T., . . . Sonenberg, N. (2013). mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab*, 18(5), 698-711. doi:10.1016/j.cmet.2013.10.001
- Mortensen, M., Ferguson, D. J., Edelmann, M., Kessler, B., Morten, K. J., Komatsu, M., & Simon, A. K. (2010). Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(2), 832-837. doi:10.1073/pnas.0913170107

- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., & Roder, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(18), 8424-8428. doi:10.1073/pnas.90.18.8424
- Narendra, D. P., & Youle, R. J. (2011). Targeting mitochondrial dysfunction: role for PINK1 and Parkin in mitochondrial quality control. *Antioxid Redox Signal*, *14*(10), 1929-1938. doi:10.1089/ars.2010.3799
- Neves, J., Sousa-Victor, P., & Jasper, H. (2017). Rejuvenating Strategies for Stem Cell-Based Therapies in Aging. *Cell Stem Cell*, *20*(2), 161-175. doi:10.1016/j.stem.2017.01.008
- Noll, E., & Miller, R. H. (1994). Regulation of oligodendrocyte differentiation: a role for retinoic acid in the spinal cord. *Development*, *120*(3), 649-660. doi:10.1242/dev.120.3.649
- Noman, M. Z., Buart, S., Van Pelt, J., Richon, C., Hasmim, M., Leleu, N., . . . Chouaib, S. (2009). The cooperative induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha and STAT3 during hypoxia induced an impairment of tumor susceptibility to CTL-mediated cell lysis. *J Immunol*, *182*(6), 3510-3521. doi:10.4049/jimmunol.0800854
- Nombela, C., & Cano, C. N. (2007). Células madre: Encrucijadas biológicas para la Medicina: del tronco embrionario a la regeneración adulta. In Edaf (Ed.).
- Ochoa, Y. P. (2019). *Assessing and unraveling sarcopenia: role of body weight in muscle wasting*. Universidad de Oviedo,
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., . . . Imaizumi, K. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*, *26*(24), 9220-9231. doi:10.1128/MCB.01453-06
- Ogrodnik, M. (2021). Cellular aging beyond cellular senescence: Markers of senescence prior to cell cycle arrest in vitro and in vivo. *Aging Cell*, *20*(4), e13338. doi:10.1111/accel.13338
- Okita, K., & Yamanaka, S. (2014). *Chapter 26. Induced pluripotent stem cells.* .
- Onder, G. O., Sezer, G., Ozdamar, S., & Yay, A. (2022). Melatonin has an inhibitory effect on MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cell lines by inducing autophagy and apoptosis. *Fundam Clin Pharmacol*, *36*(6), 1038-1056. doi:10.1111/fcp.12813
- Orellana, E. A., & Kasinski, A. L. (2016). Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *Bio Protoc*, *6*(21). doi:10.21769/BioProtoc.1984
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., . . . Anversa, P. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, *410*(6829), 701-705. doi:10.1038/35070587
- Ozeki, N., Jethanandani, P., Nakamura, H., Ziober, B. L., & Kramer, R. H. (2007). Modulation of satellite cell adhesion and motility following BMP2-induced differentiation to osteoblast lineage. *Biochem Biophys Res Commun*, *353*(1), 54-59. doi:10.1016/j.bbrc.2006.11.110
- Paling, N. R., Wheadon, H., Bone, H. K., & Welham, M. J. (2004). Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem*, *279*(46), 48063-48070. doi:10.1074/jbc.M406467200
- Pani, G., & Galeotti, T. (2011). Role of MnSOD and p66shc in mitochondrial response to p53. *Antioxid Redox Signal*, *15*(6), 1715-1727. doi:10.1089/ars.2010.3499
- Pappenheim, A. (1917). Prinzipien Der Neuen Morphologischen Haematologie Nach Zytogenetischer Grundlage *FOLIA HAEMATOLOGICA* *21*, 91-101.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F. M., & Paradies, G. (2003). Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *FASEB J*, *17*(15), 2202-2208. doi:10.1096/fj.03-0012com
- Phadwal, K., Watson, A. S., & Simon, A. K. (2013). Tightrope act: autophagy in stem cell renewal, differentiation, proliferation, and aging. *Cell Mol Life Sci*, *70*(1), 89-103. doi:10.1007/s00018-012-1032-3

- Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 70, 503-533. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.503
- Potes, Y., de Luxan-Delgado, B., Rodriguez-Gonzalez, S., Guimaraes, M. R. M., Solano, J. J., Fernandez-Fernandez, M., . . . Coto-Montes, A. (2017). Overweight in elderly people induces impaired autophagy in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, 110, 31-41. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.018
- Presa Torre, N. S. A., C.; Beltrán Povea, A.; Tapia Limonchi, R.; Hitos Prados, A.; Díaz Contreras, I.; Tejado Huamán, J.; Bedoya Bergua, F. (2013). Relación Entre Muerte Celular Y Mantenimiento De La Pluripotencialidad De células MES En Protocolos De diferenciación Con óxido nítrico. *BS*, 1.
- Qin, H., Yu, T., Qing, T., Liu, Y., Zhao, Y., Cai, J., . . . Deng, H. (2007). Regulation of apoptosis and differentiation by p53 in human embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 282(8), 5842-5852. doi:10.1074/jbc.M610464200
- Rajesh, K., Krishnamoorthy, J., Kazimierczak, U., Tenkerian, C., Papadakis, A. I., Wang, S., . . . Koromilas, A. E. (2015). Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha at serine 51 determines the cell fate decisions of Akt in response to oxidative stress. *Cell Death Dis*, 6(1), e1591. doi:10.1038/cddis.2014.554
- Ramis, M. R., Esteban, S., Miralles, A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2015). Protective Effects of Melatonin and Mitochondria-targeted Antioxidants Against Oxidative Stress: A Review. *Curr Med Chem*, 22(22), 2690-2711. doi:10.2174/0929867322666150619104143
- Reiter, R. J. (1998). Melatonin and human reproduction. *Ann Med*, 30(1), 103-108. doi:10.3109/07853899808999391
- Reiter, R. J. (2003). Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 17(2), 273-285. doi:10.1016/s1521-690x(03)00016-2
- Reiter, R. J., Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Alatorre-Jimenez, M., & Qin, L. (2016). Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res*, 61(3), 253-278. doi:10.1111/jpi.12360
- Reiter, R. J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., . . . Acuna-Castroviejo, D. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res*, 18(1), 1-11. doi:10.1111/j.1600-079x.1995.tb00133.x
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., . . . Buckingham, M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol*, 172(1), 91-102. doi:10.1083/jcb.200508044
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*, 192(4), 547-556. doi:10.1083/jcb.201009094
- Romero-Calvo, I., Ocon, B., Martinez-Moya, P., Suarez, M. D., Zarzuelo, A., Martinez-Augustin, O., & de Medina, F. S. (2010). Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem*, 401(2), 318-320. doi:10.1016/j.ab.2010.02.036
- Ryoo, H. D., & Bergmann, A. (2012). The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(8), a008797. doi:10.1101/cshperspect.a008797
- Sainz, R. M., Mayo, J. C., Rodriguez, C., Tan, D. X., Lopez-Burillo, S., & Reiter, R. J. (2003). Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci*, 60(7), 1407-1426. doi:10.1007/s00018-003-2319-1
- Sainz, R. M., Mayo, J. C., Uria, H., Kotler, M., Antolin, I., Rodriguez, C., & Menendez-Pelaez, A. (1995). The pineal neurohormone melatonin prevents in vivo and in vitro apoptosis in thymocytes. *J Pineal Res*, 19(4), 178-188. doi:10.1111/j.1600-079x.1995.tb00187.x

- Saito, Y., & Chikenji, T. S. (2021). Diverse Roles of Cellular Senescence in Skeletal Muscle Inflammation, Regeneration, and Therapeutics. *Front Pharmacol*, *12*, 739510. doi:10.3389/fphar.2021.739510
- Sansone, P., Storci, G., Giovannini, C., Pandolfi, S., Pianetti, S., Taffurelli, M., . . . Bonafe, M. (2007). p66Shc/Notch-3 interplay controls self-renewal and hypoxia survival in human stem/progenitor cells of the mammary gland expanded in vitro as mammospheres. *Stem Cells*, *25*(3), 807-815. doi:10.1634/stemcells.2006-0442
- Scalettar, B. A., Abney, J. R., & Hackenbrock, C. R. (1991). Dynamics, structure, and function are coupled in the mitochondrial matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(18), 8057-8061.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T., & Gey, G. O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med*, *97*(5), 695-710. doi:10.1084/jem.97.5.695
- Schmidt, M., Schuler, S. C., Huttner, S. S., von Eyss, B., & von Maltzahn, J. (2019). Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. *Cell Mol Life Sci*, *76*(13), 2559-2570. doi:10.1007/s00018-019-03093-6
- Seale, P., Asakura, A., & Rudnicki, M. A. (2001). The potential of muscle stem cells. *Dev Cell*, *1*(3), 333-342. doi:10.1016/s1534-5807(01)00049-1
- Seo, A. Y., Joseph, A. M., Dutta, D., Hwang, J. C., Aris, J. P., & Leeuwenburgh, C. (2010). New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *Journal of cell science*, *123* (15), 2533-2542.
- Shamblott, M. J., Axelman, J., Littlefield, J. W., Blumenthal, P. D., Huggins, G. R., Cui, Y., . . . Gearhart, J. D. (2001). Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(1), 113-118. doi:10.1073/pnas.98.1.113
- Sharples, A. P., Al-Shanti, N., Lewis, M. P., & Stewart, C. E. (2011). Reduction of myoblast differentiation following multiple population doublings in mouse C2 C12 cells: a model to investigate ageing? *J Cell Biochem*, *112*(12), 3773-3785. doi:10.1002/jcb.23308
- Sidrauski, C., Chapman, R., & Walter, P. (1998). The unfolded protein response: an intracellular signalling pathway with many surprising features. *Trends Cell Biol*, *8*(6), 245-249. doi:10.1016/s0962-8924(98)01267-7
- Silva, F. S. G., Starostina, I. G., Ivanova, V. V., Rizvanov, A. A., Oliveira, P. J., & Pereira, S. P. (2016). Determination of Metabolic Viability and Cell Mass Using a Tandem Resazurin/Sulforhodamine B Assay. *Curr Protoc Toxicol*, *68*, 2 24 21-22 24 15. doi:10.1002/cptx.1
- Skakkebaek, N. E., Berthelsen, J. G., Giwercman, A., & Muller, J. (1987). Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl*, *10*(1), 19-28. doi:10.1111/j.1365-2605.1987.tb00161.x
- Skrivergaard, S., Rasmussen, M. K., Therkildsen, M., & Young, J. F. (2021). Bovine Satellite Cells Isolated after 2 and 5 Days of Tissue Storage Maintain the Proliferative and Myogenic Capacity Needed for Cultured Meat Production. *Int J Mol Sci*, *22*(16). doi:10.3390/ijms22168376
- Smirnova, E., Shurland, D. L., Ryazantsev, S. N., & van der Bliek, A. M. (1998). A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol*, *143*(2), 351-358. doi:10.1083/jcb.143.2.351
- Solozobova, V., Rolletschek, A., & Blattner, C. (2009). Nuclear accumulation and activation of p53 in embryonic stem cells after DNA damage. *BMC Cell Biol*, *10*, 46. doi:10.1186/1471-2121-10-46

- Soonpaa, M. H., Koh, G. Y., Klug, M. G., & Field, L. J. (1994). Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science*, *264*(5155), 98-101. doi:10.1126/science.8140423
- Sousa-Victor, P., Garcia-Prat, L., Serrano, A. L., Perdiguero, E., & Munoz-Canoves, P. (2015). Muscle stem cell aging: regulation and rejuvenation. *Trends Endocrinol Metab*, *26*(6), 287-296. doi:10.1016/j.tem.2015.03.006
- Southwood, C. M., Fytkolodziej, B., Maheras, K. J., Garshott, D. M., Estill, M., Fribley, A. M., & Gow, A. (2016). Overexpression of CHOP in Myelinating Cells Does Not Confer a Significant Phenotype under Normal or Metabolic Stress Conditions. *J Neurosci*, *36*(25), 6803-6819. doi:10.1523/JNEUROSCI.1118-15.2016
- T. Pastor Navarro, M. B.-C., E. Fornas-Buil LM. Moratalla-Charcos, JM. Osca-García, M. Gil-Salom. (2010). Stem cells and regenerative medicine in urology, part 2: Urothelium, urinary bladder, urethra and prostate. *Actas Urológicas Españolas*, *34*(7), 592-597.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, *131*(5), 861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
- Taylor, W. R., & Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, *20*(15), 1803-1815. doi:10.1038/sj.onc.1204252
- Thacker, J. S., Yeung, D. H., Staines, W. R., & Mielke, J. G. (2016). Total protein or high-abundance protein: Which offers the best loading control for Western blotting? *Anal Biochem*, *496*, 76-78. doi:10.1016/j.ab.2015.11.022
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, *282*(5391), 1145-1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145
- Tomita, S., Li, R. K., Weisel, R. D., Mickle, D. A., Kim, E. J., Sakai, T., & Jia, Z. Q. (1999). Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*, *100*(19 Suppl), II247-256. doi:10.1161/01.cir.100.suppl_2.ii-247
- Uchida, K., Kudo, T., Suzuki, K. I., & Nakase, T. (1999). A new rapid method of glycolate test by diethyl ether extraction, which is applicable to a small amount of bacterial cells of less than one milligram. *J Gen Appl Microbiol*, *45*(2), 49-56. doi:10.2323/jgam.45.49
- Valko, P. P., & Amini, S. . (2007). The method of distributed volumetric sources for calculating the transient and pseudosteady-state productivity of complex well-fracture configurations. *In SPE Hydraulic Fracturing Technology Conference*.
- van der Heyden, M. A., & Defize, L. H. (2003). Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation. *Cardiovasc Res*, *58*(2), 292-302. doi:10.1016/s0008-6363(02)00771-x
- Veeramani, S., Yuan, T. C., Lin, F. F., & Lin, M. F. (2008). Mitochondrial redox signaling by p66Shc is involved in regulating androgenic growth stimulation of human prostate cancer cells. *Oncogene*, *27*(37), 5057-5068. doi:10.1038/onc.2008.143
- Vega-Naredo, I., Caballero, B., Sierra, V., Garcia-Macia, M., de Gonzalo-Calvo, D., Oliveira, P. J., . . . Coto-Montes, A. (2012). Melatonin modulates autophagy through a redox-mediated action in female Syrian hamster Harderian gland controlling cell types and gland activity. *J Pineal Res*, *52*(1), 80-92. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00922.x
- Vega-Naredo, I., Loureiro, R., Mesquita, K. A., Barbosa, I. A., Tavares, L. C., Branco, A. F., . . . Oliveira, P. J. (2014). Mitochondrial metabolism directs stemness and differentiation in P19 embryonal carcinoma stem cells. *Cell Death Differ*, *21*(10), 1560-1574. doi:10.1038/cdd.2014.66
- Vega-Naredo, I., Poeggeler, B., Sierra-Sanchez, V., Caballero, B., Tomas-Zapico, C., Alvarez-Garcia, O., . . . Coto-Montes, A. (2005). Melatonin neutralizes neurotoxicity induced by quinolinic acid in brain tissue culture. *J Pineal Res*, *39*(3), 266-275. doi:10.1111/j.1600-079X.2005.00243.x

- von Gall, C., Stehle, J. H., & Weaver, D. R. (2002). Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res*, 309(1), 151-162. doi:10.1007/s00441-002-0581-4
- Wang, L., Piao, Y., Zhang, D., Feng, W., Wang, C., Cui, X., . . . Zheng, G. (2022). Fbxw11 impairs the repopulation capacity of hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cell Res Ther*, 13(1), 245. doi:10.1186/s13287-022-02926-9
- Ward, P. S., & Thompson, C. B. (2012). Signaling in control of cell growth and metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(7), a006783. doi:10.1101/cshperspect.a006783
- Watkins, J., Basu, S., & Bogenhagen, D. F. (2008). A quantitative proteomic analysis of mitochondrial participation in p19 cell neuronal differentiation. *J Proteome Res*, 7(1), 328-338. doi:10.1021/pr070300g
- Wei, Y. H., & Lee, H. C. (2002). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med (Maywood)*, 227(9), 671-682. doi:10.1177/153537020222700901
- Xiang, X., Zhao, J., Xu, G., Li, Y., & Zhang, W. (2011). mTOR and the differentiation of mesenchymal stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 43(7), 501-510. doi:10.1093/abbs/gmr041
- Yaffe, D., & Saxel, O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270(5639), 725-727. doi:10.1038/270725a0
- Yang, F., Yang, L., Li, Y., Yan, G., Feng, C., Liu, T., . . . Cai, B. (2017). Melatonin protects bone marrow mesenchymal stem cells against iron overload-induced aberrant differentiation and senescence. *J Pineal Res*, 63(3). doi:10.1111/jpi.12422
- Yang, Y., Cheung, H. H., Tu, J., Miu, K. K., & Chan, W. Y. (2016). New insights into the unfolded protein response in stem cells. *Oncotarget*, 7(33), 54010-54027. doi:10.18632/oncotarget.9833
- Yoon, C., Lu, J., Yi, B. C., Chang, K. K., Simon, M. C., Ryeom, S., & Yoon, S. S. (2021). PI3K/Akt pathway and Nanog maintain cancer stem cells in sarcomas. *Oncogenesis*, 10(1), 12. doi:10.1038/s41389-020-00300-z
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., & Mori, K. (2000). ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, 20(18), 6755-6767. doi:10.1128/MCB.20.18.6755-6767.2000
- Yu, J. S., & Cui, W. (2016). Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development*, 143(17), 3050-3060. doi:10.1242/dev.137075
- Zammit, P. S., Relaix, F., Nagata, Y., Ruiz, A. P., Collins, C. A., Partridge, T. A., & Beauchamp, J. R. (2006). Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci*, 119(Pt 9), 1824-1832. doi:10.1242/jcs.02908
- Zhang, H., Li, X., Liu, J., Lin, X., Pei, L., Boyce, B. F., & Xing, L. (2022). Proteasome inhibition-enhanced fracture repair is associated with increased mesenchymal progenitor cells in mice. *PLoS One*, 17(2), e0263839. doi:10.1371/journal.pone.0263839
- Zhang, S., Readinger, J. A., DuBois, W., Janka-Junttila, M., Robinson, R., Pruitt, M., . . . Mock, B. A. (2011). Constitutive reductions in mTOR alter cell size, immune cell development, and antibody production. *Blood*, 117(4), 1228-1238. doi:10.1182/blood-2010-05-287821
- Zhang, X., Stojkovic, P., Przyborski, S., Cooke, M., Armstrong, L., Lako, M., & Stojkovic, M. (2006). Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. *Stem Cells*, 24(12), 2669-2676. doi:10.1634/stemcells.2006-0377