



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**INMORTALIZACIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES DE
HUMANO Y LOBO MARINO DE CALIFORNIA (*Zalophus
californianus*): EFECTO EN LOS INDICADORES DE ESTRÉS
OXIDATIVO.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biología Marina)

P r e s e n t a

Andrea Carolina Murillo Cisneros

La Paz, Baja California Sur, enero de 2025.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:30 pm horas del día 9 del Mes de enero del 2025, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Inmortalización de células musculares de humano y lobo marino de California (*Zalophus californianus*): Efecto en los indicadores de estrés oxidativo"

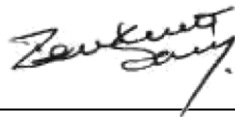
Presentada por el alumno:

Andrea Carolina Murillo Cisneros

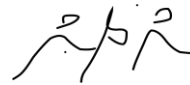
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biología Marina**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



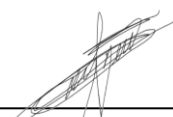
Dra. Tania Zenteno Savín
Directora de tesis



Dr. Ramón Gaxiola Robles
Co-Tutor de Tesis



Dra. Claudia Hernández Camacho
Co-Tutora de Tesis



Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril
Co-Tutora de Tesis



Dra. Alejandra Nieto Garibay,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



La Paz, Baja California Sur, a 9 de enero de 2025

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Andrea Carolina Murillo Cisneros del Programa de Maestría en Ciencias en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio: iThenticate
- Filtros utilizados:
Excluir citas y bibliografías
Excluir coincidencias inferiores a 15 palabras
Excluir material y métodos
- Porcentajes de similitud:
Máximo 20% para tesis
Posgrado Se muestra
captura de pantalla

Inmortalización de células musculares de humano y lobo marino de California (*Zalophus californianus*): Efecto en los indicadores de estrés oxidativo

INFORME DE ORIGINALIDAD

11%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	cibnor.repositorioinstitucional.mx Internet	2260 palabras — 9%
2	hdl.handle.net Internet	145 palabras — 1%
3	www.uv.mx Internet	34 palabras — < 1%
4	doczz.es Internet	28 palabras — < 1%
5	www.repositoriodigital.ipn.mx Internet	23 palabras — < 1%
6	www.coursehero.com Internet	22 palabras — < 1%
7	teses.usp.br Internet	21 palabras — < 1%
8	www.cibnor.gob.mx Internet	20 palabras — < 1%
9	dokumen.pub Internet	19 palabras — < 1%

Firmas del Director

Dra. Tania Zenteno Savín

Estudiante

Andrea Carolina Murillo Cisneros

Personal técnico de asesoría en el análisis

Ana María Talamantes Cota

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Tania Zenteno Savín
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.,
Directora de Tesis

Dr. Ramón Gaxiola Robles
Instituto Mexicano del Seguro Social, La Paz, B.C.S.
Co-Tutor de Tesis

Dra. Claudia Janetl Hernández Camacho
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas -IPN
Co-Tutora de Tesis

Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.,
Co-Tutora de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Tania Zenteno Savín
Dr. Ramón Gaxiola Robles
Dra. Claudia Janetl Hernández Camacho
Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril

Jurado de Examen

Dra. Tania Zenteno Savín
Dr. Ramón Gaxiola Robles
Dra. Claudia Janetl Hernández Camacho

Suplente

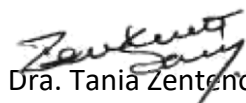
Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril

Resumen

Los mamíferos marinos experimentan ciclos de isquemia y reperfusión tisular durante el buceo, lo cual eleva la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y puede llevar a un estado de estrés oxidativo. Gracias a una mayor actividad de las defensas antioxidantes, en comparación con mamíferos terrestres, los mamíferos marinos pueden hacer frente al estrés oxidativo derivado de la isquemia/reperfusión asociada al buceo en apnea. Para avanzar en el estudio de las adaptaciones de mamíferos marinos a condiciones que en mamíferos terrestres conllevan a daño oxidativo, la disponibilidad de células con replicación ilimitada, como los cultivos inmortalizados, podría acelerar significativamente la investigación. La inmortalización celular, prolongación potencialmente infinita de la vida celular, podría facilitar estudios sobre estas adaptaciones. El antígeno T grande del virus de simio 40 (SV40 LT) es una oncoproteína viral que inactiva proteínas regulatorias del ciclo celular, tales como p53 y Rb, y se ha utilizado para inmortalizar células. En este estudio se utilizó SV40 LT para transfectar células musculares de lobo marino de California y humano, se usó puromicina para seleccionar las células inmortalizadas y se analizaron los indicadores de estrés oxidativo para evaluar el efecto. Aunque la transfección fue exitosa en ambas especies, las células presentaron anomalías morfológicas, períodos variables de viabilidad y muerte celular. Posterior a la transfección, debido a la escasa biomasa, sólo fue posible cuantificar los indicadores de estrés oxidativo en los cultivos de lobo marino de California. La actividad de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión S-transferasa (GST) aumentó significativamente (2 y 6.1 veces, respectivamente) en comparación con las células mantenidas bajo condiciones control. En cambio, la actividad de catalasa (CAT) fue mayor en células control (6.9 veces) que en las células transfectadas. Además, el daño oxidativo a proteínas fue significativamente mayor en células transfectadas (3.9 veces) que en las células control. Estos resultados sugieren una acumulación progresiva de peróxido (H_2O_2), probablemente derivada de un efecto genotóxico provocado por la transfección. Ello podría contribuir a la activación de vías de muerte celular, como apoptosis y necrosis, ya que se observó la pérdida completa del cultivo celular a los 50 días posteriores a la exposición a puromicina. Las células humanas, con menor capacidad antioxidante, parecieron llegar a una saturación temprana de defensas y un deterioro más rápido. Los resultados sugieren que la transfección directa con SV40 LT induce estrés genotóxico en células derivadas de músculo esquelético de humano y lobo marino de California, impidiendo la inmortalización celular. Se propone, para estudios futuros, la co-transfección de SV40 LT con hTERT como estrategia más efectiva para la inmortalización celular. Además, el uso de sistemas de transfección basados en lentivirus podría mejorar la eficacia del proceso. Este estudio aporta conocimiento relevante sobre las limitaciones actuales y las posibles mejoras en la generación de líneas celulares inmortalizadas a partir de células musculares de mamíferos terrestres y marinos.

Palabras Claves: Antígeno T, cultivo celular, H_2O_2 , SV40 LT, transformación celular.

ORCID iD: 0009-0009-2570-8359

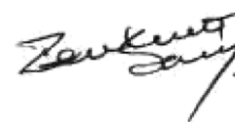

Vo. Bo. Dra. Tania Zenteno Savín
Directora de Tesis

Summary

Marine mammals experience cycles of tissue ischemia and reperfusion during diving, which increases the production of reactive oxygen species (ROS) and can lead to oxidative stress. Thanks to greater antioxidant defense activity compared to terrestrial mammals, marine mammals can cope with oxidative stress caused by ischemia/reperfusion associated with apnea diving. To advance the study of marine mammal adaptations to conditions that lead to oxidative damage in terrestrial mammals, the availability of cells with unlimited replication potential, such as immortalized cell cultures, could significantly accelerate research. Cellular immortalization, the potentially infinite extension of cellular lifespan, could facilitate studies on these adaptations. Simian virus 40 large T antigen (SV40 LT) is a viral oncoprotein that inactivates cell cycle regulatory proteins, such as p53 and Rb, and has been used to immortalize cells. In this study, SV40 LT was used to transfect cells derived from skeletal muscle from California sea lions and humans. Puromycin was used to select immortalized cells, and oxidative stress indicators were analyzed to evaluate the effect. Although transfection was successful in both species, cells exhibited morphological abnormalities, variable viability periods, and eventual cell death. Following transfection, due to limited biomass, it was only possible to quantify oxidative stress indicators in the California sea lion cultures. The activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GST) increased significantly (2- and 6.1-fold, respectively) compared to cells maintained under control conditions. Conversely, catalase (CAT) activity was higher in control cells (6.9-fold) than in transfected cells. Additionally, oxidative damage to proteins was significantly higher in transfected cells (3.9-fold) compared to control cells. These results suggest a progressive accumulation of peroxide (H_2O_2), likely caused by a genotoxic effect induced by transfection. This accumulation could contribute to the activation of cell death pathways, such as apoptosis and necrosis, as complete loss of the cell culture was observed 50 days after puromycin exposure. Human cells, with a lower antioxidant capacity, seemed to reach an early saturation of defenses and a more rapid decline. The results suggest that direct transfection with SV40 LT induces genotoxic stress in skeletal muscle-derived cells from humans and California sea lions, preventing cellular immortalization. For future studies, the co-transfection of SV40 LT with hTERT is proposed as a more effective strategy for cellular immortalization. Additionally, the use of lentivirus-based transfection systems could improve the efficiency of the process. This study provides relevant insights into the current limitations and potential improvements in generating immortalized cell lines from muscle cells of terrestrial and marine mammals.

Keywords: T antigen, cell culture, H_2O_2 , SV40 LT, cellular transformation.

ORCID iD: 0009-0009-2570-8359



Vo. Bo. Dra. Tania Zenteno Savín
Directora de Tesis

Dedicatoria

A la pequeña Andrea, que se sentía diminuta e insuficiente. Eres más de lo que imaginas.

A mi hermana Hanny, que siempre ha sido mi ejemplo a seguir, mi mejor amiga y mi luz en la noche oscura.

A mi familia, porque no sería quien soy sin mi madre y mi padre, cuyo amor incondicional y enseñanzas han sido mi cimiento.

A mi amorcini, por ser la calma en mi tormenta, la brisa de aire fresco cuando siento que me estoy ahogando.

Y, por último, a mis chimbilines. Por ser esos sabios maestros gatunos que, con su ronroneo y cariño, me enseñaron a amar en libertad y fluir con la vida.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), al igual que a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por brindarme la oportunidad, el apoyo y los recursos necesarios para llevar a cabo mi maestría durante estos dos años y medio.

Gracias al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyt) por la beca otorgada con número 828011, que fue fundamental para la culminación de este proyecto.

Mi agradecimiento especial va para mi comité tutorial, en particular a mi directora, Dra. Tania Zenteno, y también a los doctores Martha Reyes Becerril, Claudia Hernández Camacho y Ramón Gaxiola Robles, por aceptar guiarme, compartir su conocimiento y enseñarme valiosas lecciones. Aprecio profundamente su paciencia, tiempo y dedicación hacia mi proyecto.

Al técnico de Laboratorio de Estrés Oxidativo, Orlando Lugo, por el invaluable apoyo a lo largo del tiempo desde enseñarme desde cero como es el trabajo de laboratorio, y siempre brindarme del espacio equipo y material necesario para el cultivo celular. No sé qué hubiera hecho sin ti (probablemente matar cultivos por accidente e incendiar el laboratorio).

Al equipo de trabajo en campo, principalmente Taryn, Hanny, Dra. Claudia y el Capi Javier, por las ricas comidas, las risas, los chismes y la buena compañía. Las largas jornadas en campo por siempre serán de mis recuerdos más preciados de esta fase de mi vida.

A mis compañeros del laboratorio de Estrés Oxidativo, gracias por ayudarme a crecer académicamente con sus consejos y críticas constructivas, y por ampliar mi perspectiva.

Al laboratorio de Inmunología y Vacunología, por facilitarme el espacio y materiales necesarios para el crecimiento de cultivos bacterianos y la extracción de ADN plasmídico. Y un especial agradecimiento a Hassian León Montoya por su tiempo y paciencia en esta parte del proyecto.

A mi familia, a mi mamá y papá, mis hermanas Hanny y Melisa, Fabián, Mariana y Emilio, por el apoyo, las risas, los consejos, el amor y la comprensión. Ustedes me dieron el impulso para ir cada vez más lejos y una parte inseparable de mi ser por siempre.

A Hanny, por darme un hogar cuando más lo necesité, por ser mi roca y una de mis personas favoritas en el universo. Vivir la vida a tu lado es y será siempre un placer

A mi amorcini, agradezco infinitamente haberme topado contigo en mi primera semana de posgrado. Enamorarme de ti fue como respirar por primera vez: natural, esencial. Gracias por el hogar que estamos construyendo juntos, con nuestros chimbilines y nuestras pequeñas aventuras diarias

A mis gathijos, Simba y Artemis. Especialmente Simba, por ser mi apoyo cuando sentía que ya no podía más con esta vida. A ambos, por siempre llegar a mi cuando más lo necesito.

A las amistades que forme en CIBNOR, por las risas, vivencias, chismes y momentos a su lado. Hicieron mis días más divertidos y emocionantes. A María, Josh, Dante, Nat, Victor, Lau, Pollo y Cindy, por tener la fortuna de llamarlos mis amigos.

Finalmente, gracias a todos aquellos que me apoyaron en esta etapa de mi vida, aunque sus nombres no aparezcan aquí. Su influencia y cariño dejaron huella en mí.

Gracias, universo, por enseñarme a celebrar mis logros, a conectar con mis seres queridos, y a encontrar resiliencia en las dificultades. GRACIAS.

“La mejor manera de conocer la vida es amando muchas cosas”

-Van Gogh

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido.....	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi
Abreviaturas	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cultivo celular.....	1
1.2 Inmortalización de células.....	1
1.3 Estrés oxidativo	3
1.4 Estrés oxidativo en mamíferos marinos.....	5
2. ANTECEDENTES	8
2.1 Generación de líneas celulares inmortales	8
2.2 Estrés oxidativo en mamíferos marinos y terrestres	11
2.3 Estrés oxidativo e inmortalización celular	13
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo General	17
5.2 Objetivos particulares	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS	18
6.1 Colecta de muestra	18
6.2 Siembra y mantenimiento de cultivo celulares	19
6.2.1 Viabilidad celular	21
6.3 Inmortalización de líneas celulares.....	22
6.3.1 Preparación del plásmido pBABE-puro SV40LT	22
6.3.2 Extracción y cuantificación de ADN plasmídico	23
6.4 Transfección de células derivadas de músculo esquelético con plásmido y perfil de citotoxicidad	24
6.5 Análisis de indicadores de estrés oxidativo	26
6.5.1 Producción de radical superóxido en células derivadas de músculo esquelético de <i>Homo sapiens</i> y <i>Zalophus californianus</i>	26
6.5.2 Daño oxidativo en células derivadas de músculo esquelético de <i>Homo sapiens</i> y <i>Zalophus californianus</i>	27
6.5.3 Defensas antioxidantes en células derivadas de músculo esquelético de <i>Homo sapiens</i> y <i>Zalophus californianus</i>	28
6.5.4 Proteínas totales.....	30
6.6 Análisis estadísticos	30
7. RESULTADOS	32
7.1 Establecimiento de cultivos celulares primario	32
7.2 Extracción de ADN plasmídico pBABE	34
7.3 Prueba de citotoxicidad con puromicina	34
7.3.1 Lobo marino de California	34

7.3.2 Humano	37
7. 4 Transfección de células derivadas de músculo esquelético	40
7.4.1 Lobo marino de California	40
7.4.2 Humano	43
7.5 Análisis de indicadores de estrés oxidativo en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>)	45
7.5.1 Producción de O ₂ ^{•-} y daño oxidativo	46
7.5.2 Defensas antioxidantes	
7.6 Análisis de indicadores de estrés oxidativo en células derivadas de músculo esquelético de humano (<i>Homo sapiens</i>)	48
7.6.1 Producción de O ₂ ^{•-} y daño oxidativo	48
7.6.2 Defensas antioxidantes	48
7.7 Comparación entre especies.....	49
7.7.1 Producción de O ₂ ^{•-} y daño oxidativo en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California y humano	49
7.7.2 Defensas antioxidantes	50
8.DISCUSIÓN	52
8.1 Determinación de dosis y tiempo de exposición de puromicina.....	52
8.2 Transfección de células derivadas de músculo esquelético de humano y de lobo marino de California.....	54
8.3 Indicadores de estrés oxidativo en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>) y humano (<i>Homo sapiens</i>) en respuesta a la transfección.....	59
9. CONCLUSIONES	66
10. LITERATURA CITADA	68

Lista de figuras

Figura 1. Plásmido pBABE-puro SV40 LT (tomado de Addgene.org).....	23
Figura 2. Esquema de la metodología aplicada para la transfección en células musculares de mamíferos a partir de plásmido comercial pBABE-puro (Addgene) (creado con BioRender.com)	25
Figura 3. Esquema del protocolo experimental para evaluar la supervivencia celular en respuesta a la incubación con diferentes concentraciones de puromicina. El proceso comienza con la siembra de las células el Día 0. En el Día 1, se aplican tratamientos con cinco concentraciones diferentes de puromicina, desde 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ hasta 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los días 2, 3, 5, 6, 7 están dedicados al recambio y monitoreo de las células; y los días 5, 7 y 10 se analiza la viabilidad celular.	26
Figura 4. Fotografías del cultivo primario de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>) en condiciones control. A) Cultivo primario a un mes desde la siembra con tejido (T) visible, 10X); B) células derivadas de músculo esquelético en pase 3 donde se aprecian células musculares (CM) con núcleos (N) bien formados, células satélite (CS) y células diferenciándose (CD), observación a 20X; C) cultivo a 70% de confluencia, 10X; D) cultivo a 100% de confluencia, a 10X..	32
Figura 5. Fotografías del cultivo primario de células derivadas de músculo esquelético de humano (<i>Homo sapiens</i>) en condiciones control. A) Cultivo primario a las dos semanas desde la siembra, observación a 10X); B) células musculares en pase 1, confluencia de 25%, observación a 10X; C) cultivo en pase 1, a 60% de confluencia, 10X; D) cultivo en pase 3, a 100% de confluencia, observación a 10X	33
Figura 6. Microfotografía del cultivo primario de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>) expuesto a 0.5 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$. Observación a 40X. CS, célula satélite; CA, células en aparente proceso de apoptosis.....	35
Figura 7. Fotografías del cultivo primario de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>). Observaciones a los 6 y 9 días de exposición a puromicina. A) Control (sin puromicina); B) 0.25 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$; C) 0.5 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$; D) 0.75 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$. Observación a 10X..	36
Figura 8. (A) Viabilidad celular y (B) confluencia del cultivo primario de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>) tras la exposición a diferentes concentraciones de puromicina durante 12 días. La letra K después de la cifra representa miles	36
Figura 9. Fotografías del cultivo primario de células derivadas de músculo esquelético de humano (<i>Homo sapiens</i>). Observaciones a los 0, 1 y 3 días de exposición a A) 0.25 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$ B) 0.5 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$, y C)1 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$ puromicina. Observación a 10X	38
Figura 10. Fotografías del cultivo primario de células derivadas de músculo esquelético de humano (<i>Homo sapiens</i>) Observaciones a los 4, 7 y 11 días de exposición a A) 0 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$; B) 0.25 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$; C)0.5 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$; D) 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ puromicina. Observación a 10X.	39
Figura 11. (A) Viabilidad celular y (B) confluencia del cultivo primario de células derivadas de músculo esquelético de humano (<i>Homo sapiens</i>) expuestas a diferentes concentraciones de puromicina por 11 días. La letra K después de la cifra representa miles	39
Figura 12. A) Células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>) transfectadas y en el último día de exposición a 1 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$. B) Células	

- derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California transfectadas y a los 7 días de mantenimiento después de exposición a $1 \mu\text{g puromicina mL}^{-1}$. Observación a 10X... 41
- Figura 13.** A) Células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) transfectadas, dos semanas (14 días) posterior a la exposición a $1 \mu\text{g puromicina mL}^{-1}$; se observa confluencia al 65%. B) Células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California transfectadas, tres semanas (21 días) posterior a la exposición a $1 \mu\text{g puromicina mL}^{-1}$, la confluencia se mantuvo a 65%. C) Células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California transfectadas 24 días posterior a la exposición a $1 \mu\text{g puromicina mL}^{-1}$; se observa disminución de la confluencia a 40%. Observación a 10X. 41
- Figura 14.** Células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) transfectadas a 42 días de haber terminado la exposición con puromicina. A) Confluencia $< 10\%$; observación a 10X. B) Aparente desecho celular (DC); observación a 20X. C) Cuerpos extraños o micronúcleos (M); observación a 40X.. 42
- Figura 15.** A) Células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) transfectadas a 47 días del término de la exposición a puromicina. B) Cultivo 3 días después de la foto anterior (50 días desde la exposición a puromicina). Observación a 10X..... 42
- Figura 16.** Células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) transfectadas. M, cuerpos extraños o micronúcleos; DC, desecho celular. Observación a 40X. 43
- Figura 17.** Células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*) en el primer ensayo de transfección. A) Previo a la exposición a puromicina; B) 1 día después de la exposición a $1 \mu\text{g puromicina mL}^{-1}$; C) 5 días después de la exposición a $1 \mu\text{g puromicina mL}^{-1}$. Observaciones a 10X..... 44
- Figura 18.** Células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*) en el segundo ensayo de transfección. A) Día de la transfección, 10X; B) Antes del tratamiento con puromicina y posterior a la transfección, las flechas marcan las células con la apariencia de rupturas en citoplasma, 10x; C) Antes del tratamiento con puromicina y posterior a la transfección, 40X; D) Cultivo en el tercer día de exposición a $1 \mu\text{g puromicina mL}^{-1}$, 10X; E) Cultivo en el séptimo día de exposición a $1 \mu\text{g puromicina mL}^{-1}$, 10X; F) 20 días posteriores al tratamiento con puromicina. M, cuerpos extraños o micronúcleos, R, apariencia de ruptura en el citoplasma 44
- Figura 19.** Células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*) en el segundo ensayo de transfección. Antes del tratamiento con puromicina y posterior a la transfección. A) 10x, 10X; B) 20X. DC, *debris celular*, R, apariencia de rupturas en el citoplasma. 45
- Figura 20.** A) Producción de radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$, $\mu\text{moles mg}^{-1}$ de proteína min^{-1}) y B) concentración de carbonilos proteícos ($\mu\text{moles mg}^{-1}$ de proteína) en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) mantenidas en condiciones control y después de ser transfectadas con SV40 LT. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. *Denota diferencias significativas ($p < 0.05$). 46
- Figura 21.** Actividad (unidades mg^{-1} de proteína) de A) SOD, superóxido dismutasa, B) CAT, catalasa, C) GPx, glutatión peroxidasa, D) GR, glutatión reductasa, E) GST, glutatión S-transferasa en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) en condiciones control y después de ser transfectadas con SV40 LT. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. *Denota diferencias significativas ($p < 0.05$) 47
- Figura 22.** A) Producción de radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$, $\mu\text{moles mg}^{-1}$ de proteína min^{-1}) y B) concentración de carbonilos proteícos ($\mu\text{moles mg}^{-1}$ de proteína) en células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*)

mantenidas bajo condiciones control. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar.
*Denota diferencias significativas ($p < 0.05$)..... 50

Figura 23. Actividad (unidades mg-1 de proteína) de A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT), C) glutatión peroxidasa (GPx), D) glutatión reductasa (GR), E) glutatión S-transferasa (GST) en células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) mantenidas bajo condiciones control. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. *Denota diferencias significativas ($p < 0.05$)..... 51

Lista de tablas

Tabla 1. Concentraciones y tasas de absorbancia de las extracciones de ADN plasmídico con SV40 LT. Las concentraciones se midieron en microgramos por mililitro ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Las tasas de absorbancia se midieron a longitudes de onda de 260/280 nm y 260/230 nm, que son comúnmente utilizadas para evaluar la pureza del ADN. La relación de absorbancia ideal para sugerir pureza en el ADN extraído es ~ 1.8 . El valor marcado con un asterisco (*) indica una posible contaminación; esta muestra no fue usada en la transfección.....	34
Tabla 2. Número de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>) viables después de la exposición a distintas concentraciones de puromicina por 12 días. Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar...	37
Tabla 3. Número de células derivadas de músculo esquelético de humano (<i>Homo sapiens</i>) viables expuestas a distintas concentraciones de puromicina por 11 días. Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar	40
Tabla 4. Actividad de enzimas antioxidantes en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>) bajo condiciones de cultivo primario o control y después de ser transfectadas con SV40 LT. La actividad enzimática se expresa en unidades por miligramo de proteína	47
Tabla 5. Producción de radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$, $\mu\text{moles mg}^{-1}$ de proteína min^{-1}) y concentración de carbonilos proteicos ($\mu\text{moles mg}^{-1}$ de proteína) en células derivadas de músculo esquelético de humano (<i>Homo sapiens</i>) mantenidas bajo condiciones control. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar	48
Tabla 6. Actividad de las enzimas antioxidantes en células derivadas de músculo esquelético de humano (<i>Homo sapiens</i>) mantenidas bajo condiciones control. La actividad enzimática se expresa en unidades por miligramo de proteína	49
Tabla 7. Comparación bibliográfica de diversos vectores y métodos utilizados en el proceso de inmortalización celular en diversas especies y líneas celulares de mamíferos	57

Abreviaturas

- **$^1\text{O}_2$** Oxígeno singulete.
- **ADN** Ácido desoxirribonucleico.
- **ADNcr** ADN cromosómico.
- **ADNp** ADN plasmídico.
- **ARN** Ácido ribonucleico.
- **ATM** Ataxia-telangiectasia mutada; proteína quinasa de serina/treonina que se activa cuando hay daño en ácido desoxirribonucleico.
- **AP-1** Proteína activadora 1; está implicada en la regulación de la expresión de genes relacionados con las citocinas, factores de crecimiento, etc.
- **ATP** Adenosín trifosfato.
- **CAT** Catalasa.
- **CDNB** 1-Cloro 2, 4-dinitrobenceno.
- **CD11b** Integrina alfa M.
- **CMMS** Células madre mesenquimales.
- **dH₂O** Agua destilada.
- **DDR** respuesta de daño en ADN o “DNA-damage response”.
- **DNPH** Dinitrofenil hidrazina.
- **DM** Distrofia miotónica
- **EDTA** Ácido etilendiaminotetraacético.
- **ERO** Especies reactivas de oxígeno.
- **ERN** Especies reactivas de nitrógeno.
- **FD** Factor de dilución.
- **GM-CSF** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

- **GPx** Glutación peroxidasa.
- **GR** Glutación reductasa.
- **GSH** Glutación reducido.
- **GSSG** Glutación disulfuro (glutación oxidado).
- **GST** Glutación S-transferasa.
- **G6PDH** Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
- **HeLa** Primera línea celular inmortal humana, derivada de cáncer cérvico-uterino en 1951.
- **H₂O** Agua.
- **H₂O₂** Peróxido de hidrógeno.
- **HCl** Ácido clorhídrico.
- **HDM2** Proteína codificada por el gen homónimo; desempeña un papel fundamental en la regulación de la proteína p53; la sigla proviene del nombre en inglés “human double minute 2”.
- **hTERT** Telomerasa transcriptasa reversa.
- **HO[•]** Radical hidroxilo.
- **IL** Interleucinas.
- **iHAE** Células epiteliales amnióticas humanas inmortalizadas.
- **iHAM** Células mesenquimales amnióticas humanas inmortalizadas.
- **LB** Medio para cultivo celular “Luria Bertani”.
- **LPS** Lipopolisacáridos.
- **LT** Antígeno T grande.
- **MDA** Malondialdehído.
- **Mn-SOD** Superóxido dismutasa dependiente de manganeso.
- **NADPH** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

- **NaOH** Hidróxido de sodio.
- **NBT** Nitro azul de tetrazolio.
- **NFkB** Grupo de proteínas que ayudan a controlar muchas funciones en la célula, como el crecimiento y la supervivencia.
- **Nrf2** Factor nuclear eritroide 2.
- **NOX** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasas.
- **Nox4** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 4.
- **NQO1** Quinona oxidorreductasa.
- **O₂** Oxígeno molecular.
- **O₂^{•-}** Radical superóxido.
- **PARP-1** Poli(ADP-ribosa) polimerasa 1.
- **PBS** Solución salina amortiguada con fosfatos.
- **PCR** Reacción en cadena de la polimerasa; es una prueba de diagnóstico que permite detectar un fragmento del material genético de un patógeno.
- **POX** Prolina oxidasa.
- **P2RY12** Quimiorreceptor para adenosín difosfato en la superficie de las células de plaquetas sanguíneas.
- **P53** Gen supresor de tumores.
- **Rb** Retinoblastoma; proteína supresora de tumores.
- **SDS** Dodecilsulfato de sodio.
- **SOD** Superóxido dismutasa, enzima que cataliza la dismutación del radical superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno.
- **SV40 LT** Antígeno T grande del virus del simio 40.
- **TBA** Ácido tiobarbitúrico.
- **TBARS** Sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico. Se cuantifica su concentración como indicador del daño oxidativo a lípidos.

- **TGF β R** Factor de crecimiento transformante beta.
- **TNF- α** Factor de necrosis tumoral.
- **qPCR** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
- **VEB** Virus de Epstein-Barr.
- **VPH** Virus del papiloma humano.
- **XDH** Xantina deshidrogenasa.
- **XO** Xantina oxidasa.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cultivo celular

El cultivo celular se refiere a técnicas que permiten mantener células en condiciones *in vitro*, conservando sus características bioquímicas, fisiológicas y genéticas (Castaño, 2008). Estas técnicas han permitido abordar interrogantes sobre diversos tipos de células, producción de proteínas y respuestas a fármacos (Obinata, 2001). Además, el cultivo celular permite la producción de moléculas para validar modelos animales a menor costo y tiempo (Mouly *et al.*, 2005; Mamchaoui *et al.*, 2011). Por ello, es esencial en áreas como genómica, proteómica y farmacología (Keehan *et al.*, 1990; Freshney, 2010; Halliwell, 2014; Yao y Asayama, 2017). No obstante, las células en cultivos primarios tienen un número finito de divisiones antes de entrar en senescencia, lo que restringe su utilidad para bioensayos (Ozer *et al.*, 1996; Stewart y Weinberg, 2002; Freshney, 2010; Carter y Shieh, 2015). Adicionalmente, la variabilidad en la pureza y los cambios fenotípicos durante la amplificación *in vitro* son factores limitantes (Mamchaoui *et al.*, 2011; Carter y Shieh, 2015). La inmortalización celular se busca como alternativa para maximizar su utilidad y minimizar costos, asegurando que las células conserven sus funciones y propiedades fisiológicas, así como que perduren con menos cuidados (Obinata, 2001; Carter y Shieh, 2015).

1.2 Inmortalización de células

La inmortalización celular implica prolongar la vida de las células, potencialmente, de forma infinita (Freshney, 2010). Este proceso desactiva genes supresores de tumores como retinoblastoma (Rb), p53 y p16, impulsando la inestabilidad genómica y fomenta mutaciones que favorecen la inmortalización (Hara *et al.*, 1991; Shay *et al.*, 1991b; Freshney, 2010; Piñeiro-Ramil, 2020). Esto permite que la división celular continúe más allá de la senescencia (Maqsood *et al.*, 2013). La senescencia está controlada por unos 10 genes que interactúan para ejercer retroalimentación negativa en el ciclo celular (Wright *et al.*, 1989; Katakua *et al.*, 1998; Freshney, 2010). La delección, mutación o sobreexpresión de estos genes puede permitir que las células evadan el control negativo del ciclo y se vuelvan inmortales (Tevethia y Ozer, 2001; Freshney, 2010).

En presencia de daño al ADN, niveles bajos de suero *in vitro* o alta densidad celular, Rb se hipofosforila, activando la cascada de señalización que conduce a la apoptosis (DeCaprio *et al.*, 1989; Morales *et al.*, 1999). Rb interactúa con p107 y p130 para secuestrar factores de transcripción (E2F) y suprimir genes necesarios para la síntesis de ADN, metabolismo y ciclo celular (Brehm *et al.*, 1998; Welcker y Clurman, 2005; Engeland, 2022). El p53 es un factor de transcripción supresor de tumores, que participa en la reparación del ADN y la apoptosis, aunque su función varía según el tipo celular (Ozer *et al.*, 1996; Zaika *et al.*, 2015; Engeland, 2022). En circunstancias normales, p53 se une al promotor de *human double minute 2 (HDM2)*, que estimula su transcripción y resulta en la proteína HDM2, la cual degrada p53 (Zaika *et al.*, 2015; Piñeiro-Ramil, 2016). El daño al ADN provoca la fosforilación de p53, liberándolo de la proteína HDM2 y promoviendo la transcripción de genes relacionados con la senescencia o apoptosis (Shay *et al.*, 1991a; Zaika *et al.*, 2015; Piñeiro-Ramil, 2016).

Existen diversos métodos para immortalizar células, como el uso de genes virales (adenovirus E1a, virus del papiloma humano, virus de Epstein-Bar) o la retroexpresión de transcriptasa (hTERT) (Shay *et al.*, 1991a; Ozer *et al.*, 1996; Freshney, 2010; Massenet *et al.*, 2020; Piñeiro-Ramil *et al.*, 2023). Uno de los genes virales más utilizados para immortalizar células es el antígeno T grande del virus del simio 40 (SV40 LT) (Freshney, 2010). El antígeno T grande, una oncoproteína de 94 kDa y 708 aminoácidos, modula enzimas que influyen en la replicación viral, transcripción, transformación y síntesis de ARN (Wright *et al.*, 1989; Valls *et al.*, 2007; Freshney, 2010). Este antígeno interactúa específicamente con factores de regulación del ciclo celular, como p53, Rb, p107 y p130 (Ozer *et al.*, 1996; Lill *et al.*, 1997; Welcker y Clurman, 2005; Valls *et al.*, 2007; Engeland, 2022). Aunque SV40 ha sido asociado previamente con cáncer en humanos, la etiología tumorigénica no ha sido confirmada a nivel molecular (Rotondo *et al.* 2019).

Las líneas celulares inmortales proliferan más y ofrecen un cultivo más homogéneo (Van Der Haegen y Shay, 1993; Freshney, 2010; Carter y Shieh, 2015). No obstante, el proceso de immortalización puede conllevar cambios genotípicos inesperados debido a la inestabilidad genómica causada por aberraciones cromosómicas (Stewart y Bacchetti, 1991; Ozer *et al.*, 1996;

Mamchaoui *et al.*, 2011; Carter y Shieh, 2015). Esto puede resultar en la expresión de rasgos atípicos (Freshney, 2010; Piñeiro-Ramil, 2020).

1.3 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es el desbalance entre la producción de las especies reactivas y las defensas antioxidantes, favoreciendo a las primeras (Halliwell y Gutteridge, 1999). Esto genera daño oxidativo a moléculas como proteínas, ARN, ADN y lípidos (de Zwart *et al.*, 1999; Stadtman y Levine, 2000; Sies y Jones, 2017; Pioschi y Pop, 2015; Sies, 2015). Este desequilibrio puede surgir de una mayor producción de especies oxidantes, disminución de antioxidantes, o ambos (Birben *et al.*, 2012; Lichtenberg y Pinchuk, 2015; Pioschi y Pop, 2015).

Las especies reactivas son radicales libres y otros compuestos oxidantes que pueden causar daño oxidativo al interactuar con distintos componentes (Halliwell y Gutteridge, 1999; Sies y Jones, 2017; Lichtenberg y Pinchuk, 2015; Carvajal, 2019). Los radicales libres son inestables y reactivos debido a la presencia de un electrón no apareado que favorece las reacciones redox (Lichtenberg y Pinchuk, 2015; Carvajal, 2019). En sistemas biológicos, las especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) actúan como moléculas señalizadoras y regulan procesos de proliferación, apoptosis y expresión de genes (Lushchak yGospodaryov, 2012; Pioschi y Pop, 2015). Las ERO y ERN pueden resultar del metabolismo aeróbico o de la exposición a metales pesados, rayos ultravioleta, y otros factores externos (de Zwarts *et al.*, 1999; Díaz-Acosta y Membrillo-Hernández, 2006; Birben *et al.*, 2012).

Las principales ERO en sistemas biológicos son el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), del cual deriva el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La combinación de H_2O_2 con $O_2^{\cdot-}$ y/o con iones metálicos, mediante las reacciones de Haber-Weiss y Fenton, genera el radical hidroxilo ($\cdot OH$) (Halliwell y Gutteridge, 1999; Hermes-Lima *et al.*, 2001; Sies *et al.*, 2017). En exceso, estas moléculas pueden llevar al estrés oxidativo; pero en niveles moderados, las ERO funcionan como moléculas de señalización (Jagannathan *et al.*, 2017). El $O_2^{\cdot-}$ es producido por nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasas (NADPH oxidasas, NOX) como parte de la respuesta inmune y la señalización celular (Winterbourn, 2020). El H_2O_2 actúa en diversas cascadas de señalización y

puede migrar lejos del sitio de generación, interactuando con factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1), el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) y el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) (Oter *et al.*, 2012). Las ERN de mayor interés en sistemas biológicos son óxido nítrico (NO) y peroxinitrito (ONOO⁻) (Hermes-Lima y Zenteno-Savín, 2002; Birben *et al.*, 2012). Aumentos significativos en los niveles de ERO o ERN, sin una respuesta proporcional por parte del sistema antioxidante, pueden generar cambios en moléculas, células, órganos y tejidos. El daño oxidativo puede alterar las vías relacionadas con la embriogénesis, apoptosis, ciclo celular y función inmune (Jones, 2006). Así, el estrés oxidativo se vincula al envejecimiento y con diversas enfermedades (Nikinmaa *et al.*, 2011; Birben *et al.*, 2012).

Los antioxidantes son compuestos que retrasan o previenen la oxidación de sustratos, aún a concentraciones más bajas que éstos (Pioschi y Pop, 2015). Pueden ser enzimáticos o no enzimáticos, intervienen en la prevención y reparación del daño oxidativo inactivando o neutralizando ERO y ERN, restaurando ácidos nucleicos, eliminando proteínas oxidadas y/o reparando lípidos oxidados (Kurata *et al.*, 1993; Pioschi y Pop, 2015). La capacidad antioxidante depende del tipo celular, expresión génica, niveles de oxígeno, y señales exógenas (Sies *et al.*, 2017). Uno de los propósitos de las defensas antioxidantes en los sistemas biológicos es metabolizar las especies reactivas, como el oxígeno singulete (¹O₂), en el lugar de producción, o reducir el flujo de otras formas de ERO, por ejemplo, prevenir la formación de [•]OH, dado su alto grado de reactividad (Halliwell y Gutteridge, 1999; Lesser, 2011). En este sentido, la principal contribución la proporcionan los antioxidantes enzimáticos (Sies *et al.*, 2017). Éstos constituyen la primera defensa de las células e incluyen distintas isoformas de superóxido dismutasa (SOD) que se encargan de transformar el O₂^{•-} en H₂O₂; catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) que remueven H₂O₂ y limitan la formación de [•]OH; y glutatión S-transferasa (GST) que remueve xenobióticos y productos tóxicos del daño oxidativo por ERO (Kurata *et al.*, 1993; Halliwell y Gutteridge, 1999; Jones, 2006; Litchenberg y Pinchuk, 2015; Pioschi y Pop, 2015; Sies *et al.*, 2017).

Los antioxidantes no enzimáticos actúan como secuestradores de ERO o como sustratos y cofactores para antioxidantes enzimáticos; por ejemplo, el glutatión reducido (GSH) que elimina

el H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ y oxidantes clorados, actúa como cofactor de GPx (Halliwell y Gutteridge, 1999; Hermes-Lima *et al.*, 2001; Jones, 2006; Pioschi y Pop, 2015). En estas reacciones, GSH se oxida a glutatión disulfuro o glutatión oxidado (GSSG). Glutatión reductasa (GR), una de las enzimas auxiliares en la defensa antioxidante, recicla GSSG a GSH; glutatión sintetasa es la enzima clave en la síntesis de GSH, y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) provee el NADPH requerido para la función de GR (Hermes-Lima *et al.*, 2001; Sies *et al.*, 2017).

El estrés oxidativo participa en una amplia gama de enfermedades, incluidas la aterosclerosis (acumulación de grasas, colesterol y otras sustancias en las paredes de las arterias), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), sarcopenia (pérdida de masa y fuerza muscular), diabetes, e incluso depresión (Pham-Huy *et al.*, 2008; Baraibar *et al.*, 2011; Black *et al.*, 2015; Ozsurecki y Aykac, 2016; Forman y Zhang, 2021). La acumulación de ERO puede contribuir a la degeneración de tejidos, ya que estas especies reactivas pueden dañar neuronas contribuyendo al Alzheimer (Forman y Zhang, 2021); pueden provocar daño a los vasos sanguíneos, contribuyendo al desarrollo de aterosclerosis, patología íntimamente relacionada con enfermedades del corazón y derrames cerebrales (Valko *et al.*, 2007); así como dañar proteínas y lípidos, lo que se relaciona a trastornos musculares, muerte celular e incluso cáncer (Pham-Huy *et al.*, 2008; Baraibar *et al.*, 2011; Butterfield y Halliwell, 2019). En infantes, la displasia broncopulmonar (DBP), la retinopatía del prematuro (ROP), la enterocolitis necrotizante (ECN), el síndrome de dificultad respiratoria (SDR) y las malformaciones congénitas han sido relacionadas con el estrés oxidativo (Rokicki *et al.*, 2003; Marseglia *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Ozsurecki y Aykac, 2016). No obstante, la implicación de ERO en diversas patologías puede variar considerablemente, y la relación de causa y efecto en muchos casos no es del todo clara (Pham-Huy *et al.*, 2008; Ozsurecki y Aykac, 2016; Forman y Zhang, 2021).

1.4 Estrés oxidativo en mamíferos marinos

Los mamíferos marinos son notables por su habilidad para bucear, con variaciones en la profundidad y duración de cada buceo entre especies (Davis, 2013). Los mamíferos marinos se mueven, se alimentan y, en algunos casos, se aparean bajo el agua; las adaptaciones que les permiten bucear abarcan desde cambios anatómicos y de comportamiento hasta bioquímicos

(Castellini, 2012; Davis, 2013). Los mamíferos marinos tienen mayores concentraciones de hemoglobina y mioglobina, densidad mitocondrial y volumen sanguíneo que los mamíferos terrestres (Elsner, 1998; Kanatous *et al.*, 1999; Vázquez-Medina, 2007). La respuesta al buceo inicia con la apnea (suspensión de la ventilación pulmonar) e incluye bradicardia (reducción del ritmo cardíaco) y vasoconstricción periférica (redirección del flujo sanguíneo hacia los órganos sensibles a la hipoxia, como el sistema nervioso central) (Elsner, 1998; Vázquez-Medina, 2007; Davis, 2013). Los humanos también presentan la respuesta al buceo, pero ésta es limitada en comparación con los mamíferos marinos (Gooden, 1994; Foster y Sheel, 2005; Wartzok, 2008). La presión arterial aumenta de manera significativa en humanos (hasta 280/200 mmHg sistólica/diastólica), mientras que en mamíferos marinos ésta se mantiene estable (120 mmHg durante buceo en foca de Weddell, *Leptonychotes weddellii*) (Hochachka, 1981; Foster y Sheel, 2005; Wartzok, 2008).

La vasoconstricción periférica asociada al buceo causa isquemia (suspensión del flujo sanguíneo) y, con la eventual reducción de la concentración de oxígeno en los tejidos afectados, causa hipoxia (Elsner *et al.*, 1969; Gooden y Elsner, 1985; Davis y Williams., 2012; Allen y Vázquez-Medina, 2019). Al regreso a la superficie después de un buceo, se reanuda la ventilación pulmonar, se restablecen el flujo sanguíneo (reperfusión) y la oxigenación (reoxigenación) de los tejidos y, con ello, aumenta la producción de ERO (Elsner *et al.*, 1998; Vázquez-Medina *et al.*, 2006; Allen y Vázquez-Medina, 2019). Durante los períodos de isquemia/reperfusión, la concentración del adenosín trifosfato (ATP) disminuye, resultando en una acumulación de purinas y la conversión proteolítica de xantina deshidrogenasa (XDH) a xantina oxidasa (XO); durante la perfusión, XO es capaz de reducir los nucleótidos de purina en presencia de oxígeno, generando ERO como $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 (Halliwell y Gutteridge, 1999; Zenteno-Savín *et al.*, 2011). Ello representa una amenaza de daño oxidativo a macromoléculas y componentes celulares, comprometiendo la salud y, potencialmente, la supervivencia de los individuos (Allen y Vázquez-Medina, 2019).

En el estudio de las adaptaciones de mamíferos marinos a condiciones que en mamíferos terrestres conllevan a daño oxidativo, la disponibilidad de células con replicación ilimitada, como

ocurre en los cultivos inmortalizados, podría acelerar significativamente la investigación. En este contexto, utilizando cultivos de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) como modelo para mamíferos marinos y de humano (*Homo sapiens*) como modelo para animales terrestres, este estudio busca determinar si existen efectos en los indicadores de estrés oxidativo en respuesta al proceso de inmortalización.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generación de líneas celulares inmortales

Los primeros trabajos sobre la immortalización celular comenzaron en la década de 1950, con la producción de células humanas inmortales, HeLa, línea celular derivada a partir de tejido cervical canceroso (Scherer *et al.*, 1953). Los estudios posteriores se centraron en la senescencia celular. Hayflick y Moorhead (1961) reportaron que las células humanas normales tienen un límite finito de divisiones antes de entrar en senescencia. En 1960 se identificó el virus del simio 40 en cultivos de riñón de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) utilizados para la producción de la vacuna contra el polio (Sweet y Hilleman, 1960; Xu *et al.*, 2023). Este virus fue nombrado por el efecto que produce en los cultivos promoviendo el desarrollo anormal de vacuolas (Sweet y Hilleman, 1960). En la década de 1970 se identificaron diversos genes relacionados al cáncer, oncogenes, capaces de transformar las células en condiciones *in vitro*. Esta transformación confiere a las células la habilidad de continuar con la división celular por más tiempo (Kavsan *et al.*, 2011). Un ejemplo claro de esto son los hibridomas, células inmortales con la capacidad de producir anticuerpos con especificidad definida, resultado de la fusión de un linfocito B y mieloma (Köhler y Milstein, 1975). También se logró la transfección con adenovirus 5 en células embrionarias de riñón humano (HEK293) (Graham *et al.*, 1977). Durante esta década, el SV40 LT se utilizó en estudios de transformación celular para entender la interacción de éste con las vías celulares involucradas en la carcinogénesis (Kuwata *et al.*, 1976). Dado su potencial para desencadenar la replicación del ADN viral, se empleó el SV40 LT para profundizar en el estudio de los procesos de replicación del ADN en general (Subramanian *et al.*, 1977). Posteriormente, se investigó cómo SV40 LT interactúa con el genoma del huésped y cómo regula la expresión génica en las células infectadas, lo cual fue fundamental para comprender la regulación de genes en general (Segawa *et al.*, 1980). También se utilizó el SV40 LT en el desarrollo de modelos de investigación del cáncer *in vitro* (Graham *et al.*, 1979) y en el estudio de las respuestas inmunes específicas (Stillström, 1973).

En los 1980's y 1990's se popularizó el uso de oncogenes y la generación de retrovirus para la immortalización en distintos tipos celulares de humano y ratón (Tabin *et al.*, 1982; Clark *et al.*, 1986), tales como el virus de Epstein-Barr (VEB) (Kempkes *et al.*, 1995), SV40 LT (Wright *et al.*,

1989; Shay *et al.*, 1991b; Wright *et al.*, 1992), SV40 ST (Stewart y Bacchetti, 1991), y virus del papiloma humano (VPH) (Hausen, 1999). Se lograron avances al describir los mecanismos moleculares responsables de la senescencia, incluyendo Rb y p53, y cómo la inactivación de éstos aumenta el tiempo de vida media de los cultivos celulares (Hara *et al.*, 1991). Además, se propusieron mecanismos para entender la senescencia celular en fibroblastos de humano (Wright *et al.*, 1989; Shay *et al.*, 1991b; Wright y Shay, 1992; Ozer *et al.*, 1996). Se describieron dos mecanismos que operan de manera independiente; el primero (M1) implica la senescencia proliferativa, desactivada al inactivar los genes p53 y Rb, lo que aumenta el potencial de división celular, logrando que las células se dividan de 20 a 30 veces más (Wright *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1991). Este bloqueo genético no desactiva el segundo mecanismo (M2), el cual induce un estado de crisis en el que el tamaño poblacional celular permanece constante (Wright *et al.*, 1989; Shay *et al.*, 1991b). Esto se debe a que la tasa de división celular es equivalente a la tasa de senescencia. Cabe señalar que el SV40 LT tiene la capacidad de evitar el mecanismo M1, pero no ejerce un impacto directo sobre el mecanismo M2 (Wright *et al.*, 1989; Wright y Shay, 1992). No obstante, la introducción de la inestabilidad genómica por parte de este agente externo puede contribuir a la inactivación de los genes responsables de las proteínas vinculadas al mecanismo M2 (Wright *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1991; Ozer *et al.*, 1996).

Se han immortalizado diversas líneas celulares mediante el uso de SV40 LT; particularmente, hepatocitos, células de riñón, músculo liso, células de Sertoli, provenientes de ratones (Yanai *et al.*, 1991; Kameoka *et al.*, 1995; Hasegawa *et al.*, 1997; Tabuchi *et al.*, 2002; Ebihara *et al.*, 2004; Obinada, 2007). En conejos se han immortalizado células de cartílago, epiteliales a partir de córnea, melanocitos (Thenet *et al.*, 1992; Araki *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2019). Se han transfectado células provenientes de pato, ganso, cerdo, entre otros animales (Fu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2022). En células de humanos, SV40 LT se ha utilizado para estudiar mecanismos moleculares involucrados en diferenciación celular, regulación del ciclo celular, patologías, expresión génica *in vitro*, entre otros (Huang *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016; Carbone *et al.*, 2020; Massenet *et al.*, 2020; Peisker *et al.*, 2022; Tran *et al.*, 2022; Piñeiro-Ramil *et al.*, 2023). Arandel *et al.* (2017) generaron células musculares inmortales con distrofia miotónica tipo 1 y 2 (DM1 y DM2, respectivamente) utilizando el retrovirus hTERT; en

estas células encontraron agregados de ARN nuclear de repeticiones expandidas, un sello distintivo de la distrofia miotónica. En DM1 y DM2 se encontraron características propias de mioblastos primarios parentales, con una capacidad de fusión reducida en los mioblastos DM1 inmortalizados en comparación con las células control y con DM2 (Arandel *et al.* 2017).

García-Mesa *et al.* (2017) caracterizaron células de microglía de humano, macaco y ratón, inmortalizadas mediante SV40LT. Los autores reportaron que las células inmortalizadas mantenían una apariencia similar a lo observado en cultivos primarios, además de expresar marcadores clave de la línea celular, como integrina alfa subunidad M (CD11b), factor de crecimiento transformante beta (TGF β R) y P2RY12. Análisis comparativos de la migración celular en las placas de cultivo y de la capacidad de fagocitosis al introducir neuronas muertas revelaron similitudes con los cultivos primarios (García-Mesa *et al.* 2017). Los mismos autores analizaron la regulación de la expresión de genes relacionados a procesos proinflamatorios en respuesta a lipopolisacáridos (LPS). Las líneas celulares inmortalizadas respondieron a partir de las 24 h, promoviendo la expresión de citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α ; sin embargo, esta respuesta varió con el número de pasajes celulares (García-Mesa *et al.* 2017).

Mata-López *et al.* (2020) transfectaron un cultivo primario de células musculares proveniente de perros, Myok9, utilizando SV40 LT para, posteriormente, caracterizar la línea celular generada mediante la evaluación de la proliferación, curvas de crecimiento, PCR cuantitativa, electrotransferencia, espectrofotometría de masas y microscopía de luz. Los resultados revelaron una mayor tasa de proliferación en comparación con el cultivo primario, junto con una mayor resistencia a los cambios en el medio de cultivo y a los efectos de la tripsina en Myok9 (Mata-López *et al.* 2020). Adicionalmente, Myok9 expresó proteínas específicas para la diferenciación muscular, como la distrofina, de manera similar al cultivo primario; sin embargo, se observó que la expresión de distrofina cesó a los 14 días, posiblemente en relación con cambios inducidos por el SV40 LT en la línea celular (Mata-López *et al.* 2020).

Piñeiro-Ramil (2020) obtuvo líneas de células madre mesenquimales (CMMs) procedentes de médula ósea (CMMs-MO) de un paciente con artrosis y un donante sano con el objetivo de

inmortalizar estas líneas celulares mediante SV40 LT. A pesar de no lograr la inmortalización, Piñeiro-Ramil (2020) pudo generar retrovirus que llevaban la región codificante temprana de SV40 utilizando el plásmido pBABE. Estas líneas celulares sobrevivieron al antibiótico puromicina en un periodo de diez días, indicando que el gen de resistencia a la puromicina contenida en el plásmido comenzó a expresarse en las CMMs-MO transfectadas (Piñeiro-Ramil 2020). Con base en estos resultados, Piñeiro-Ramil (2020) sólo fue capaz de evaluar la transfección y no la inmortalización.

Asakawa *et al.* (2023) inmortalizaron células del ligamento periodontal provenientes de pacientes con síndrome de Down (STPDLDS) y sanos (STPDL), usando el plásmido pBABE puro-SV40 LT de Addgene y hTERT, para examinar la relación entre el síndrome de Down y la enfermedad periodontal. Los autores reportaron una mayor expresión de *DSCR-1*, el cual se encuentra en la “región crítica de síndrome de Down” en el cromosoma 21 y se ha relacionado con la ocurrencia de carcinoma (NIH, 2013) en STPDLDS en comparación con STPD, lo cual es consistente con la mayor expresión de dicho gen que ha sido relacionada con el síndrome de Down. Además, Asakawa *et al.* (2022) reportaron una mayor proliferación en los cultivos inmortalizados en comparación con los cultivos normales. Los resultados de estos estudios sugieren que el uso de cultivos inmortalizados como modelo de estudio es una alternativa viable para la investigación de diversos procesos moleculares, fisiológicos y patológicos.

2.2 Estrés oxidativo en mamíferos marinos y terrestres

En los 1990's se iniciaron los estudios comparativos de los indicadores de estrés oxidativo en mamíferos marinos y mamíferos terrestres. Se reportó mayor actividad de SOD en corazón de foca anillada (*Phoca hispida*) que en corazón de cerdo (*Sus scrofa*), así como una concentración elevada de hipoxantina (HX) y una producción diferencial de $O_2^{\bullet-}$ en distintos tejidos de foca anillada (Elsner *et al.*, 1995; Elsner *et al.*, 1998).

Wilhelm Filho *et al.* (2002) analizaron los niveles de antioxidantes en sangre en mamíferos buceadores (manatíes (*Trichechus manatus manatus*), elefantes marinos (*Mirounga leonina*), ballenas minke común (*Balaenoptera acutorostrata*), delfines rayados (*Stenella clymene*)) y

mamíferos terrestres (mono (*Cebus apella*), hurón (*Grison vittatus*), mapache (*Procyon cancrivorous*), oso hormiguero (*Tamandua tetradactyla*) y venado (*Ozotocerus hesoarticus*)). La actividad de SOD, CAT, GR y GPx fue significativamente mayor en mamíferos buceadores que en mamíferos terrestres (Wilhelm Filho *et al.*, 2002). Esto sugiere una mayor capacidad antioxidante en los mamíferos buceadores en comparación con los mamíferos terrestres.

Zenteno-Savín *et al.* (2002) compararon los indicadores de estrés oxidativo en muestras de corazón, músculo y riñón de *P. hispida* y *S. scrofa*. Encontraron una mayor producción de $O_2^{\bullet-}$ en tejidos de foca que de cerdo; sin embargo, el daño oxidativo a tejidos, evaluado mediante la cuantificación de los niveles de ácido tiobarbitúrico (TBARS, un indicador de daño oxidativo a lípidos), no incrementó de manera proporcional. La actividad de SOD fue mayor en riñón de cerdo en comparación el mismo tejido de foca anillada, y la capacidad antioxidante total fue significativamente mayor en tejidos de foca (Zenteno-Savín *et al.* 2002). Ello concuerda con la hipótesis de que los animales que bucean presentan niveles elevados de las defensas antioxidantes.

Pine *et al.* (2007) analizaron la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y CAT en células epiteliales renales de *T. truncatus* (DKN1) y de *S. scrofa* (LLC-PK1); la actividad de CAT y GPx fueron menores en DKN1 en comparación con LLC-PK1, por 1.5 y 10.5 veces, respectivamente. Los autores sugieren que las diferencias entre los tipos de células podrían estar asociadas a la edad, ya que la muestra de *T. truncatus* fue extraída de un aborto espontáneo de un espécimen en cautiverio, mientras que la muestra de *S. scrofa* fue de un juvenil (Pine *et al.*, 2007). Se han reportado cambios en las defensas antioxidantes asociadas a la edad en otras especies de mamíferos (Carvan *et al.*, 1994; Devi *et al.*, 1996).

Vázquez-Medina (2007) analizó y comparó la producción de ERO, daño oxidativo y actividad enzimática antioxidante en tres especies de pinnípedos con capacidades de buceo diferentes (foca encapuchada o de casco (*Cystophora cristata*), foca de arpa (*Pagophilus groenlandicus*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*)). Vázquez-Medina (2007) encontró diferencias significativas en la producción endógena de $O_2^{\bullet-}$ entre especies, pero no en los indicadores de daño oxidativo, actividad enzimática antioxidante o concentración de GSH. El autor sugiere que

tanto fócidos como otáridos tienen un sistema antioxidante avanzado que les permite contrarrestar los efectos de la isquemia/reperfusión asociados al buceo (Vázquez-Medina 2007).

Cantú-Medellín *et al.* (2011) analizaron la actividad antioxidante, producción de $O_2^{\bullet-}$, daño oxidativo y niveles de glutatión (actividad de GPx, GST, GR y niveles de GSH) en tejidos (corazón, riñón, hígado, pulmón, cerebro y músculo) de delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*), un buceador superficial, y cachalote pigmeo (*Kogia sp.*), buceador de profundidad. En *Kogia sp.* la producción de $O_2^{\bullet-}$ en todos los tejidos fue mayor en comparación con *T. truncatus*. Los autores sugieren que estas diferencias están relacionadas con la capacidad de buceo (corto/superficial vs largo/profundo) de las especies estudiadas (Cantú-Medellín *et al.* 2011).

2.3 Estrés oxidativo e inmortalización celular

Hasta el momento, sólo dos estudios han utilizado cultivos celulares inmortalizados para el análisis de indicadores de estrés oxidativo. Kinnula *et al.* (1994) compararon la actividad antioxidante de células de epitelio bronquial de humano en cultivo primario y células inmortalizadas (BEAS 2B). La línea celular inmortalizada se obtuvo mediante el uso de SV40 LT en el Instituto Nacional del Cáncer, EUA. El estudio inmunocitoquímico mostró patrones similares de localización intracelular para superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD) y catalasa entre células en cultivo primario y BEAS 2B (Kinnula *et al.* 1994). Con el tiempo, la actividad de SOD dependiente de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD) y de catalasa disminuyó en cultivos primarios mientras que en BEAS 2B la actividad de Mn-SOD disminuyó (Kinnula *et al.* 1994). El análisis bioquímico demostró un alto grado de similitud en la actividad de catalasa y glutatión reductasa (GR) en ambos cultivos, además de que la tasa de consumo exógeno de H_2O_2 se mantuvo aproximadamente igual (100 y 80 nmol H_2O_2 mg^{-1} proteína $15\ min^{-1}$, respectivamente), indicando capacidad antioxidante similar (Kinnula *et al.* 1994). Los autores concluyeron que el uso de líneas celulares inmortalizadas puede representar un buen modelo *in vitro* para la investigación de la actividad de las enzimas antioxidantes en células epiteliales.

Han *et al.* (2019) utilizaron células mesenquimales amnióticas humanas inmortalizadas (iHAM), células epiteliales amnióticas humanas inmortalizadas (iHAE) y fibroblastos de piel humana (HSF)

como control, para evaluar la producción de ERO, viabilidad y morfología celular al inducir estrés oxidativo con rayos X y H₂O₂. La producción intracelular de ERO y la apoptosis se elevaron de manera significativa en iHAM, mientras que iHAES exhibió resistencia al daño oxidativo relacionada a un aumento en la expresión de *SOD*, *Nrf2*, *HO-1* posterior a la exposición a rayos X (Han *et al.* 2019). Los autores concluyeron que la línea celular iHAM es sensible al daño oxidativo, mientras que iHAES puede proveer cierto grado de protección en el tejido amniótico contra circunstancias que favorezcan eventos de estrés oxidativo.

3. JUSTIFICACIÓN

El lobo marino de California está sujeto a diversos desafíos fisiológicos derivados de su estilo de vida, incluyendo el buceo en apnea de manera rutinaria. Estos animales han desarrollado adaptaciones cardiovasculares, como la bradicardia y la vasoconstricción periférica, y experimentan isquemia e hipoxia en sus tejidos con cada inmersión. No obstante, los mamíferos marinos no muestran signos de daño oxidativo en comparación con los mamíferos terrestres. Esto se debe en parte a los altos niveles de antioxidantes presentes en sus tejidos.

Los cultivos celulares son una alternativa valiosa para estudiar procesos fisiológicos en animales como el lobo marino de California. Sin embargo, tienen sus limitantes, siendo el factor tiempo uno de los más significativos. Sin importar el tipo de células o el medio de cultivo utilizado, eventualmente las células entran en un estado de senescencia. El proceso de renovación de cultivos puede resultar tedioso, además puede añadir un margen de error al intentar mantener condiciones de cultivo consistentes. Una solución para garantizar la consistencia, tanto en el material de experimentación como en los resultados, es utilizar células inmortalizadas. Estas células son más fáciles de cultivar que las células extraídas para cultivos primarios, ya que presentan un crecimiento veloz y continuo, lo que permite grandes cantidades de material de interés para la investigación. Entre otros, las células inmortalizadas pueden ser utilizadas para evaluar la expresión de genes específicos, actividad enzimática, morfología, crecimiento, diferenciación celular, y otros aspectos relevantes de la fisiología celular de especies con adaptaciones específicas, como los mamíferos marinos.

En virtud de que, hasta donde sabemos, no hay reportes sobre los efectos de la inmortalización de células en procesos de estrés oxidativo en mamíferos marinos en comparación con mamíferos terrestres, en este estudio abordaremos la siguiente pregunta. El inmortalizar células derivadas de músculo esquelético de humano y lobo marino de California ¿altera los indicadores de estrés oxidativo de tal manera que se pierden las diferencias observadas entre especies bajo condiciones de cultivo celular primario?

4. HIPÓTESIS

La inmortalización de células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) afecta los niveles de estrés oxidativo de tal manera que se pierden las diferencias observadas bajo condiciones de cultivo celular primario entre especies.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar si hay diferencias significativas entre especies en los indicadores de estrés oxidativo antes y después de immortalizar células derivadas de músculo esquelético de humanos (*Homo sapiens*) y lobos marinos de California (*Zalophus californianus*).

5.2 Objetivos particulares

- Establecer cultivos primarios de células derivadas de músculo esquelético de humanos y lobos marinos de California y analizar los indicadores de estrés oxidativo bajo condiciones basales.
- Transfectar células derivadas de músculo esquelético de *Homo sapiens* y *Zalophus californianus* con el virus del simio 40 antígeno T grande, a partir del plásmido pBABE.
- Evaluar el efecto de la transfección mediante un perfil de citotoxicidad.
- Analizar los indicadores de estrés oxidativo en células derivadas de músculo esquelético de humanos y lobos marinos de California en células en cultivo primario e immortalizadas.
- Comparar los resultados entre tratamientos (células en cultivo primario, células immortalizadas) y entre especies (*Homo sapiens* y *Zalophus californianus*).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Colecta de muestras

La colecta de muestras de individuos de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) muertos se realizó en la temporada reproductiva, de mayo a julio de 2023, en la colonia Los Islotes, en el Parque Nacional Zona Marina del Archipiélago de Espíritu Santo, Golfo de California. En colaboración con personal del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (IPN-CICIMAR) (permiso de colecta SPARN/DGVS/07012/23) los individuos muertos se buscaron mediante conteos visuales con binoculares desde la embarcación a 20 metros de la orilla (Aurioles-Gamboa y Zavala-González, 1994). Se buscaron animales muertos, sin importar el estadio de madurez. Cuando se detectó posible un individuo muerto, se procedió a desembarcar en la isla.

Se tomaron medidas morfométricas y se determinó el sexo de cada individuo acuerdo con Aurioles-Gamboa *et al.* (1983). Además, se determinó el estado de descomposición, con una escala del 1 al 5 siguiendo la sugerencia de Pugliares *et al.* (2007), como se muestra a continuación.

- 1) El cadáver es recientemente muerto.
- 2) El cadáver muestra una descomposición leve notada por una ligera hinchazón.
- 3) El cadáver muestra una descomposición moderada, exhibe hinchazón y descamación de la piel moderada, órganos internos intactos (excluyendo daño *post mortem*); en los machos el pene puede ser visible.
- 4) El cadáver muestra una descomposición avanzada, exhibe hinchazón y descamación de la piel avanzada, órganos internos irreconocibles, exposición ósea y en los machos extensión del pene.
- 5) El cadáver se presenta como restos óseos o está momificado.

En los casos cuando el estado de descomposición fue mayor a 3, no se recolectaron muestras y se reanudó la búsqueda. Por el contrario, cuando el estado de descomposición fue menor a 3, se procedió a la toma de muestras (Pugliares *et al.*, 2007). Con ayuda de un bisturí previamente esterilizado con alcohol al 80%, se recolectaron entre 3 y 5 gramos de músculo *longissimus dorsi* de la región dorsolateral. Cuando no fue posible tomar las muestras del *longissimus dorsi*, se tomó la muestra del músculo *pectoralis major* o *pectoralis minor* (Lu *et al.*, 2000).

Las biopsias de humano se obtuvieron con ayuda del personal médico certificado del Hospital General de Zona No. 1 de la Delegación Baja California Sur del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Se extrajeron alrededor de 3 g de músculo esquelético abdominal de mujeres en edad reproductiva (15-35 años), sanas (sin enfermedades crónicas), con seguimiento prenatal y cesárea programada. La obtención de estas muestras se realizó siguiendo los lineamientos éticos establecidos por el Comité de Ética en Investigación (CONBIOÉTICA-09-CEI-009-20160601) y después de obtener el consentimiento informado de las participantes.

Para ambas especies, cada muestra se lavó con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS, Gibco™) en una caja Petri. Los lavados con PBS tienen por objetivo eliminar el exceso de lípidos, células sanguíneas y bacterias que puedan acompañar a la muestra (Mojica *et al.*, 2015). Posteriormente, la muestra se colocó en un tubo Falcon™ de 15 mL en medio de transporte (medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco, F-12 de Ham (DMEM/F-12), 1X; penicilina-estreptomicina, 10 U mL⁻¹) y se colocó en una hielera para su transporte inmediato al laboratorio de Estrés Oxidativo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, Baja California Sur, México.

6.2 Siembra y mantenimiento de cultivos celulares

Trabajando en una campana de flujo laminar difuso (Esco Class II type A2; Esco Labculture™, E-Series) y utilizando material previamente esterilizado (con alcohol al 80% y con exposición a luz UV por 10 minutos), se pasaron las muestras a cajas Petri para su disección y corte en fragmentos de 0.5-1.0 mm² utilizando un bisturí (Freshney, 2010). Los restos de tejido se desecharon

siguiendo las regulaciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM-087-ECOL-SSA1-2002) para el manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI) (DOF, 2003).

Los fragmentos de músculo se colocaron en cajas de cultivo tipo T de 12.5 cm² (25 mL, Falcon™) usando pipetas Pasteur y se añadieron 3 mL de medio de cultivo (DMEM/F-12, 1X; suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) o suero bovino cósmico (CCS, por sus siglas en inglés), 12.4%; penicilina-estreptomicina, 10 U mL⁻¹; L-glutamina-L-alanina (Glutamax), 100X; piruvato de sodio, 100 mM; ácido sulfónico (HEPES), 1 M) (Rivera-Perez *et al.*, 2021; Hernández-Almaraz *et al.*, 2022). Los cultivos se incubaron por 24 h a 35 ± 1°C en ambiente con CO₂ al 5% (v/v) (Barnstead Lab-Line Lli CO₂, Thermo Scientific™, Nueva Jersey, Estados Unidos). Al término de dicho período, se añadieron 2 mL de medio de cultivo a cada muestra, y se incubó nuevamente bajo las condiciones previamente descritas con cambio de medio cada 72 h (Neville *et al.*, 1997). Se hizo un conteo celular, se monitoreó la propagación de las células, se estimó empíricamente la confluencia (es decir, el porcentaje de cobertura), se diferenciaron los tipos celulares presentes, se identificó si había contaminación por bacterias, y se hizo una documentación fotográfica de las células (Freshney, 2010) utilizando un microscopio invertido (Carl Zeiss Microscopy GmbH™, Axiovert 100, Nueva York, Estados Unidos) y el programa de computación ZEN 2.0® (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011).

Cuando las cajas de cultivo estuvieron cerca del 100% de confluencia, se utilizó un protocolo de tripsinización (Bischoff, 1974) para trasladar las células a nuevas cajas T. Se descartó el medio de cultivo y se hizo un lavado con PBS. Posteriormente, se añadió tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (1x) y se incubó por 5 minutos a 37°C. La tripsina hidroliza los enlaces peptídicos de las proteínas al exterior de las células promoviendo su disgregación (Freshney, 2010). Se inactivó la reacción añadiendo medio de DMEM/F12, y las células se recuperaron en tubos Falcon™ (15 mL). Se centrifugó a 90 x *g* por 5 minutos a 25°C y el precipitado se resuspendió en medio de cultivo. Por último, se tomó la solución final y se repartió en cajas de cultivo T nuevas. Los cultivos se mantuvieron en incubación en las mismas condiciones hasta alcanzar un 90-100% de confluencia. Se realizaron subcultivos hasta obtener un total de 12 cajas T por individuo, con una densidad de 0.8-1 x 10⁶ células mL⁻¹ en cada caja.

6.2.1 Viabilidad celular

La densidad celular se estimó a través del método cuantitativo de viabilidad celular (Lu *et al.*, 2000). La viabilidad se determina bajo el principio de exclusión de captación, basándose en el hecho de que el colorante azul de tripano no puede difundirse a través de membranas íntegras y, por lo tanto, sólo es capaz de teñir células muertas (Strober, 2001). Considerando un factor de dilución (FD) de 1:3, se mezcló la muestra con PBS y azul de tripano (0.4%, Gibco™). La solución se homogenizó y se incubó a temperatura ambiente (25°C) por 5 minutos. Se descargó en una cámara Neubauer y se cuantificaron las células en un microscopio óptico (Leica Microsystems). El conteo de células vivas (C_V) y muertas (C_M) en cada muestra se realizó por triplicado, dentro de los cuadros exteriores (1 mm²), considerando únicamente aquellas células que se encuentran dentro de los límites del polígono (Stoddart, 2011). La viabilidad celular, expresada como porcentaje (% V_C), se determinó a partir de la ecuación 1 (Louis y Siegel, 2007):

$$\%V_C = \frac{C_V}{C_T} \times 100 \quad (1)$$

donde C_V se refiere al número de células vivas y C_T al número de células totales. El valor de C_T se obtiene a partir de la concentración celular (C_C) y el volumen total (V_T en mL) de la muestra original (ecuación 2) (Louis y Siegel, 2011):

$$C_T = C_C \times V_T \quad (2)$$

La concentración celular se obtuvo a partir de la siguiente fórmula (ecuación 3) (Louis y Siegel, 2011):

$$C_c = \left(\frac{C_v}{N_c} \right) \times 10,000 \times FD \quad (3)$$

Donde N_c representa el número de cuadrantes contabilizados ($N_c=4$) y FD se refiere al factor de dilución.

6.3 Inmortalización de líneas celulares

6.3.1 Preparación del plásmido pBABE-puro SV40LT

El plásmido pBABE-puro SV40 LT se obtuvo de Addgene (Addgene plasmid # 13970; <http://n2t.net/addgene:13970>; RRID:Addgene 13970) (Zhao *et al.*, 2003). Dicho plásmido consta de un origen de replicación en bacterias (*ori*), un gen de resistencia a ampicilina (*AmpR*), una 5'-LTR, un sitio donador del *splicing* mutado, un gen viral *gag* truncado, el antígeno T, un promotor de SV40 (SV40 *ori*) y el marcador de selección (Fig. 1) (Zhao *et al.*, 2003). El gen de resistencia a puromicina (*puroR*) expresa la enzima puromicina N-acetil transferasa, producida por la bacteria *Streptomyces alboniger*, con la capacidad de otorgar resistencia a dicho antibiótico. La puromicina inhibe el crecimiento de células eucariotas mediante el bloqueo de la síntesis de proteínas a nivel ribosomal (80S) (Lanza *et al.*, 2013; Piñeiro-Ramil, 2016) (Fig. 1).

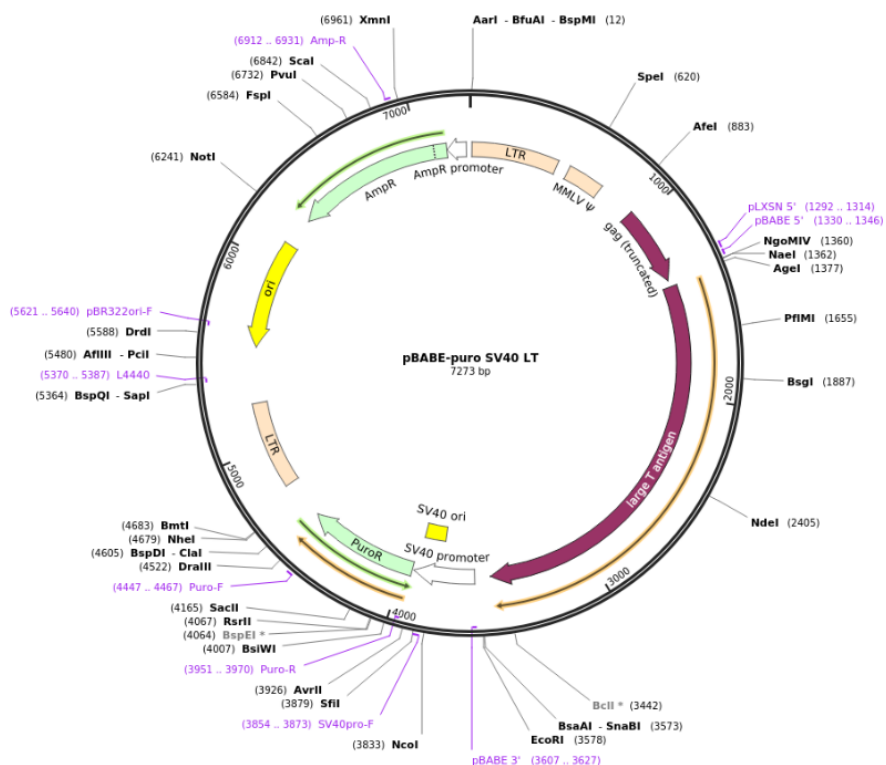


Figura 1. Plásmido pBABE-puro SV40 LT (tomado de Addgene.org)

En cajas Petri, se inoculó una colonia de bacterias DH5- α con el plásmido comercial en medio sólido de LB (BD™ Difco™ LB Broth, Lennox, East Rutherford, NJ, EE.UU.) enriquecido con ampicilina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) a temperatura de 32-37°C por 16 a 24 h. De las cajas Petri, se separaron colonias individuales; se realizó una segunda siembra en 5 mL de medio líquido LB enriquecido con ampicilina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) y se incubó por 24h a 37°C en una incubadora con agitación (Piñeiro-Ramil, 2016).

6.3.2 Extracción y cuantificación de ADN plasmídico

Se extrajo el ADNp con un Miniprep (Thermo Fischer Scientific™) siguiendo el protocolo del fabricante. Esta técnica se basa en la desnaturalización diferencial entre el ADN plasmídico (ADNp) y el ADN cromosómico (ADNcr). Para ello, las células se someten a lisis en condiciones altamente alcalinas, generalmente con un pH de 12 a 12.5, utilizando dodecilsulfato de sodio (SDS) e hidróxido de sodio (NaOH) (Ehrt & Schnappinger, 2003). Esto provoca la desnaturalización de las moléculas de ADN. Luego se agrega acetato de sodio para finalizar la reacción, lo cual permite que el ADNp se renaturalice y permanezca soluble, mientras que el ADNcr se precipita

junto con los complejos SDS-proteínas; este último se elimina mediante centrifugación (Wright *et al.*, 2001).

Se tomaron 1.5 mL de cultivo líquido LB y se centrifugó $3900 \times g$ por 2 minutos. Se removió el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 150 μL en solución amortiguadora a 4°C (glucosa 50mM; EDTA 10mM; Tris 25mM, pH 8.0; lisozima 4mg mL^{-1}). Se añadieron 20 μL de ARNasa por tubo, y se mezcló al vórtex. Después, se añadieron 300 μL de solución desnaturalizante (0.2 N NaOH; 1% SDS) y se mezcló suavemente hasta que el contenido del microtubo fue visible. Se incubó la solución a temperatura ambiente por 5 min y se añadieron 225 μL de solución renaturalizante (120 mL acetato de potasio 5M; 23 mL ácido acético glacial y 57 mL dH_2O) a cada tubo a 4°C (addgene.org, 2023). Se mezcló y se incubó por 5 min a -20°C . Posteriormente, se centrifugó por 10 minutos a $12,000 \times g$. En este punto se forma un precipitado blanco que corresponde a las proteínas y ADN genómico (Wright *et al.*, 2001). Se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos con 700 μL de isopropanol y 10% de acetato de sodio 3 M pH 5.2, se mezcló al vórtex y se incubó a -80°C por 30 min. Luego se centrifugó nuevamente bajo las condiciones previamente descritas. Se decantó el sobrenadante y se añadieron 500 μL de etanol al 70%. Se centrifugó de nuevo por 2 min, se decantó nuevamente y se secó la pastilla resultante a 40°C en un bloque térmico (termoblock, DLab Scientific Co., China). Por último, se resuspendió el ADN seco en solución amortiguadora TE o agua estéril (10mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA) y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Para evaluar la calidad de la extracción, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X. La cuantificación se llevó a cabo en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific™, MA, EE.UU.).

6.4 Transfección de células derivadas de músculo esquelético con plásmido y perfil de citotoxicidad

La transfección se realizó de acuerdo con los métodos de Addgene (2023) (Fig. 2), en cultivos en pase 3 con confluencia del 50-70% (~200,000 células) en cajas T de 12.5cm^2 . En el primer ensayo se probaron distintas concentraciones de ADN, encontrando la mejor eficiencia de transfección a $7.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. En un tubo eppendorf, se diluyeron 7.5 μg de ADN del plásmido pBABE-puro SV40

LT en Xfect Reaction Buffer (Xfect™ Transfection Reagent kit, Takara Bio, U.S.A.), y se añadió 1.5 µL de polímero Xfect, procurando un volumen final de 100 µL por réplica. Se agitó en vórtex por 10 segundos a velocidad alta y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se agregaron 100 µL complementando con 900 µL de medio de alimentación. Se incubó a 37°C por al menos 4 h. Posteriormente, se eliminó totalmente el complejo de nanopartículas Xfect-DNA en el medio de cultivo, y se añadieron 5 mL de medio de cultivo. Después de 48-72 h, se llevó a cabo la validación de la transfección.

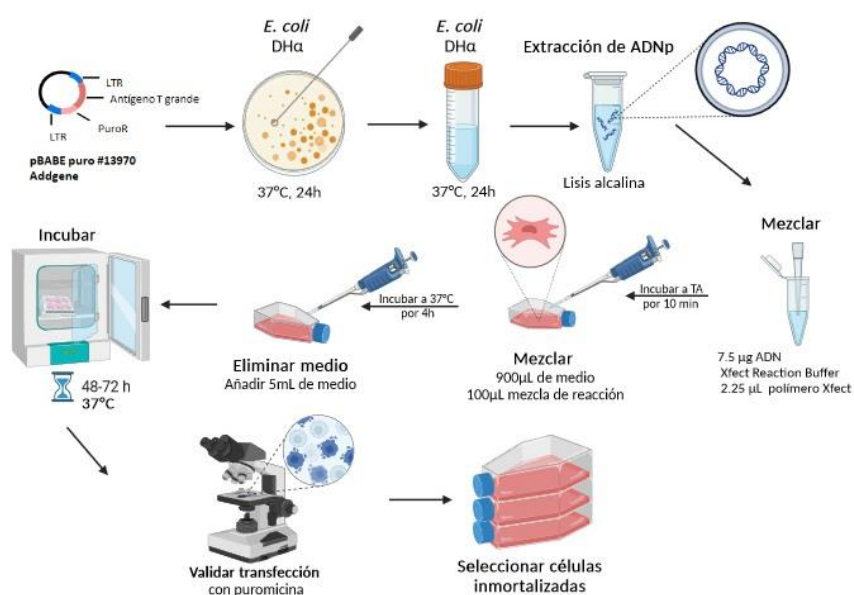


Figura 2. Esquema de la metodología aplicada para la transfección en células musculares de mamíferos a partir de plásmido comercial pBABE-puro (Addgene) (creado con BioRender.com).

Se confirmó el éxito de la inmortalización con un ensayo de citotoxicidad con puromicina (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Para ello, se realizó una curva de supervivencia celular en respuesta a la exposición a dicho antibiótico previo a la transfección siguiendo el protocolo de Sigma Aldrich (2023) (Fig. 3). En cajas T de 12.5 cm² se sembraron aproximadamente 2 x 10⁵ células por caja con medio sin antibiótico. A las 48 h de la siembra, se aplicó el tratamiento con puromicina en concentraciones previamente definidas (Anexo 1). Se monitoreó cada 24 h a través de un microscopio por 11 días, con recambios cada 48 h. En los días 5, 7 y 11 se determinó la viabilidad celular siguiendo el protocolo descrito en la sección 6.2.1. Con los resultados de este

ensayo, se aplicó el tratamiento a las células que fueron tratadas con SV40 LT. Las células que hayan sido transfectadas sobrevivirán al ensayo y con ellas se establece una línea celular inmortalizada de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 6.2. Se almacenó la biomasa a -80°C hasta su análisis para cuantificar los indicadores de estrés oxidativo (Sigma Aldrich, 2023).

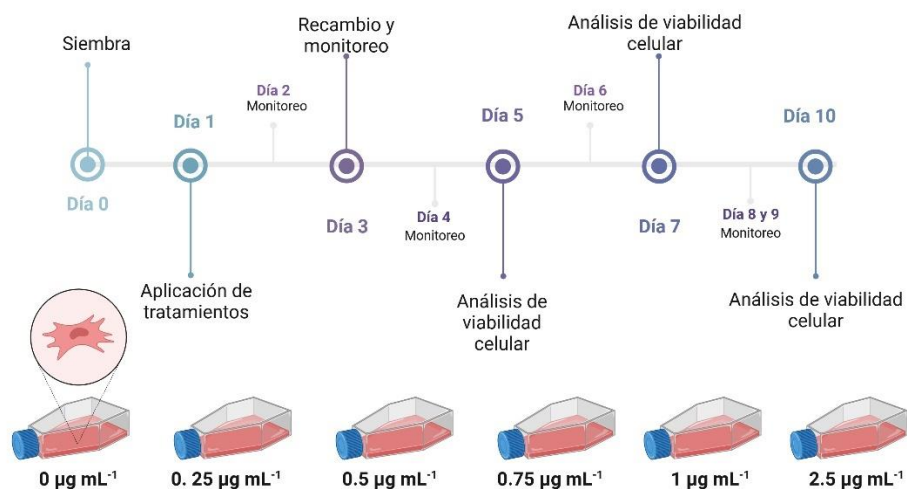


Figura 3. Esquema del protocolo experimental para evaluar la supervivencia celular en respuesta a la incubación con diferentes concentraciones de puromicina. El proceso comienza con la siembra de las células el Día 0. En el Día 1, se aplican tratamientos con cinco concentraciones diferentes de puromicina, desde $0\ \mu\text{g mL}^{-1}$ hasta $2.5\ \mu\text{g mL}^{-1}$. Los días 2, 3, 5, 6, 7 están dedicados al recambio y monitoreo de las células; y los días 5, 7 y 10 se analiza la viabilidad celular.

6.5 Análisis de indicadores de estrés oxidativo

6.5.1 Producción de radical superóxido en células derivadas de músculo esquelético de *Homo sapiens* y *Zalophus californianus*

La tasa de producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ endógeno se evalúa como indicador de la capacidad del tejido para producir ERO (Drossos *et al.*, 1995; Zenteno-Savín *et al.*, 2002). La tasa de producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ se cuantifica mediante espectrofotometría durante la reducción del ferricitocromo c en un intervalo de tiempo fijo, de acuerdo con los métodos de Markert *et al.* (1984) y Drossos *et al.* (1995). A cada muestra se agregó solución amortiguadora de Krebs (cloruro de sodio (118 mM), cloruro de potasio (4.7 mM), sulfato de magnesio (12 mM), fosfato de sodio monobásico (13.83 mM), carbonato de sodio (1.9 mM), glucosa (0.2%), agua destilada) y se mezcló al vortex (VWR

Scientific, Radnor, PA, EE. UU.). Se agregó citocromo C (15 μM) a cada muestra y se mezcló con el vortex para iniciar la reacción. Las muestras se colocaron en un baño de agua (Polyscience, Niles, IL, EE. UU.) a 37°C durante 15 minutos. Después se colocaron en agua con hielo y se añadió N-etilmaleimida (3 mM) para terminar la reacción. Las muestras se mezclaron con el vortex y se centrifugaron a 500 $\times g$ a 4°C durante 5 minutos. Posteriormente, se transfirieron 250 μL de cada muestra a una microplaca y se leyó la absorbancia a 550 nm en un lector de microplaca (Corning Incorporated, Corning, NY, EE. UU.). Para cada muestra se preparó un blanco; para ello, se descartó el sobrenadante, se añadió buffer de Krebs, N-etilmaleimida y citocromo C al precipitado y se mezcló al vortex. Cada tubo eppendorf se incubó y se centrifugó de acuerdo con lo previamente descrito. La absorbancia a una longitud de onda de 550 nm se usa para determinar la tasa de producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Los resultados se expresan en nanomoles de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por miligramo de proteína por minuto.

6.5.2 Daño oxidativo en células derivadas de músculo esquelético de *Homo sapiens* y *Zalophus californianus*

La peroxidación lipídica se mide como indicador del daño oxidativo inducido por ERO, cuantificando el contenido de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) mediante los métodos modificados de Persky *et al.* (2000). Las muestras se homogenizaron en solución salina (0.9%) y se centrifugaron a 2,000 $\times g$ por 10 min a 4°C. Se incubó en un baño de agua por 15 minutos a 37°C. Luego los tubos se colocaron en agua con hielo. Se agregó ácido tricloroacético (TCA), ácido clorhídrico al 20% y ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1% a cada tubo y se mezcló al vortex. Se incubó durante 10 minutos en baño de agua a 90°C (Precision, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Posteriormente, todos los tubos se colocaron en agua con hielo, luego se centrifugaron durante 15 minutos a 1500 $\times g$ a 4°C. La absorbancia de los sobrenadantes se leyó a una longitud de onda entre 532-535 nm en un lector de microplaca; a partir de una curva estándar (0 a 5 nmol 250 μL^{-1}) de malondialdehido bis-(dietilacetal) se obtuvo la concentración de TBARS para cada muestra. Los resultados se expresan en nanomoles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico por miligramo de proteína.

El daño oxidativo a proteínas se mide mediante el método modificado de Levine *et al.* (1990). A cada muestra se le añadió 1 mL de ácido sulfosalicílico al 5% y se mezcló al vortex. Los contenidos

se dividieron en cuatro partes iguales, con la finalidad de tratar dos tubos como “muestra” y los otros dos como “blanco”. Éstos se centrifugan a 350 x *g* durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y a los tubos “muestra” se añadió dinitrofenil hidrazina (DNPH 10 mM) mientras que a los “blancos” se les agregó ácido clorhídrico (HCl 2.5 M; Fermont, Monterrey, SA, MX). Posteriormente, los tubos se cubrieron para proteger de la luz, y se mezclaron al vortex por 5 segundos cada 15 minutos durante una hora. Finalizado dicho periodo, se agregó TCA al 20% a cada tubo y se incubó en agua fría por 10 minutos; posteriormente, se centrifugó a 350 x *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se lavó la solución con etanol:acetato de etilo (1:1; J. T. Baker, Phillipsburg, N. J., EE. UU.). Se centrifugó nuevamente en las condiciones previamente descritas y se añadió clorato de guanidina (6 M). Se mezcló al vortex y se incubó en baño de agua a 37°C por 15 minutos. Por último, se centrifugó de nuevo y se utilizaron los sobrenadantes para la lectura de las absorbancias en microplaca para muestras y blancos a 340 y 405 nm, respectivamente. Se registró la absorbancia máxima y se utilizó el promedio de cada muestra para el cálculo de la concentración de carbonilos proteicos. La concentración de carbonilos proteicos se expresa en micromoles por miligramo de proteína.

6.5.3 Defensas antioxidantes en células derivadas de músculo esqueléticos de *Homo sapiens* y *Zalophus californianus*

Previo a la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes y para homogenizar cada muestra, se agregó solución amortiguadora de fosfato (50 mM, pH 7.5) usando fluoruro de metilfenilsulfonilo (PMSF 1 mM) como inhibidor de proteasas. Luego se centrifugó 1600 x *g* por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se utilizó en los análisis posteriores. La actividad enzimática se expresa en unidades (U) o miliunidades (mU) por miligramo de proteína.

La actividad de superóxido dismutasa (SOD; E.C. 1.15.1.1) se determinó siguiendo la metodología descrita por Suzuki (2000). Este método se basa en la capacidad de SOD de inhibir la producción de O₂^{•-}, producto de la interacción entre xantina y xantina oxidasa (XO) (como generador constante de O₂^{•-}) con nitroazul de tetrazolio (NBT), produciendo formazán (Suzuki, 2000). Cada muestra (10 µL) se mezcló con solución de trabajo (solución amortiguadora de carbonato de sodio (50 mM), xantina (100 µM), NBT (0.25 mM), EDTA (1 mM) y XO (0.1 unidades)). Se

prepararon blancos reemplazando la muestra con solución de trabajo. El cambio en absorbancia se mide usando un lector de microplaca a 240 nm cada minuto durante cinco minutos. Una unidad de actividad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir el 50% de la reacción entre $O_2^{\bullet-}$ y NBT.

La actividad de catalasa (CAT; E.C. 1.11.1.6) se determinó siguiendo el método de Aebi (1984) midiendo el decremento en la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En cubetas de cuarzo (VWR Spectrophotometry Cell, Radnor, PA, EE. UU.) se mezclaron 10 μ L de cada muestra y 1.5 mL de solución de trabajo (solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, H_2O_2 20 mM) por triplicado. La absorbancia se leyó a 240 nm (DU 800, Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.) cada 15 segundos durante 180 segundos en un lector de microplaca. Una unidad de actividad de esta enzima se define como la cantidad de CAT necesaria para reducir 1 μ mol de H_2O_2 por minuto.

La actividad de glutatión peroxidasa (GPx; E.C. 1.11.1.9) se determinó según el método de Flohé y Günzler (1984). La reacción se basa en la disminución de NADPH al mantener constantes los niveles de GSH. Se mezclaron 10 μ L de muestra, solución amortiguadora de fosfato de potasio (500 mM), EDTA (50 mM), azida de sodio (20 mM), glutatión reductasa (GR) ($15 U mL^{-1}$), NADPH (1.5 mM), GSH (250 mM) y H_2O_2 (10 mM H_2O_2). El blanco se preparó sustituyendo la muestra por solución amortiguadora. Se registró la absorbancia a 340 nm cada minuto durante 5 minutos en un lector de microplaca. Una unidad de actividad se define como la cantidad de GPx necesaria para causar la oxidación de 1.0 μ mol de GSH y formar glutatión disulfuro (GSSG) por minuto.

La actividad de glutatión reductasa (GR; E.C. 1.8.1.7.) se determinó siguiendo la metodología de Goldberg y Spooner (1987). La reacción se basa en la oxidación de NADPH, lo que resulta en una disminución de la absorbancia a 340 nm. Se mezclaron 10 μ L de muestra, amortiguador de fosfato de potasio (500 mM), EDTA (50 mM), NADPH (2 mM) y GSSG (10 mM), y se preparó un blanco sustituyendo la muestra por solución amortiguadora. El cambio en la absorbancia a 340 nm se registró cada minuto por 5 minutos en un lector de microplaca. Una unidad de actividad de esta enzima se define como la cantidad de GR necesaria para reducir 1.0 μ mol de GSSG a GSH por minuto.

La actividad de glutatión S-transferasa (GST; E.C. 4.4.1.34.) se determinó con el monitoreo de la formación de tioéter glutatión dinitrobenzenceno, producto de la unión del GSH con 1-cloro 2, 4-dinitrobenzenceno (CDNB), con base en el método descrito por Habig y Jakoby (1981). Se añadieron 10 μ L de muestra, solución amortiguadora de fosfato (0.1 M), GSH (10 mM), EDTA (60 mM) y CDBN (10 mM). El cambio en la absorbancia a 340 nm se registró en un lector de microplaca cada minuto durante cinco minutos. Una unidad de actividad de esta enzima se define como la cantidad de GST necesaria para catalizar la conjugación de 1 μ mol de CDBN por minuto.

6.5.4 Proteínas totales

Para estandarizar los resultados, se cuantificó la concentración de las proteínas solubles en las muestras, siguiendo el método descrito por Bradford (1976), utilizando albúmina bovina como estándar. A partir de una solución de albúmina en agua destilada, se preparó una curva estándar en concentraciones de 0.005 a 0.2 mg mL⁻¹. Las muestras se diluyeron 1:20 con solución de homogenización (solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.5; EDTA 60 mM; Fermont, Monterrey, SA, MX. (50 mM) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF 1 mM)). Luego se diluyó 1:50 con agua destilada. Se añadió colorante azul de Coomassie (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) a la muestra o estándar. Se mezcló con el vortex y se incubó por 15 min. Se leyeron las absorbancias a 590 nm en un lector de microplaca. A partir de la curva estándar y usando la ecuación para línea recta $y = mx + b$ (donde x = concentración de albúmina, y = absorbancia promedio), se determinó la concentración de proteínas solubles en cada muestra. La concentración de proteínas totales se expresa en microgramos por mililitro.

6.6 Análisis estadístico

Para analizar la normalidad y homogeneidad de la varianza en los datos se aplicaron pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Levene, respectivamente (Zar, 1999; Garson, 2012). Dado que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad, se utilizó la prueba Wilcoxon seguida de una U de Mann-Whitney (Zar, 1999). Todos los análisis se realizaron con el paquete R 4.3.3 y la significancia estadística se estableció a $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7. 1 Establecimiento de cultivos celulares primarios

En total se obtuvieron 7 muestras biológicas de 3 especímenes de lobo marino de California. Se levantaron 5 cultivos primarios a partir de las biopsias de *longissimus dorsi* de lobo marino de California (Fig. 4A). Las células satélite fueron visibles al mes de la siembra, con una morfología esférica y un color luminoso, usualmente flotando en el medio (Fig. 4A y B). Dichas células se replicaron y se subcultivaron hasta pase 5. Los mioblastos se distinguieron por su forma fusiforme y su capacidad de fusión para formar miocitos multinucleados. Los cultivos secundarios alcanzaron una confluencia >80% en aproximadamente una semana (Fig. 4C y D). Las células musculares en pases 3 a 5 se emplearon para los bioensayos.

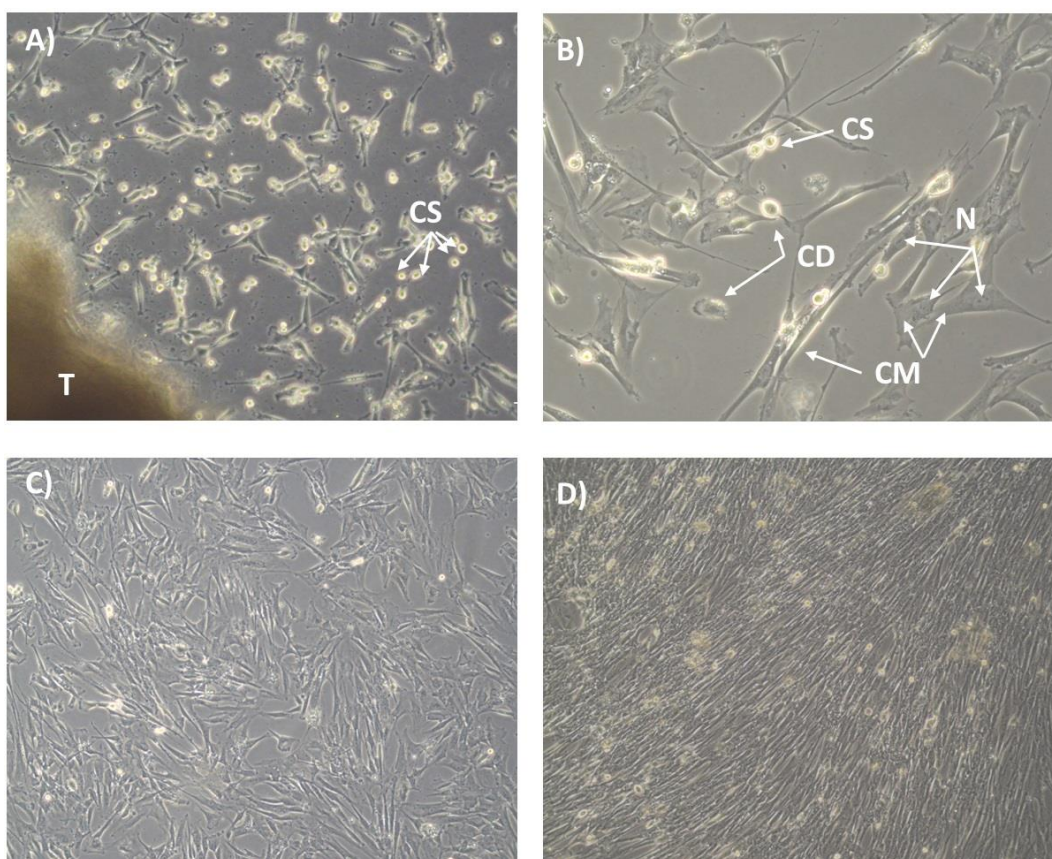


Figura 4. Fotografías del cultivo primario de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) en condiciones control. A) Cultivo primario a un mes desde la siembra con tejido (T) visible, 10X); B) células derivadas de músculo esquelético en pase 3 donde se aprecian células musculares (CM) con núcleos (N) bien formados, células satélite (CS) y células diferenciándose (CD), observación a 20X; C) cultivo a 70% de confluencia, 10X; D) cultivo a 100% de confluencia, a 10X.

Se obtuvieron 3 muestras de tejido de músculo esquelético humano, a partir de las cuales se levantó el cultivo primario (Fig. 5). Las células satélite fueron visibles una semana después de la siembra, mostrando una morfología similar a la observada en el lobo marino de California. Las células musculares se identificaron por su forma fusiforme y alargada una vez adheridas. Al igual que en los cultivos de lobo marino, las células humanas fueron subcultivadas hasta el pase 5, y se utilizaron células en los pases 3 a 5 para bioensayos (Fig. 5). A diferencia del lobo marino, las células derivadas de músculo esquelético de humano alcanzaron una confluencia >80% en aproximadamente 5 días.

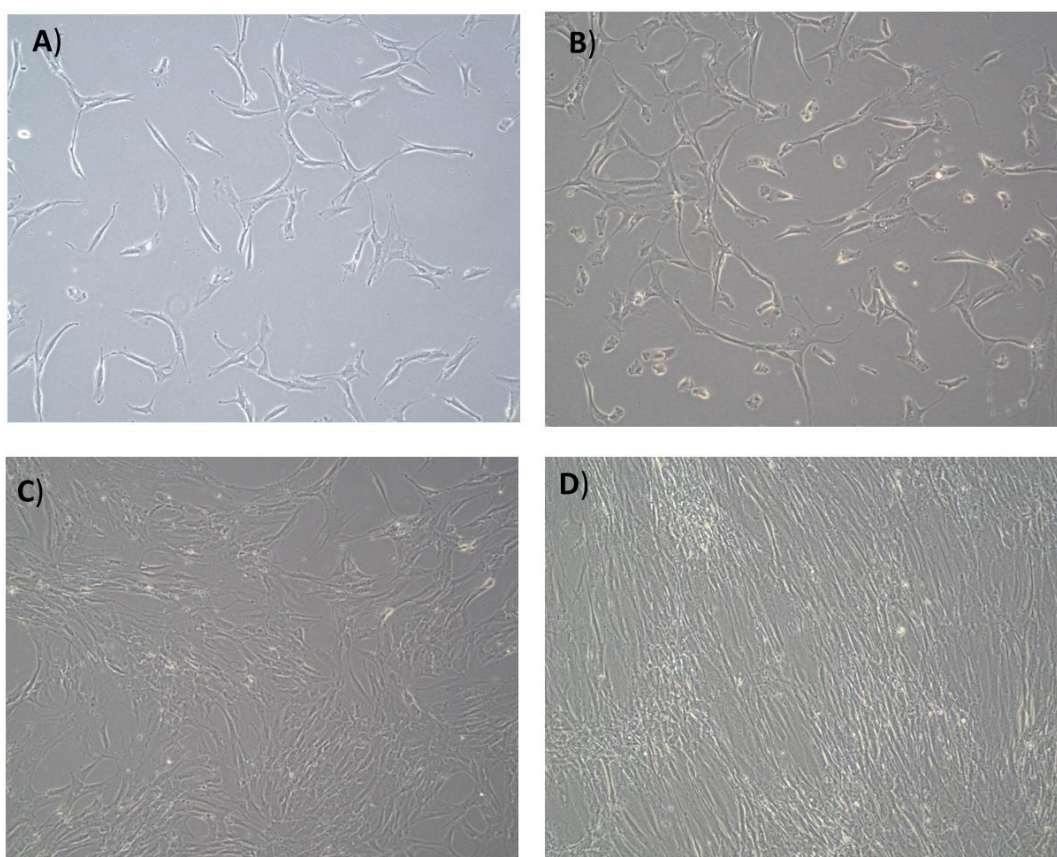


Figura 5. Fotografías del cultivo primario de células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*) en condiciones control. A) Cultivo primario a las dos semanas desde la siembra, observación a 10X; B) células musculares en pase 1, confluencia de 25%, observación a 10X; C) cultivo en pase 1, a 60% de confluencia, 10X; D) cultivo en pase 3, a 100% de confluencia, observación a 10X.

7.2 Extracción de ADN plasmídico pBABE

Luego de cultivar en 3 placas Petri, y 5 réplicas en cultivo líquido, se obtuvieron 10 muestras que se usaron para estimar la relación de cuánto material se requiere cultivar para extraer la cantidad de ADN plasmídico que se necesita para la transfección. Usando un Nanodrop, se cuantificaron las concentraciones y las tasas de absorbancia a las longitudes de onda (260/280 nm y 260/230 nm) que se utilizan como indicadores de pureza (Conde-Guerrero, 2019). Una muestra se desechó por contaminación. A excepción de la relación de absorbancias 260/280 nm en la muestra 4 (1.66), los demás valores de tasas indican extracción y pureza óptimas. Las muestras cuya relación de absorbancias indicó contaminación no fueron utilizadas en la transfección.

Tabla 1. Concentraciones y tasas de absorbancia de las extracciones de ADN plasmídico con SV40 LT. Las concentraciones se midieron en microgramos por mililitro ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Las tasas de absorbancia se midieron a longitudes de onda de 260/280 nm y 260/230 nm, que son comúnmente utilizadas para evaluar la pureza del ADN. La relación de absorbancia ideal para sugerir pureza en el ADN extraído es ~ 1.8 . El valor marcado con un asterisco (*) indica una posible contaminación; esta muestra no fue usada en la transfección.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	260/280 nm	260/230 nm
1	453.4	1.93	2.22
2	514.5	1.89	2.24
3	597.5	1.95	2.08
4	4297.6	1.66*	1.81
5	2494.7	2.11	2.27
6	737.4	1.92	2.18
7	5689.4	1.88	2.05
8	531.1	1.92	2.02
9	348.9	1.92	2.04
10	1257.3	1.98	2.24
11	1599.6	1.95	2.31
12	2217.6	1.94	2.13
13	1706.6	1.95	2.26
14	1474.4	1.97	2.31
15	2339.5	2.02	2.35

7.3 Prueba de citotoxicidad con puromicina

7.3.1 Lobo marino de California

Para hacer las pruebas de citotoxicidad, las células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California se expusieron a 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 y 2.5 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$ por triplicado, en cajas T (12.5 cm^2). Se evaluó la confluencia de los cultivos por 12 días, y se estimó la viabilidad celular en los días 6, 9 y 12. A concentraciones elevadas (1 y 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ puromicina), las células comenzaron a perder su forma y tamaño desde las 24h de exposición (Fig. 6). Entre el sexto y noveno día, a 0.25 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$ la confluencia se mantuvo por arriba del 50%, mientras que a 0.5 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$ la confluencia se estimó alrededor de 10% (Fig. 7A y 7B). No se detectaron células viables a partir del sexto día en concentraciones de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o mayores (Fig. 8; Tabla 2).). Por lo anterior, se seleccionó la dosis de 1 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$ de por un periodo de 6 a 10 días para distinguir a las células transfectadas.

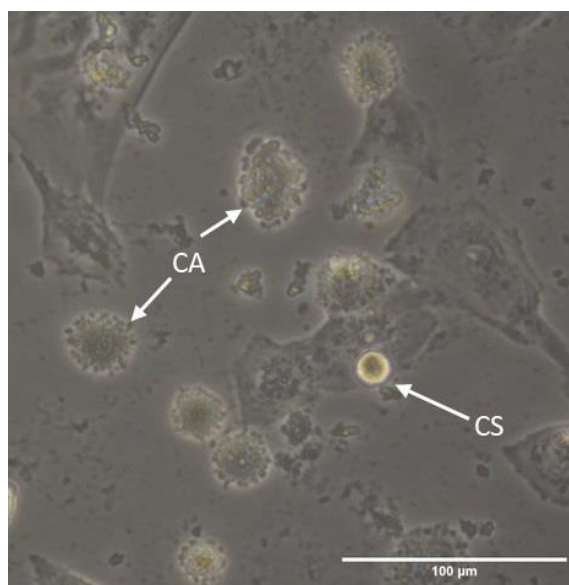


Figura 6. Microfotografía del cultivo primario de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuesto a 0.5 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$. Observación a 40X. CS, célula satélite; CA, células en aparente proceso de apoptosis.

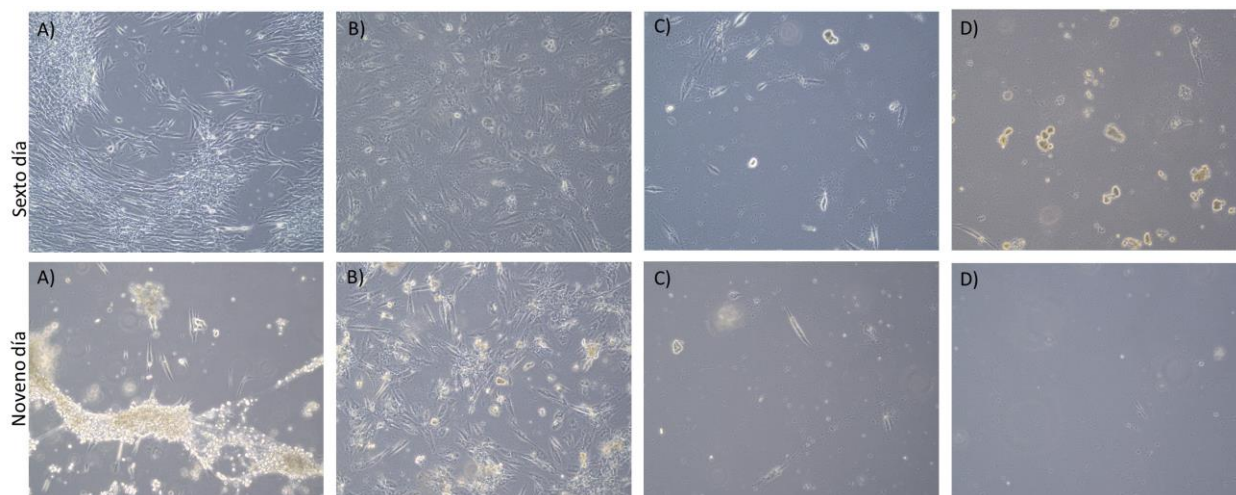


Figura 7. Fotografías del cultivo primario de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*). Observaciones a los 6 y 9 días de exposición a puromicina. A) Control (sin puromicina); B) 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; C) 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; D) 0.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Observación a 10X.

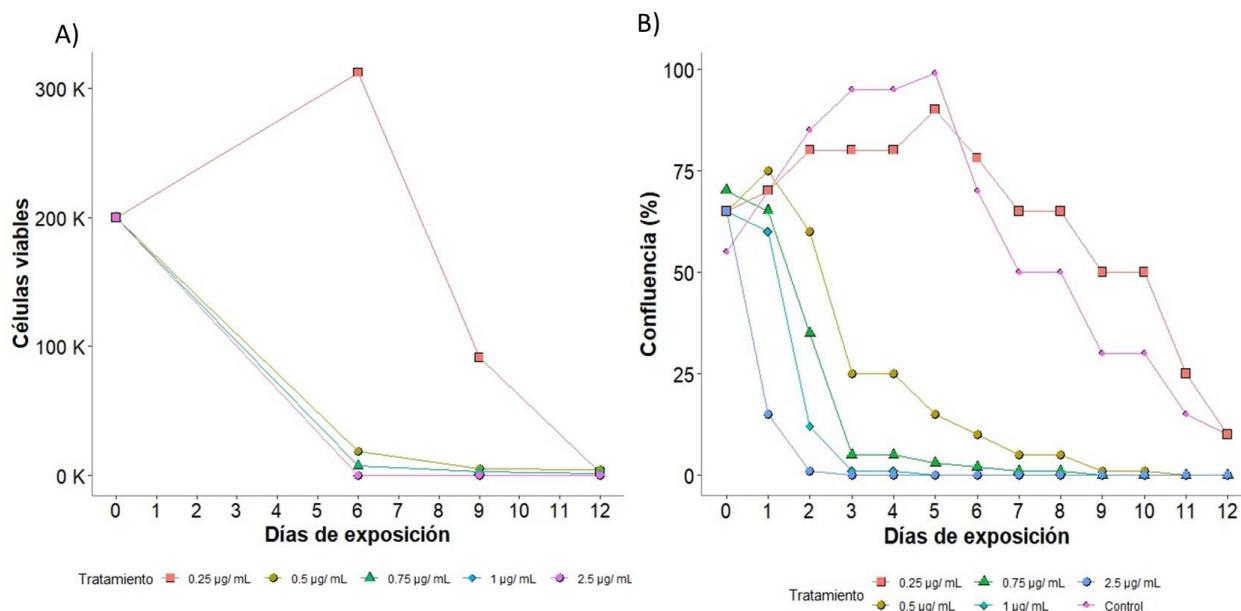


Figura 8. (A) Viabilidad celular y (B) confluencia del cultivo primario de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) tras la exposición a diferentes concentraciones de puromicina durante 12 días. La letra K después de la cifra representa miles.

Tabla 2. Número de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) viables después de la exposición a distintas concentraciones de puromicina por 12 días. Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar.

Dosis ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sexto día	Noveno Día	Doceavo día
0	993750 \pm 10606	346875 \pm 88609	37812.5 \pm 16844
0.25	312500 \pm 88388.3	91458.3 \pm 65757.2	2604.1 \pm 2352.4
0.5	18750 \pm 0	5625 \pm 6495.1	4687.5 \pm 1875
0.75	7500 \pm 0	2812.5 \pm 3590	1875 \pm 2650
1	0	0	0
2.5	0	0	0

7.3.2 Humano

Para hacer las pruebas de citotoxicidad, las células derivadas de músculo esquelético de humanos se expusieron a 0, 0.25, 0.5 y 1 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$ por triplicado, en cajas T (12.5 cm^2). Se evaluó la confluencia de los cultivos por 11 días, y se estimó la viabilidad celular en los días 4, 7 y 11 de exposición. Se observó una leve disminución en la confluencia a las 24 h de exposición en todas las concentraciones de puromicina (Fig. 9). A partir del tercer día, la confluencia observada en los cultivos sometidos a 1 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$ bajó un 35% (Fig. 9 y 11); es decir, un tercio de la confluencia observada en los cultivos primarios mantenidos bajo condiciones control.

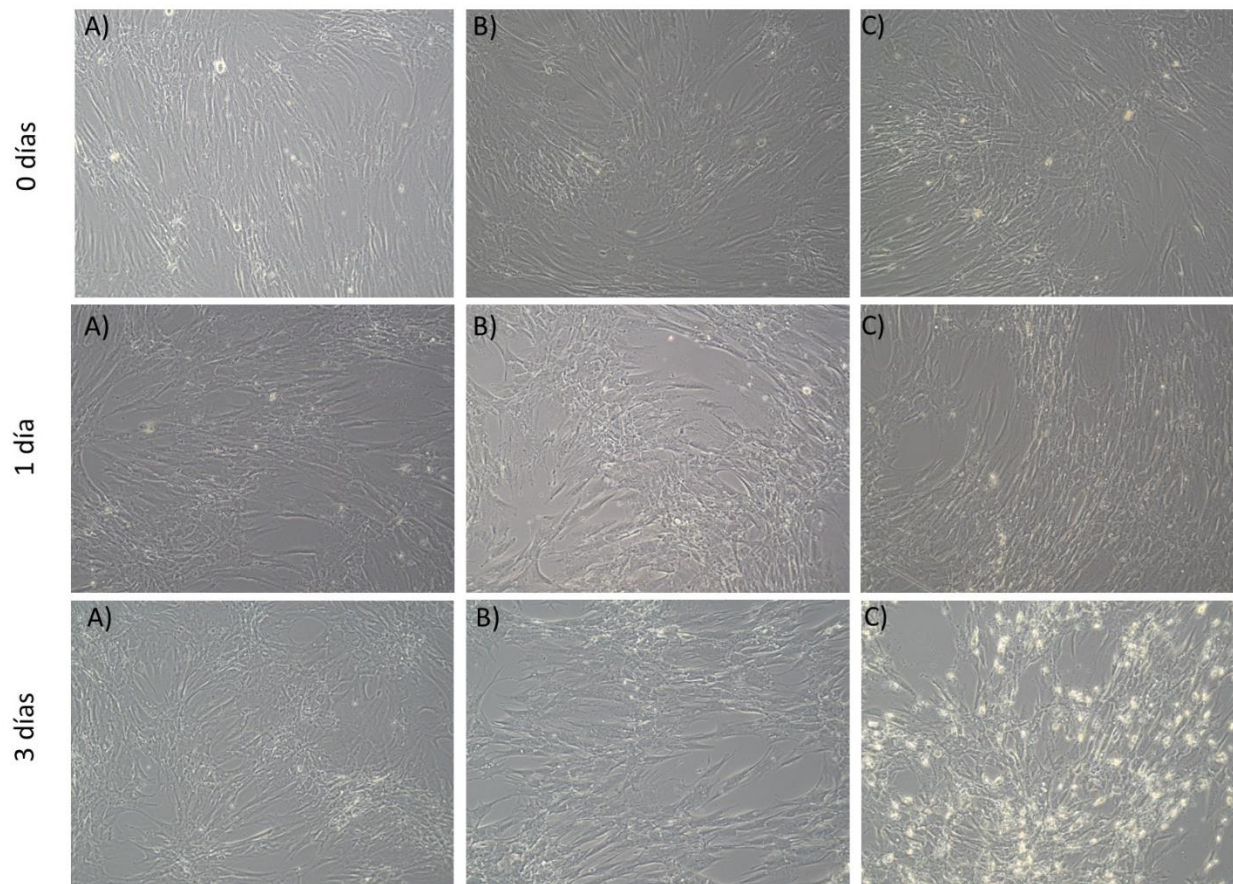


Figura 9. Fotografías del cultivo primario de células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*). Observaciones a los 0, 1 y 3 días de exposición a A) 0.25 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$ B) 0.5 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$, y C) 1 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$ puromicina. Observación a 10X

Para el cuarto día de exposición, la viabilidad estimada de los cultivos de células derivadas de músculo esquelético de humano expuestos a 1 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$ correspondió al 1% en comparación con las condiciones control (Tabla 3). En las concentraciones más bajas (0.25 y 0.5 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$) la confluencia se mantuvo por arriba del 50% (Fig. 10 y 11). Del séptimo día al término del bioensayo (día 7), la confluencia observada en los cultivos expuestos a 0.25 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$ aumentó gradualmente, igualando a los cultivos mantenidos en condiciones control para el final del bioensayo. Por el contrario, a 0.5 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$ la confluencia disminuyó gradualmente, hasta llegar a un 20% al undécimo día (Fig. 11). A partir del séptimo día, no se detectaron células viables a 1 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$ (Fig. 11 y Tabla 3). Por estas razones, se seleccionó la dosis de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de puromicina por un periodo de 7 a 10 días para detectar las células transfectadas.

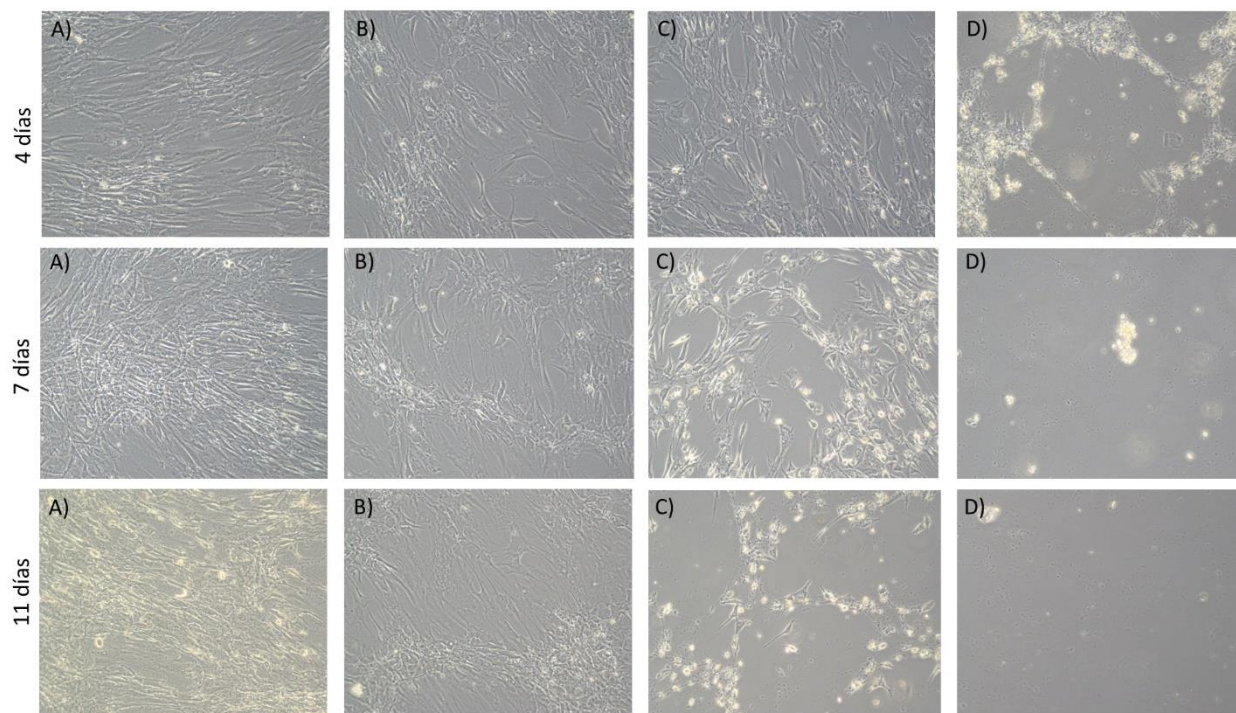


Figura 10. Fotografías del cultivo primario de células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*) Observaciones a los 4, 7 y 11 días de exposición a A) 0 μg puromicina mL^{-1} ; B) 0.25 μg puromicina mL^{-1} ; C) 0.5 μg puromicina mL^{-1} ; D) 1 μg mL^{-1} puromicina. Observación a 10X.

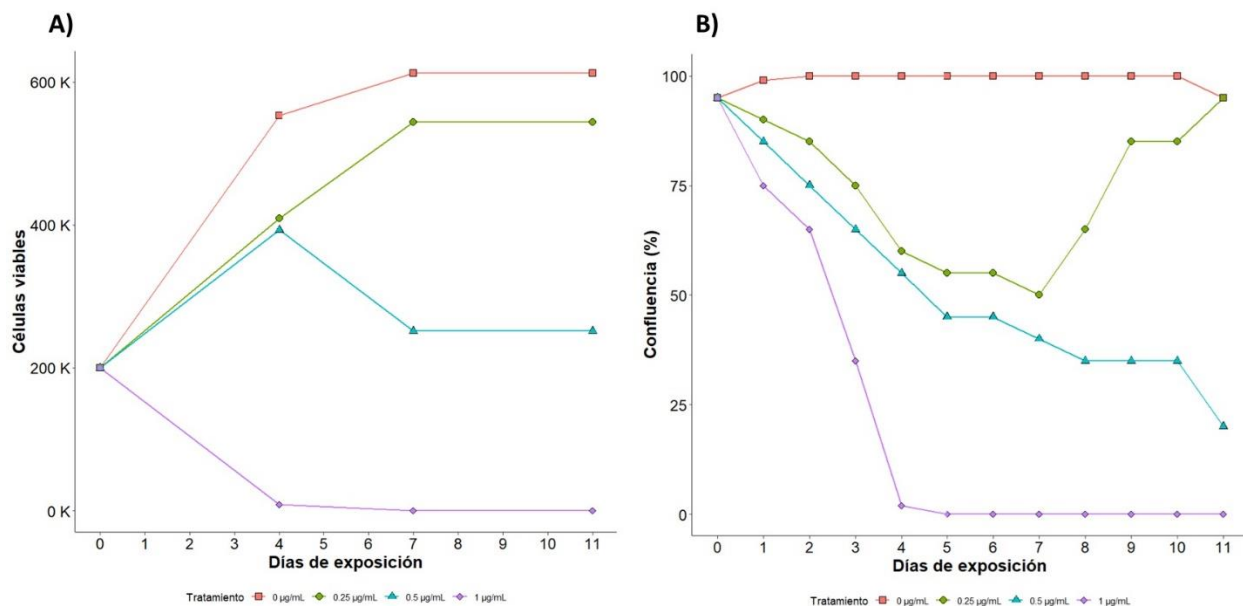


Figura 11. (A) Viabilidad celular y (B) confluencia del cultivo primario de células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*) expuestas a diferentes concentraciones de puromicina por 11 días. La letra K después de la cifra representa miles.

Tabla 3. Número de células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*) viables expuestas a distintas concentraciones de puromicina por 11 días. Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar.

Dosis ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Cuarto día	Séptimo día	Onceavo día
0	553125 \pm 306929	612500 \pm 27195	612500 \pm 76569
0.25	409375 \pm 211240.1	543750 \pm 321049.7	543750 \pm 43879.2
0.5	392812.5 \pm 219332.2	251250 \pm 125573.6	251250 \pm 20625
1	8437.5 \pm 7098.6	0	0

7.4 Transfección de células derivadas de músculo esquelético

7.4.1 Lobo marino de California

Para establecer una línea celular inmortalizada de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California, se llevó a cabo la transfección en 12 réplicas (cajas T 12.5 cm²) a una concentración de 7.5 $\mu\text{g ADNp mL}^{-1}$. Los cultivos resultantes fueron sometidos por 10 días a 1 $\mu\text{g puromicina mL}^{-1}$. Luego de este periodo, se alimentaron los cultivos transfectados con medio de alimentación completo y fueron subcultivados a la semana del término del bioensayo con puromicina (Fig. 12). Posteriormente, se llevó a cabo mantenimiento básico del cultivo, llegando a un 65% de confluencia a las dos semanas del término de la exposición a puromicina (14 días) (Fig. 13A). Este nivel de confluencia se mantuvo por aproximadamente 10 días (24 días después de la exposición a puromicina) con la aparición de posibles cúmulos de células satélites y desecho celular (Fig. 13B). La confluencia decayó a menos de 50% en sólo 3 días (27 días desde el bioensayo con puromicina). Se congeló la mitad de la biomasa restante ($1.17 \times 10^6 \pm 1.16 \times 10^5$ células) a -80°C , el resto fue repartido en 8 cajas T (25 cm²).

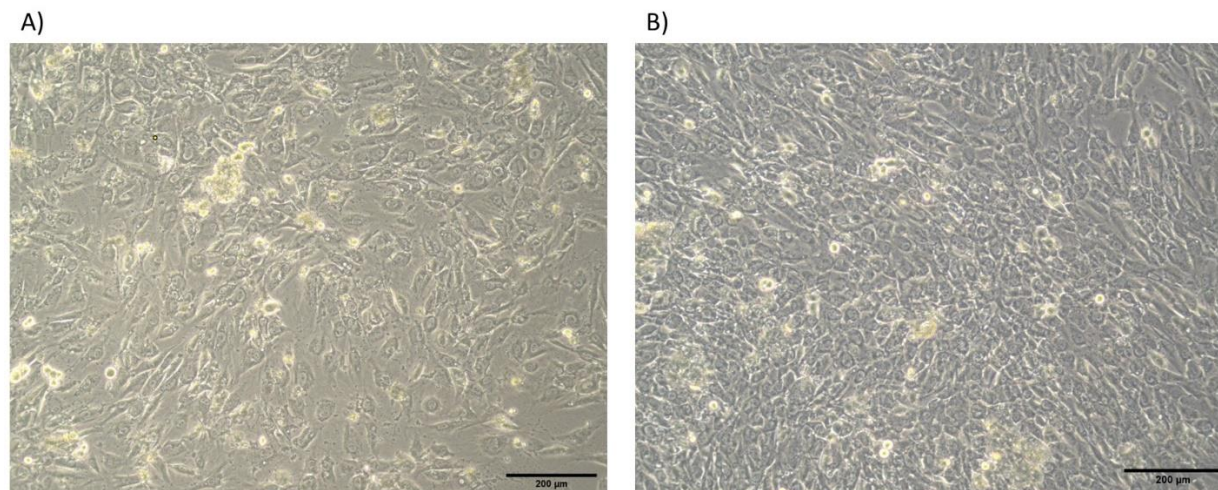


Figura 12. A) Células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) transfectadas y en el último día de exposición a $1 \mu\text{g puromicina mL}^{-1}$. B) Células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California transfectadas y a los 7 días de mantenimiento después de exposición a $1 \mu\text{g puromicina mL}^{-1}$. Observación a 10X.

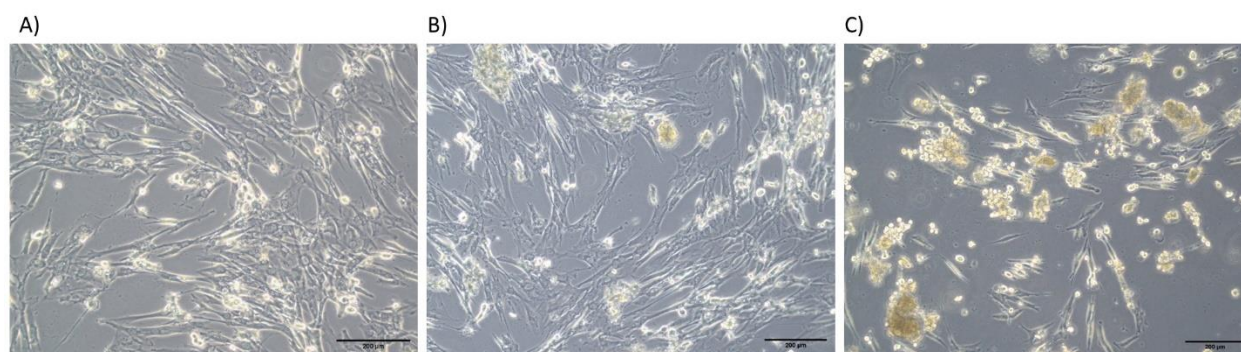


Figura 13. A) Células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) transfectadas, dos semanas (14 días) posterior a la exposición a $1 \mu\text{g puromicina mL}^{-1}$; se observa confluencia al 65%. B) Células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California transfectadas, tres semanas (21 días) posterior a la exposición a $1 \mu\text{g puromicina mL}^{-1}$, la confluencia se mantuvo a 65%. C) Células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California transfectadas 24 días posterior a la exposición a $1 \mu\text{g puromicina mL}^{-1}$; se observa disminución de la confluencia a 40%. Observación a 10X.

A partir de este punto, es decir, 28 días después de terminado el bioensayo con puromicina, el cultivo de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California transfectadas presentó un crecimiento lento y se observaron anomalías morfológicas y desecho celular (Fig. 14). Además, se percibieron células con estructuras que aparentemente corresponden a micronúcleos o vesículas (Fig. 14C). Estas células mantuvieron una confluencia baja (en promedio

de 10%) por aproximadamente dos semanas (42 días desde la exposición con puromicina). Para eliminar el desecho celular se hicieron lavados con PBS en cada recambio. Subsecuentemente, la confluencia del cultivo de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California transfectadas disminuyó significativamente (Fig. 15). A los 50 días de haber terminado la exposición con puromicina, se estimó <1% de confluencia en las células derivadas de músculo esquelético transfectadas (Fig. 15B). Las células que permanecieron adheridas presentaron formación de cuerpos extraños (Fig. 16); la producción de desecho celular se mantuvo. Se congeló lo restante de células (~15,000 células) a -80°C para su posterior análisis.

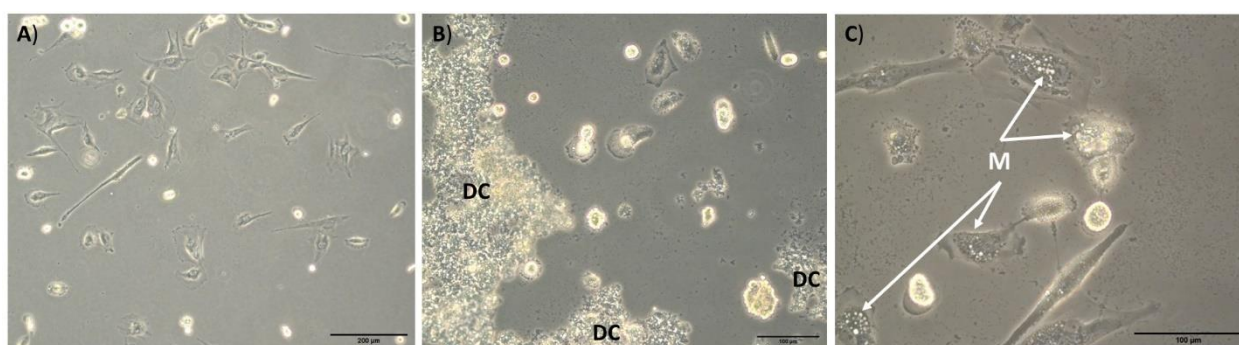


Figura 14. Células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) transfectadas a 42 días de haber terminado la exposición con puromicina. A) Confluencia < 10%; observación a 10X. B) Aparente desecho celular (DC); observación a 20X. C) Cuerpos extraños o micronúcleos (M); observación a 40X.

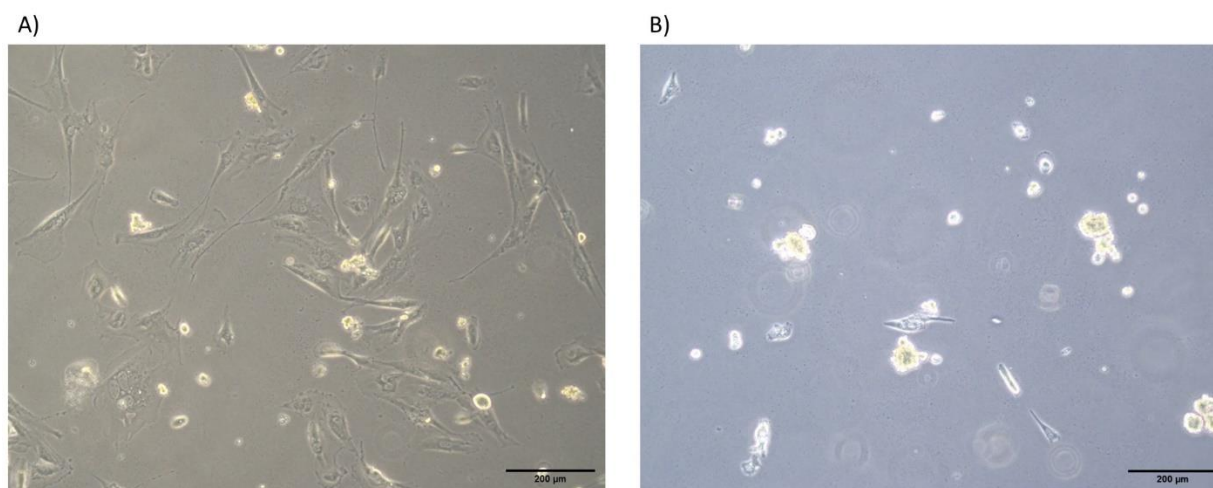


Figura 15. A) Células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) transfectadas a 47 días del término de la exposición a puromicina. B) Cultivo 3 días después de la foto anterior (50 días desde la exposición a puromicina). Observación a 10X.

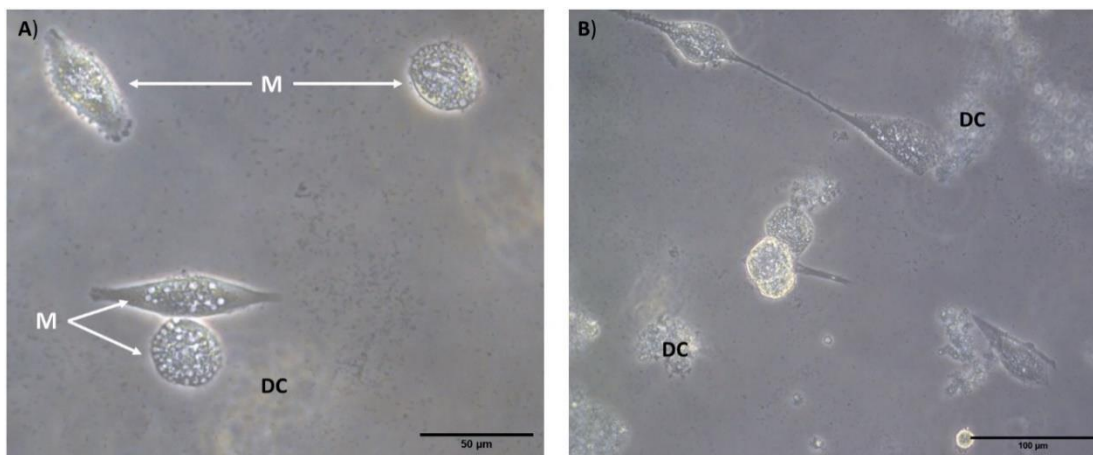


Figura 16. Células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californinus*) transfectadas. M, cuerpos extraños o micronúcleos; DC, desecho celular. Observación a 40X.

7.4.2 Humano

Se llevaron a cabo 2 ensayos de transfección en células derivadas de músculo esquelético de humano. En el primero, 12 réplicas (cajas T 12.5 cm²) fueron transfectadas a una concentración de 7.5 µg ADNp mL⁻¹ y expuestas a 1 µg puromicina mL⁻¹ por 7 días. A lo largo de este periodo, la confluencia en los cultivos transfectados decayó, con menos de 1% de células sobrevivientes al final del tratamiento (Fig 17). En el segundo ensayo, se utilizaron 15 réplicas con la misma concentración de ADNp. Por 7 días las células derivadas de músculo esquelético de humano transfectadas se expusieron a dos concentraciones; 7 réplicas a 0.75 µg puromicina mL⁻¹ y las restantes 8 a 1 µg puromicina mL⁻¹. Antes de la exposición a puromicina, se observaron anomalías morfológicas como *debris celular* en el medio, la apariencia de rupturas en el citoplasma de las células y una disminución en confluencia respecto al día que se llevó a cabo la transfección (Fig. 18 y 19). Durante el tratamiento con puromicina, estas características persistieron, y la confluencia fue inferior al 1% para el final del ensayo (Fig. 18E). De todas las réplicas, sólo una, tratada con 1 µg puromicina mL⁻¹, tuvo un parche de células que sobrevivió, las restantes tuvieron el mismo comportamiento que el ensayo anterior. Las células transfectadas siguen en mantenimiento; sin embargo, la biomasa hasta el momento sigue siendo baja, con una confluencia de menos del 1% (Fig. 18F).

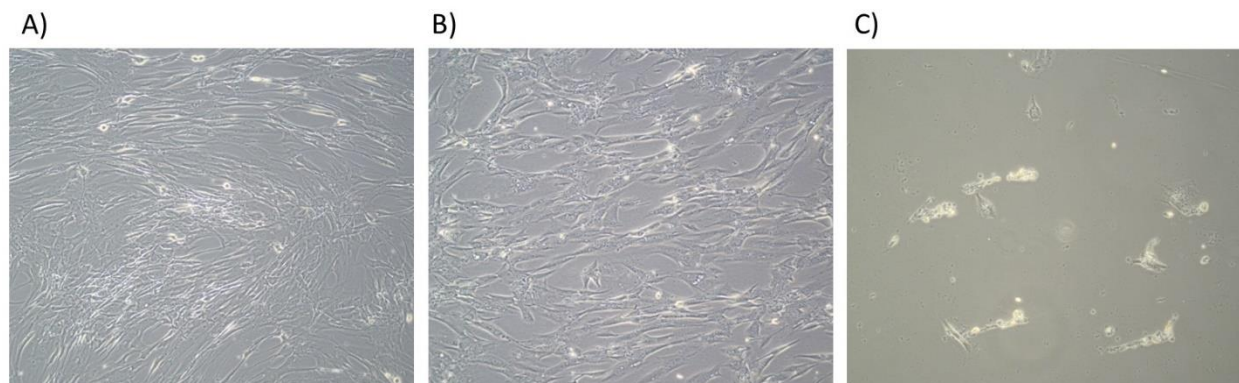


Figura 17. Células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*) en el primer ensayo de transfección. A) Previo a la exposición a puromicina; B) 1 día después de la exposición a $1 \mu\text{g puromicina mL}^{-1}$; C) 5 días después de la exposición a $1 \mu\text{g puromicina mL}^{-1}$. Observaciones a 10X.

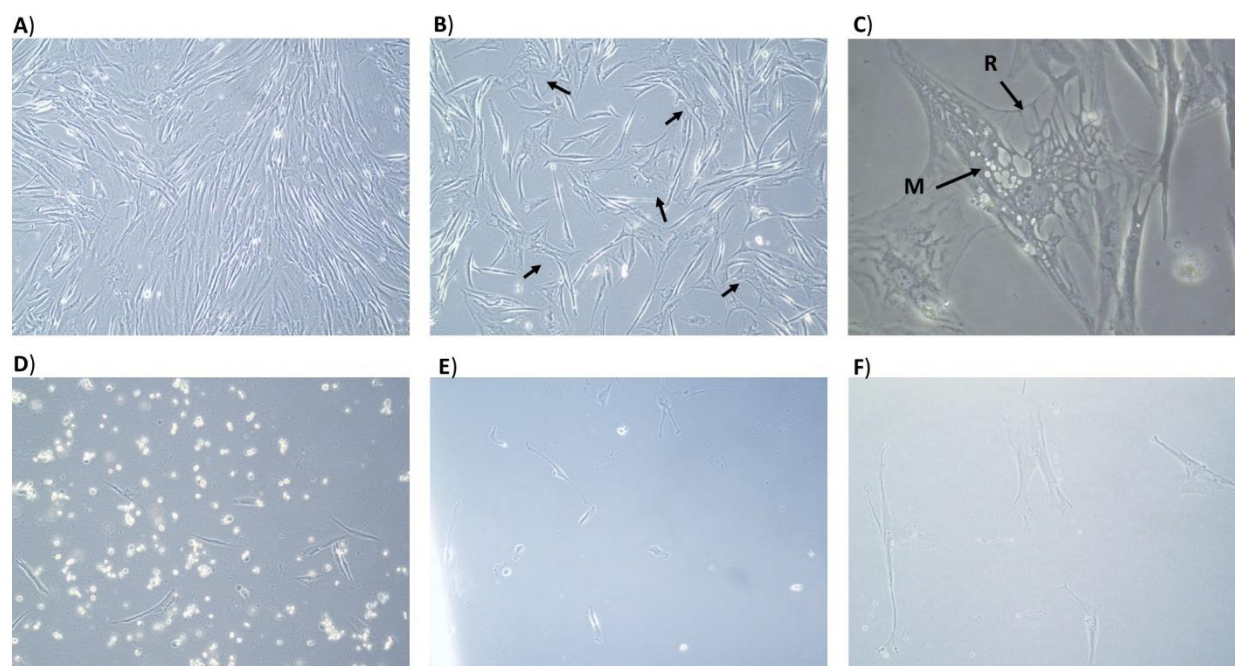


Figura 18. Células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*) en el segundo ensayo de transfección. A) Día de la transfección, 10X; B) Antes del tratamiento con puromicina y posterior a la transfección, las flechas marcan las células con la apariencia de rupturas en citoplasma, 10x; C) Antes del tratamiento con puromicina y posterior a la transfección, 40X; D) Cultivo en el tercer día de exposición a $1 \mu\text{g puromicina mL}^{-1}$, 10X; E) Cultivo en el séptimo día de exposición a $1 \mu\text{g puromicina mL}^{-1}$, 10X; F) 20 días posteriores al tratamiento con puromicina. M, cuerpos extraños o micronúcleos, R, apariencia de ruptura en el citoplasma.

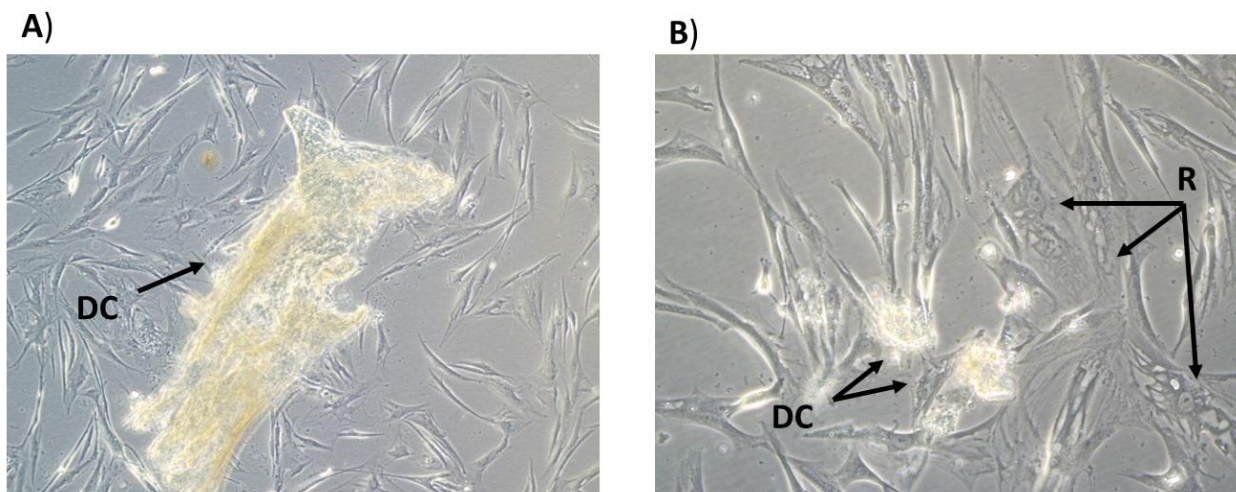


Figura 19. Células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*) en el segundo ensayo de transfección. Antes del tratamiento con puromicina y posterior a la transfección. A) 10x, 10X; B) 20X. DC, *debris celular*, R, apariencia de rupturas en el citoplasma.

7.5 Análisis de los indicadores de estrés oxidativo en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*)

7.5.1 Producción de $O_2^{\bullet-}$ y daño oxidativo

La producción de $O_2^{\bullet-}$ en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) bajo condiciones control fue en promedio $0.1986 \pm 0.145798 \mu\text{moles mg}^{-1}$ de proteína min^{-1} . No se encontraron diferencias significativas al comparar estos datos con aquellos obtenidos en las células transfectadas con SV40 LT ($0.4108 \pm 0.2187 \mu\text{moles } O_2^{\bullet-} \text{ mg}^{-1}$ de proteína min^{-1} ; Mann Whitney-Wilcoxon, $W=11$, $p=0.09$) (Fig. 20A). El daño oxidativo a lípidos, cuantificado como los niveles de TBARS, estuvo por debajo del límite de detección, tanto en las células mantenidas bajo condiciones control como en las células transfectadas. En contraste, la concentración de carbonilos proteicos, indicador de daño oxidativo a proteínas, fue 3.9 veces mayor en células transfectadas ($37961.94 \pm 10139.84 \mu\text{moles mg}^{-1}$ de proteína) que en aquellas mantenidas en condiciones control ($10453.69 \pm 4589.89 \mu\text{moles mg}^{-1}$ de proteína) (prueba de Mann Whitney-Wilcoxon, $W=0$, $p=0.00066$) (Fig. 20B).

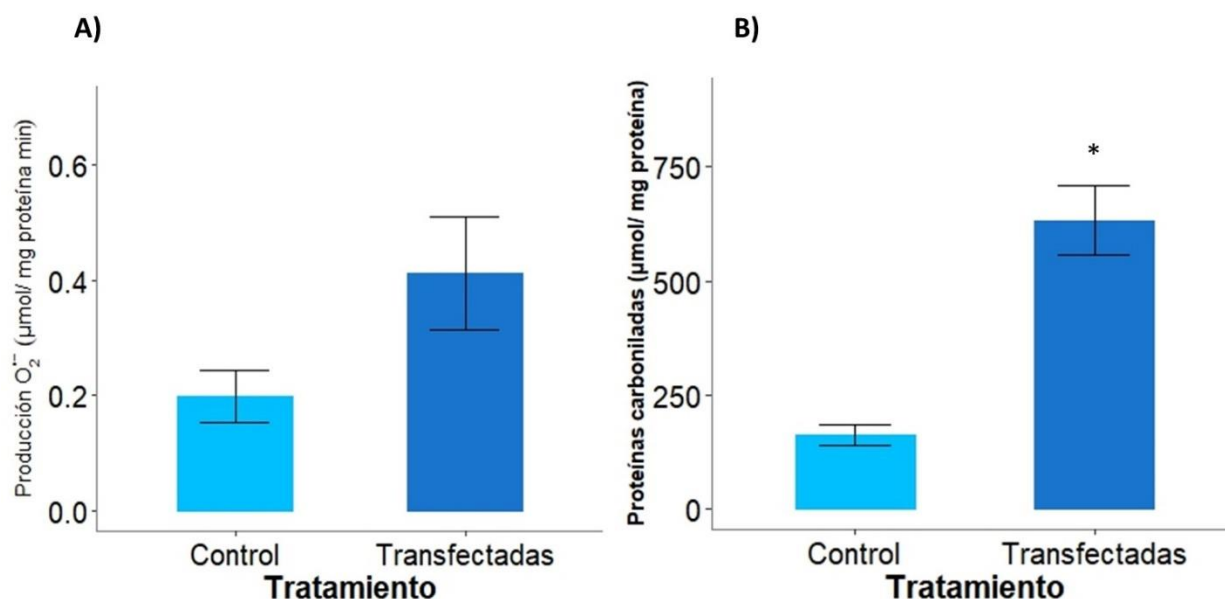


Figura 20. A) Producción de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$, $\mu\text{moles mg}^{-1}$ de proteína min^{-1}) y B) concentración de carbonilos proteicos ($\mu\text{moles mg}^{-1}$ de proteína) en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) mantenidas en condiciones control y después de ser transfectadas con SV40 LT. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. *Denota diferencias significativas ($p < 0.05$).

7.5.2 Defensas antioxidantes

Los resultados de la actividad de las enzimas antioxidantes en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California mantenidas bajo condiciones control y después de ser transfectadas se muestran en la figura 21 y tabla 4. La actividad de SOD fue 2.3 veces mayor (prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W=7$, $p=0.027$) y la actividad de GST fue 6.1 veces mayor (prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W=7$, $p=0.027$) en células transfectadas que en células mantenidas bajo condiciones control. En cambio, la actividad de CAT fue 6.9 veces menor en células transfectadas en comparación con aquellas mantenidas bajo condiciones control (prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W=48$, $p=0.002664$).

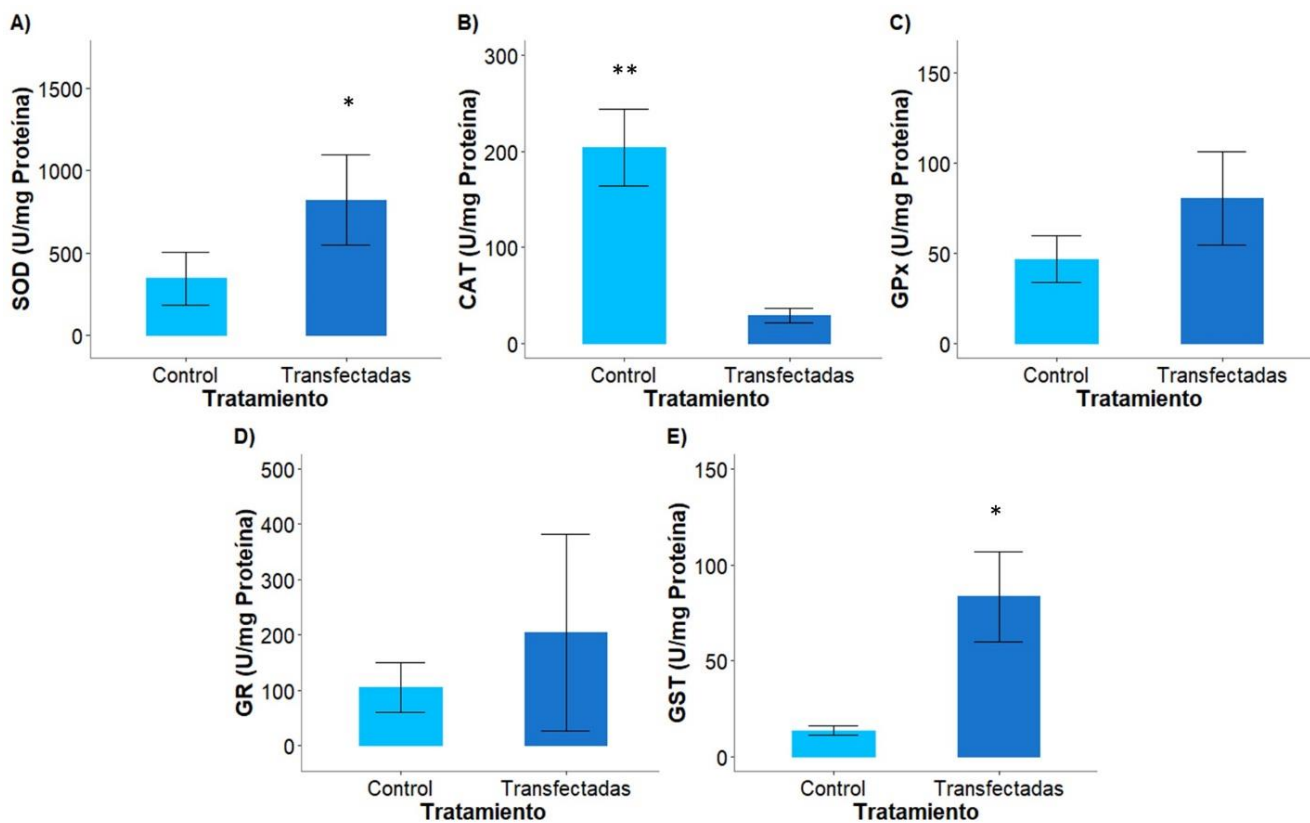


Figura 21. Actividad (unidades mg^{-1} de proteína) de A) SOD, superóxido dismutasa, B) CAT, catalasa, C) GPx, glutatión peroxidasa, D) GR, glutatión reductasa, E) GST, glutatión S-transferasa en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) en condiciones control y después de ser transfectadas con SV40 LT. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. *Denota diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 4. Actividad de enzimas antioxidantes en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) bajo condiciones de cultivo primario o control y después de ser transfectadas con SV40 LT. La actividad enzimática se expresa en unidades por miligramo de proteína.

Enzima	Tratamiento	Promedio	Desv. Std.	Min	Max	N
SOD	Control	344.07	507.74	30.63	1599.26	10
	Transfectadas*	684.59*	609.71*	375.88	1661.46	5
CAT	Control	204.27	125.93	52.20	477.83	10
	Transfectadas*	29.36	16.09*	13.11	56.10	5
GPx	Control	46.76	40.99	9.87	145.25	10
	Transfectadas	80.61	57.81	35.88	180.82	5
GR	Control	104.94	143.33	18.01	485.17	10
	Transfectadas	204.72	421.07	20.38	910.77	5
GST	Control	13.66	7.90	1.13	24.52	10
	Transfectadas*	83.47*	52.85*	11.74	154.98	5

Desv. Std., desviación estándar; Min, mínimo; Max, máximo; SOD, Superóxido dismutasa; CAT, Catalasa; GPx, Glutación peroxidasa; GR, Glutación reductasa; GST, Glutación S-Transferasa. *Denota diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

7.6 Análisis de los indicadores de estrés oxidativo en células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*)

7.6.1 Producción de $O_2^{\bullet-}$ y daño oxidativo

Los datos de producción de $O_2^{\bullet-}$ en células derivadas de músculo esquelético de humano bajo condiciones control se encuentran en la tabla 5. En virtud de la falta de biomasa suficiente, no se pudieron realizar los análisis de producción de $O_2^{\bullet-}$ y daño oxidativo en células derivadas de músculo esquelético de humano después de la transfección.

Tabla 5. Producción de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$, $\mu\text{moles mg}^{-1}$ de proteína min^{-1}) y concentración de carbonilos proteicos ($\mu\text{moles mg}^{-1}$ de proteína) en células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*) mantenidas bajo condiciones control. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar.

	Promedio	Desv. Std.	Min	Max	N
$O_2^{\bullet-}$	0.0330	0.023859	0.000233	0.073477	10
Carbonilos proteicos	228.47	144.78	41.010	484.14	10

Desv. Std., desviación estándar; Min, mínimo; Max, máximo; $O_2^{\bullet-}$, producción de radical superóxido.

7.6.2 Defensas antioxidantes

Los datos de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GR y GST en células derivadas de músculo esquelético de humano bajo condiciones control se resumen en la tabla 6. En virtud de la falta de biomasa suficiente, no se pudieron realizar los análisis de la actividad de las enzimas antioxidantes en células derivadas de músculo esquelético de humano después de la transfección.

Tabla 6. Actividad de las enzimas antioxidantes en células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*) mantenidas bajo condiciones control. La actividad enzimática se expresa en unidades por miligramo de proteína.

Enzima	Promedio	Desv. Std.	Min	Max	N
SOD	714.11	130.14	497.75	939.30	10
CAT	61.96	15.78	33.90	92.66	10
GPx	196.59	151.96	41.38	438.86	10
GR	201.85	98.99	45.06	371.12	10
GST	93.49	32.90	28.13	142.55	10

Desv. Std., desviación estándar; Min, mínimo; Max, máximo; Superóxido dismutasa, SOD; Catalasa, CAT; Glutación peroxidasa, GPx; Glutación reductasa, GR; Glutación S-Transferasa, GST.

7.7 Comparación entre especies

7.7.1 Producción de $O_2^{\bullet-}$ y daño oxidativo en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California y humano

Los resultados de la producción de $O_2^{\bullet-}$ y la concentración de proteínas carboniladas en células derivadas de músculo esquelético de humano y lobo marino de California bajo condiciones control se muestran en la figura 22. La producción de $O_2^{\bullet-}$ fue 6 veces mayor en células de lobo marino de California en comparación con las células de humano (prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W=9$, $p = 0.00105$). En contraste, el daño oxidativo a proteínas fue mayor (1.6 veces) para células derivadas de músculo esquelético de humano que en aquellas de lobo marino de California, aunque no se observaron diferencias significativas. Dado que no se pudo obtener suficiente biomasa para realizar los análisis de producción de $O_2^{\bullet-}$ y daño oxidativo en células derivadas de músculo esquelético de humano después de la transfección, no hay datos para hacer la comparación entre especies.

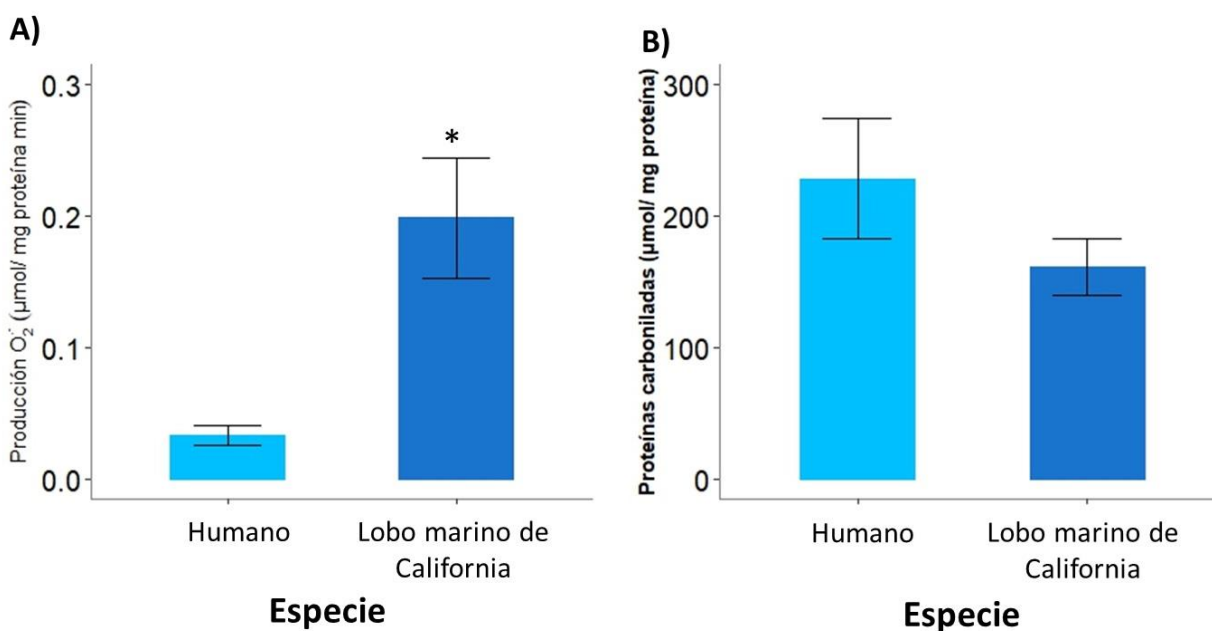


Figura 22. A) Producción de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$, $\mu\text{moles mg}^{-1}$ de proteína min^{-1}) y B) concentración de carbonilos proteícos ($\mu\text{moles mg}^{-1}$ de proteína) en células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) mantenidas bajo condiciones control. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. *Denota diferencias significativas ($p < 0.05$).

7.7.2 Defensas antioxidantes

Los resultados de la actividad de las enzimas antioxidantes de células derivadas de músculo esquelético en condiciones control de lobo marino de California y humano se presentan en la Figura 23. Se encontraron diferencias significativas entre especies para todas las enzimas antioxidantes analizadas. En células de humano, las actividades de SOD, GPx, GR y GST fueron significativamente mayores en comparación con las de lobo marino de California: SOD fue 4.1 veces mayor (prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W=81$, $p = 0.01854$), GPx 3.9 veces mayor (prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W=14$, $p = 0.005196$), GR 1.9 veces mayor (prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W=80$, $p = 0.02323$), y GST fue 6.8 veces mayor (prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W=100$, $p = 0.000001$). En contraste, la actividad de CAT fue 3.2 veces mayor en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W=14$, $p = 0.005196$). Dado que no se pudo obtener suficiente biomasa para realizar los análisis de la actividad de las enzimas antioxidantes en células derivadas de músculo esquelético de humano después de la transfección, no hay datos para comparar entre especies.

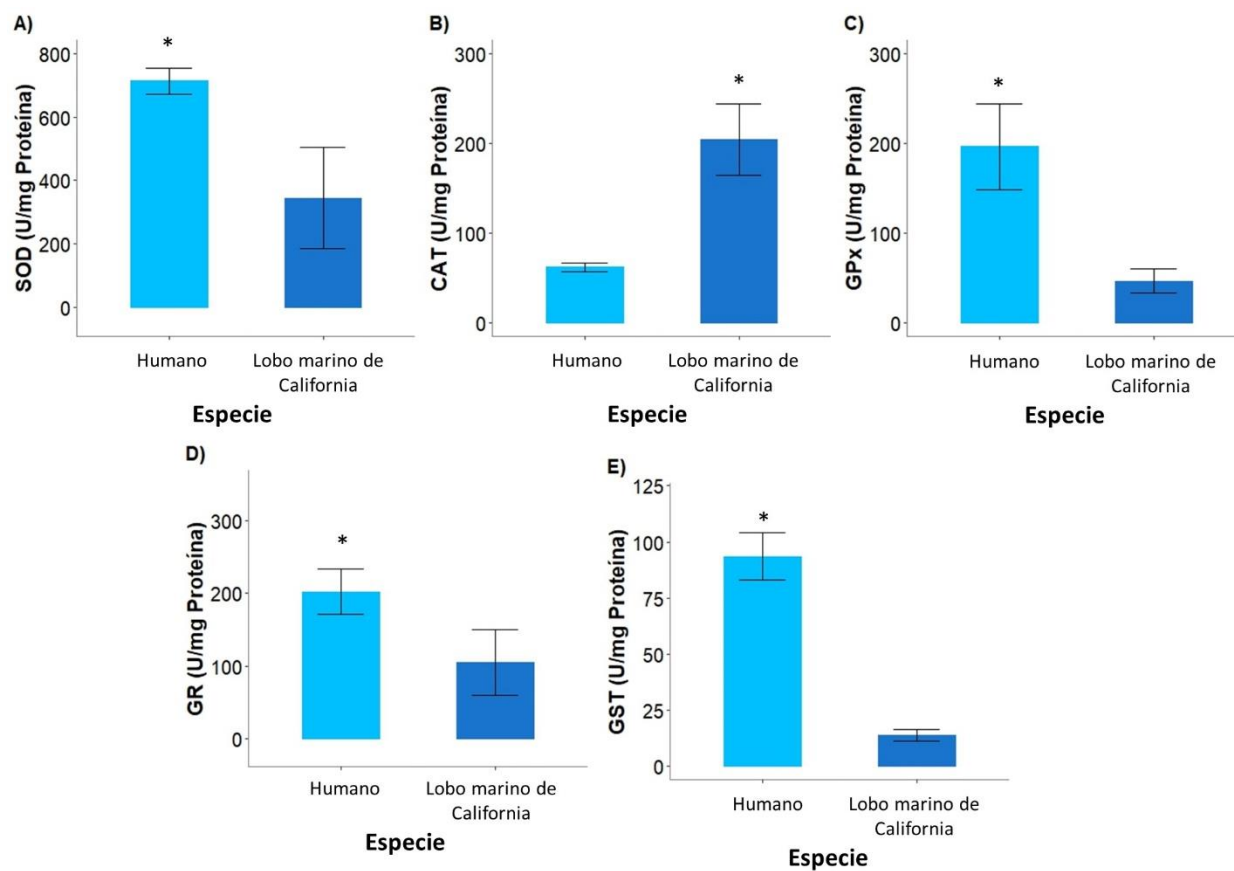


Figura 23. Actividad (unidades mg^{-1} de proteína) de A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT), C) glutatión peroxidasa (GPx), D) glutatión reductasa (GR), E) glutatión S-transferasa (GST) en células derivadas de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) mantenidas bajo condiciones control. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. *Denota diferencias significativas ($p < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

El objetivo de inmortalizar células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California y humano es evaluar su posible uso como modelo *in vitro* para continuar con el estudio de las adaptaciones de los mamíferos marinos a retos como hipoxia e isquemia y su potencial aplicación para atender algunas patologías en humanos. El presente estudio es el primero en reportar el efecto, en términos de los indicadores de estrés oxidativo, de la transfección en células musculares derivadas de lobo marino de California con SV40 LT. Los resultados del presente estudio contribuyen al conocimiento científico sobre los efectos del SV40 LT en los indicadores de estrés oxidativo en células derivadas de músculo esquelético de humano y lobo marino de California.

8.1 Determinación de dosis y tiempo de exposición de puromicina

El plásmido pBABE-puro de Addgene incluye un gen de selección de resistencia a la puromicina (puroR), que codifica la enzima puromicina N-acetil transferasa, producida por la bacteria *Streptomyces alboniger*, y permite a las células transfectadas resistir este antibiótico (Lanza *et al.*, 2013; Piñeiro-Ramil, 2016). Esto facilita la selección de células transfectadas con SV40 LT mediante un tratamiento con puromicina por un periodo determinado. Por lo tanto, se realizaron ensayos en cajas T (12.5 cm²) por triplicado en células derivadas de músculo esquelético en condiciones control utilizando distintas concentraciones de puromicina. El objetivo fue determinar la dosis y el tiempo necesarios para lograr el 100% de mortalidad en cultivos primarios; estos parámetros se aplicaron a las células transfectadas. Se expusieron las células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California a concentraciones de 0 a 2.5 µg puromicina mL⁻¹ por 11 y 12 días (Fig. 12 y 13). Considerando la variación en la confluencia y la estimación de la viabilidad celular de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (Fig. 13), se observó que las concentraciones menores a 0.75 µg puromicina mL⁻¹ solamente eliminaron el 80% de las células musculares de lobo marino en cultivo primario con respecto al control. La concentración mínima de puromicina que eliminó el 100% del cultivo fue de 1 µg mL⁻¹ (Fig. 14). Por lo tanto, ésta es la concentración de puromicina que se utilizó por un

periodo de 10 días para la selección de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California transfectadas.

Arendel *et al.* (2017) seleccionaron las células musculares de humano transfectadas con 0.2 μg puromicina mL^{-1} por 8 días. Por lo anterior, y con base en los resultados obtenidos para células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California en el presente estudio, se probaron concentraciones de 0.25 a 1 μg puromicina mL^{-1} en células derivadas de músculo esquelético de humano. Las concentraciones de 0.25 y 0.5 μg puromicina mL^{-1} eliminaron el 95% de las células musculares de humano en cultivo primario en los 11 días que duró el ensayo (Fig. 13 y 14). La concentración que eliminó el 100% de las células musculares de humano en cultivo fue 1 μg puromicina mL^{-1} en 7 días (Fig. 14 y 15; tabla 3). Por lo que esta concentración de puromicina se utilizó por 7 días en la selección de células derivadas de músculo esquelético de humano transfectadas.

La diferencia en el tiempo requerido y la sensibilidad de las células derivadas de músculo esquelético de humano y de lobo marino de California al tratamiento con puromicina podría estar relacionada con características intrínsecas de cada tipo celular. Estas incluyen diferencias en su tasa de proliferación, metabolismo celular, mecanismos de reparación del ADN, y susceptibilidad al estrés (Jackson y Bartek, 2009; Vander-Heiden *et al.*, 2009) inducido, en este caso, por la puromicina. Las células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California fueron más resistentes al antibiótico de selección (10 días a 1 μg puromicina mL^{-1}), probablemente relacionado a mayores defensas antioxidantes, en particular CAT, en comparación con humano (Wilhem-Filho *et al.*, 2002; Zenteno-Savín *et al.*, 2002; este estudio). En condiciones control, la producción de O_2^{\bullet} fue significativamente mayor en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California que de humano (Fig. 20). Sin embargo, el daño oxidativo a proteínas fue mayor (1.6 veces) en células derivadas de músculo esquelético de humano que del lobo marino de California, aunque no de manera significativa (Fig. 20). Por otro lado, las células musculares derivadas de humano alcanzaron el 100% de mortalidad en un periodo más corto (7 días a 1 μg puromicina mL^{-1}) en comparación con las células derivadas de lobo marino de California (5 días a 1 μg puromicina mL^{-1}), lo que podría estar asociado a una menor capacidad

antioxidante en tejidos de humano o a diferencias en la regulación de procesos como la apoptosis.

8.2 Transfección de células derivadas de músculo esquelético de humano y de lobo marino de California

Tras la transfección de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California y humano, posterior al tratamiento con puromicina ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$ por 10 días para lobo marino de California y 7 días para humano), se observaron células vivas; por ende, la transfección puede considerarse exitosa en ambas especies (Piñeiro-Ramil, 2016). En los cultivos transfectados de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California se observó una asíntota de crecimiento al 70% de confluencia a los 14 y 21 días post-tratamiento con puromicina, evidenciado por leves cambios en confluencia celular en este periodo (Fig. 13 A y B). Ante condiciones similares en fibroblastos humanos inmortalizados con SV40 LT se sugirió un evento de crisis, un periodo cuando el número de células se mantiene estable debido al equilibrio entre las tasas de muerte y división celular, posterior a la transfección con SV40 LT (Wright *et al.*, 1989; Shay *et al.*, 1991; Ozer *et al.*, 1996, Tevethia y Ozer, 2001; Yuan *et al.* 2002). Lo observado en este estudio para células musculares derivadas de lobo marino de California es similar a lo reportado por Burkard *et al.* (2019), quienes transfectaron fibroblastos de ballena jorobada con SV40 LT, reportando una eficiencia de transfección baja y una rápida proliferación celular inmediatamente después de la transfección, misma que decae sólo unos cuantos pases después. A partir de los 21 días post-tratamiento con puromicina, los cambios y declive de confluencia llevaron a la eventual pérdida del cultivo. De manera similar, Mata-López *et al.* (2020) reportaron la pérdida de expresión de genes clave para la diferenciación celular, distrofina y miogenina, en mioblastos caninos a los 14 días de la inmortalización con SV40 LT. Estas alteraciones en los patrones de expresión génica en mioblastos caninos podrían estar relacionados a alteraciones del ciclo celular como efecto del vector utilizado (Mata-López *et al.*, 2020). Además, en células derivadas de músculo esquelético de ratones inmortalizadas con SV40 LT se inhibió la diferenciación celular (Haider *et al.*, 1994). En células madre mesenquimales de médula ósea (CMMs-MO) inmortalizadas con retrovirus portadores de SV40 LT, se observaron fenotipos hipertróficos y fallas en la división celular a los 20-30 días post-inmortalización, por lo que la inmortalización no

fue efectiva (Piñeiro-Ramil, 2016; Piñeiro-Ramil et al., 2020). De manera similar, en este estudio, las células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California presentaron cúmulos de aparentes células satélite (Fig. 13), *debris celular* (Fig. 14B), vesículas o micronúcleos en el citoplasma de las células (Fig. 14C) a partir de los 21 días post-tratamiento con puromicina. A los 24 días post-tratamiento con puromicina, la confluencia se estimó por debajo del 50% y el cultivo perdió biomasa progresivamente, hasta desaparecer completamente al día 50 (Fig. 15). Las células derivadas de músculo esquelético de humano mostraron anomalías de forma más temprana. En los ensayos de transfección, menos del 1% de las células derivadas de músculo esquelético de humano transfectadas sobrevivieron al tratamiento con puromicina, acompañado por un aumento en la producción de *debris celular*, la presencia de micronúcleos y/o vesículas, y aparentes rupturas celulares durante los días de exposición a puromicina (Fig. 18 y 19), rasgos que no se habían presentado durante el tratamiento de puromicina en células derivadas de músculo esquelético de Lobo marino de California. Cabe destacar que la última característica se presentó incluso antes de aplicar puromicina a los cultivos transfectados, lo cual podría indicar cierto tipo de alteración en la regulación y homeostasis de las células derivadas de músculo esquelético de humano. En conjunto, estos resultados indican que la inmortalización a partir del plásmido pBABE-puro de Addgene con SV40 LT no fue exitosa en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California y de humano.

En células de mamíferos, la respuesta a la transfección con SV40 LT es muy diversa, dependiendo del potencial de replicación viral del ADN (Rotondo *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2023). En ciertos tipos celulares, como fibroblastos humanos, cuando se produce la progenie viral, las células hospederas se lisan y mueren (Katzman *et al.*, 2008; Rotondo *et al.*, 2019). Esto podría haber ocurrido en los cultivos de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California y humano en el presente estudio. Los mecanismos mediante los cuales SV40 LT altera la capacidad de replicación viral aún no están completamente comprendidos (Rotondo *et al.*, 2019). La interacción de SV40 LT con p53 y pRB se caracterizó en diversas líneas celulares, tales como fibroblastos, células epiteliales de distintas regiones, células hepáticas y condrocitos, de humano y de ratón (Shay *et al.*, 1991b; Hein *et al.*, 2009; Maqsood *et al.*, 2013). Además, SV40 LT puede interactuar con otras proteínas, como p300, CBPO, p130, p107, lo que puede desencadenar

cambios en la cascada de señalización que se han relacionado con fallas en la diferenciación celular en diversas líneas celulares inmortalizadas (Lill *et al.*, 1997; Anand *et al.*, 2012; Rotondo *et al.*, 2019; Mata-López *et al.*, 2020). En células del sistema inmune, la transfección con SV40 LT indujo un estrés genotóxico caracterizado por un aumento en la producción de ERO y daño oxidativo en la mitocondria. Esto provoca una cascada de señalización que compromete proteínas involucradas en la reparación y mantenimiento de la integridad del genoma (Kapplusch *et al.*, 2022). Este fenómeno podría explicar las anomalías observadas en el cultivo de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California y humano transfectadas, y su eventual pérdida, en el presente estudio.

En el presente estudio, se observaron cúmulos de aparentes células satélites a partir de los 14 días post-tratamiento con puromicina (Fig. 13), las cuales nunca precipitaron y fueron desechadas con los recambios. Esto es similar a la pérdida de la diferenciación celular después del proceso de transfección en células musculares de ratón reportada por Haider *et al.*, (1994). En mioblastos caninos inmortalizados con SV40 LT, la expresión de genes relacionados con la diferenciación celular, como distrofina y miogenina, se inhibió a los 14 días de la transfección (Mata-López *et al.*, 2020). Por otra parte, es posible que la formación de cuerpos extraños o micronúcleos y el *debris celular* se deba a la naturaleza del virus. Desde su descubrimiento, se ha reportado que SV40 LT induce la formación de vacuolas en su hospedero, e incluso, por dicha característica, lo han llamado virus de vacuolación en simios (*simian vacuolating virus*) (Anand *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2023). Cabe agregar, que la expresión de SV40 LT en células de mamífero tiende a ser corta y usualmente necesita la activación de telomerasa, lo cual puede lograrse mediante la co-transfección con SV40 LT y hTERT (Burkard *et al.*, 2019; Promjantuek *et al.*, 2022). Esto sugiere que las células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California hayan perdido su capacidad de diferenciación, evidenciado por la aparición de cúmulos de células satélite que eventualmente fueron desechándose con los recambios de medio (Fig. 13), contribuyendo a la pérdida de biomasa y eventual pérdida del cultivo. Se sugiere, para estudios posteriores, confirmar si las células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California y humano han perdido o no su capacidad de diferenciación posterior a la transfección con SV40 LT.

Dados los cambios en la actividad enzimática, la pérdida de las características (alteraciones en la forma, aparición de *debris celular*, aparición de vesículas o micronúcleos) en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California transfectadas se realizó una revisión bibliográfica sobre métodos y vectores que se han reportado en estudios de han intentado inmortalizar células de mamíferos (Tabla 7). Los resultados sugieren que la transfección directa con el vector SV40 LT puede no ser el método más adecuado en todos los contextos para obtener células inmortalizadas. Se ha reportado mayor efectividad en inmortalizar al usar la co-transfección de este vector en conjunto con la telomerasa transcriptasa reversa (hTERT) en líneas celulares derivadas de queratinocitos, fibroblastos y células de ligamento de mamíferos terrestres, como el humano (Yu *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2002; Asakawa *et al.*, 2023). En mamíferos marinos la inmortalización vía transfección directa con el antígeno pequeño SV40 st + LT ha funcionado en fibroblastos de la marsopa lisa (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*) (Wang *et al.*, 2011); sin embargo, no se logró la inmortalización en fibroblastos de ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) con la transfección con SV40 LT, pero se reporta que hTERT por sí solo fue efectivo para este proceso (Tabla 7) (Burkard *et al.*, 2019). Métodos como el uso de retrovirus y lentivirus, teniendo como vector el SV40 LT, han sido utilizados con éxito para inmortalizar células de mamíferos terrestres, como humano y perro (*Canis lupus familiaris*), y en mamíferos marinos, como el delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) (Tabla 7) (Mata-López *et al.*, 2020; Tashiro *et al.*, 2023).

Tabla 7. Comparación bibliográfica de vectores y métodos utilizados en el proceso de inmortalización celular en diversas especies y líneas celulares de mamíferos.

Vector	Método	Especie	Línea celular	Funciona	Cita
SV40 ST + LT y hTERT	Retrovirus	<i>Homo sapiens</i>	Fibroblastos	No	Yu <i>et al.</i> , 2001
SV40 LT y hTERT	Co-transfección	<i>Homo sapiens</i>	Fibroblastos	Si	Yu <i>et al.</i> , 2001
SV40 LT	Retrovirus	<i>Homo sapiens</i>	Queratinocitos	No	Yuan <i>et al.</i> , 2002
SV40 st + LT	Retrovirus	<i>Homo sapiens</i>	Queratinocitos	Si	Yuan <i>et al.</i> , 2002
SV40 LT	Retrovirus	<i>Homo sapiens</i>	Células epiteliales	No	Hein <i>et al.</i> , 2009
SV40 ST + LT y GFP	Co-transfección	<i>Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis</i>	Fibroblastos	Si	Wang <i>et al.</i> , 2011
SV40 LT	Retrovirus	<i>Homo sapiens</i>	Células mesenquimales de médula ósea	No	Piñeiro-Ramil, 2016
hTERT y Cdk4	Lentivirus	<i>Homo sapiens</i>	Mioblastos y fibroblastos	Si	Arandel <i>et al.</i> 2017
SV40 LT	Transfección directa	<i>Megaptera novaeangliae</i>	Fibroblastos	No	Burkad <i>et al.</i> , 2019
hTERT	Transfección directa	<i>Megaptera novaeangliae</i>	Fibroblastos	Si	Burkad <i>et al.</i> , 2019
SV40 LT	Lentivirus	<i>Canis lupus familiaris</i>	Células musculares	Sí	Mata-Lopez <i>et al.</i> 2020
SV40 LT	Lentivirus	<i>Balaenoptera borealis</i>	Células gliales de la retina (glía de Müller)	Si	Pereiro <i>et al.</i> , 2022
SV40 LT y hTERT	Co-transfección	<i>Homo sapiens</i>	Células del ligamento periodontal	Si	Asakawa <i>et al.</i> , 2023
SV40 LT y hTERT	Lentivirus	<i>Tursiops truncatus</i>	Células epiteliales de riñón	Si	Tashiro <i>et al.</i> , 2023

SV40, Virus del simio 40; st, antígeno T pequeño; LT, antígeno T grande; hTERT Transcriptasa telomerasa reversa; GFP, proteína fluorescente verde; *Cdk4* Quinasa dependiente de ciclina 4.

Es factible que el SV40 LT utilizado en este estudio pueda utilizarse para inmortalizar células derivadas de músculo esquelético, si se emplea con otra metodología. La transfección mediante lentivirus se ha utilizado con SV40 LT para inmortalizar mioblastos caninos (Mata-López *et al.*, 2020), células musculares de humano (Arendel *et al.*, 2017), epitelio de pulmón humano (Tran *et*

al.,2022), usando el mismo plásmido que en el presente estudio en conjunto con otros plásmidos comerciales de Addgene. Los retrovirus también se han utilizado con SV40 LT, el mismo plásmido usado en el presente estudio, en células pancreáticas de cerdo (Yang *et al.*, 2020), fibroblastos humanos (Peisker *et al.*, 2022), fibroblastos embrionarios de ratón (Pintor-Cora *et al.*, 2023) y se reportó la inmortalización de células en todos los casos. La co-transfección con SV40 LT y hTERT también se utilizó exitosamente en fibroblastos humanos (Promjantuek *et al.*, 2022) y en células de ligamento periodontal (Asakawa *et al.*, 2023). La co-transfección con SV40 LT y retrovirus se ha utilizado para la inmortalización de células epiteliales de pulmón de humano (Fong-Ho *et al.*, 2023). Se reportó que la inoculación utilizando el plásmido SV40 LT de Addgene mediada con centrifugación o espinoculación mejora la eficiencia de la infección viral y que este método es efectivo en la inmortalización de células mesenquimales de médula ósea de humano (Piñeiro-Ramil, 2020), condrocitos humanos (Piñeiro-Ramil *et al.*, 2023), y microglía de humano y macaco (Garcia-Mesa *et al.*, 2017). Por lo tanto, la transfección directa usando sólo un vector puede no ser el mejor método para llevar a cabo la inmortalización de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California y de humano. Sin embargo, este método se ha utilizado con anterioridad exitosamente en kits de transfección con SV40 LT, como Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en fibroblastos de orca pigmeo (Yajing *et al.*, 2018), Lipofectamine LTX (Thermo Fisher) y Fugene D (Promega) en ballena jorobada (Burkard *et al.*, 2019). Es posible que el periodo de incubación afecte el resultado final. El kit Xfect Transfeciton utilizado en el presente trabajo sugiere un tiempo de incubación de 4 a 6 h (Clontech Laboratories, 2020), mientras que el kit de Lipofectamine 2000 requiere un tiempo de incubación de 1 a 3 días (Invitrogen, 2013).

Con base en los resultados obtenidos en este estudio, se recomienda optimizar el proceso de inmortalización de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California y humano mediante el uso del plásmido comercial pBABE de Addgene, que contiene el gen SV40 LT, en combinación con hTERT. Esta estrategia podría implementarse utilizando transfección directa o, preferiblemente, sistemas basados en lentivirus para mejorar la eficiencia y estabilidad del proceso de inmortalización.

8.3 Indicadores de estrés oxidativo en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) y humano (*Homo sapiens*) en respuesta a la transfección

La mayor actividad enzimática de SOD y la menor actividad de CAT en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California transfectadas que en aquellas mantenidas bajo condiciones control se relaciona con la mayor producción de $O_2^{\bullet-}$ (NS) y la posible acumulación de H_2O_2 en las primeras. En las células de mamíferos, SOD y CAT desempeñan un papel clave como parte de la defensa antioxidante (Ma *et al.*, 2017). Las diferencias en la actividad de SOD y CAT entre las células mantenidas bajo condiciones control y después de la transfección pueden deberse a la acción en cascada de LT con p53, p16, pRb u otras proteínas. Se ha reportado que la p53 puede inducir una respuesta antioxidante en condiciones de bajo estrés intracelular al regular la expresión de SOD y GPx (Sablina *et al.*, 2009; Borrás *et al.*, 2011; Budanov, 2014). En condiciones de estrés oxidativo, la p53 puede promover la generación de ERO para favorecer la muerte celular, activando enzimas pro-oxidantes como quinona oxidoreductasa (NQO1) y prolina oxidasa (POX) (Polyak *et al.*, 1997; Rivera y Maxwell, 2005; Borrás *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2018). Este mecanismo podría explicar las pérdidas de biomasa observadas entre los días 21-24 (Fig. 13) y 47- 50 post-tratamiento con puromicina (Fig. 15), donde posiblemente las condiciones de estrés oxidativo hayan aumentado en las células transfectadas, desencadenado la señal necesaria para que p53 favoreciera la muerte celular. La acción de ciertos oncogenes, como el SV40 LT (utilizado en el presente estudio), adenovirus y virus del papiloma humano, pueden activar señales de estrés por daño al ADN, activando la proteína p53 en ciertos casos (Volgstein *et al.*, 2000; Borrás *et al.*, 2011). Esto podría estar relacionado al efecto genotóxico derivado de la transfección con SV40 LT en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California y humano. Se ha descrito que p16 regula los niveles de estrés oxidativo en ciertos tipos celulares como melanocitos, queratinocitos, y fibroblastos de humano (Jenkins *et al.*, 2011; de Almeida *et al.*, 2022). La inactivación de p16 aumenta significativamente la producción de ERO en queratinocitos humanos y fibroblastos de ratón (Jenkins *et al.*, 2011). En respuesta a un incremento en la producción de ERO en melanocitos humanos, la expresión de p16 aumentó de manera significativa (Jenkins *et al.*, 2011). Sin embargo, en fibroblastos de humano inmortalizados, la inactivación de p16 disminuyó la producción de ERO, mientras que la sobreexpresión de p16 aumentó los niveles de ERO en fibroblastos humanos (Takahashi *et al.*,

2006). Por lo que la relación de p16 y la regulación de ERO varía mucho entre tipos celulares (Jenkins *et al.*, 2011). En este contexto, se ha demostrado que SV40 LT puede suprimir la actividad de p53, Rb, p16 y p21, lo cual es crucial para la inmortalización celular (Maqsood *et al.*, 2013; Budanov, 2014; Rotondo *et al.*, 2019). Sin embargo, esto puede tener repercusiones en la actividad regulatoria de p53, en la respuesta antioxidante y en la regulación de ERO intracelular por parte de p16 en células derivadas de músculo esquelético, posiblemente aumentando la producción de ERO, el daño oxidativo y posibles cambios en la fisiología celular. A pesar de estos hallazgos en células de mamíferos terrestres, existe poca información sobre el papel de estas proteínas y su interacción con SV40 LT en mamíferos marinos, lo que complica la obtención de líneas celulares inmortalizadas en estas especies. Es probable que las alteraciones morfológicas y fisiológicas observadas en este estudio estén relacionadas con la interacción del antígeno T y estas proteínas reguladoras, aunque se requiere mayor investigación para confirmar este mecanismo.

En células epiteliales de riñón derivadas de mono verde (*Cercopithecus aethiops*), el SV40 LT indujo daño al ADN mediante interacciones entre SV40 LT y la proteína reguladora Bub1 y partes de cromatina del hospedero (Dulaney, 2011). Parte del mecanismo del virus para entrar a la célula hospedera aumenta la producción de ERO, mediante la alteración del balance de calcio en la interfaz mitocondria-retículo endoplasmático y la ruptura de puentes disulfuro en células epiteliales de riñón derivadas de mono verde (Dulaney, 2011). Esto lleva a un efecto genotóxico en las células hospederas, aumentando la producción de ERO y puede activar mecanismos de daño al ADN (DDR “DNA-damage response”, por sus siglas en inglés) probablemente mediado por la quinasa ataxia-telangiectasa mutada (ATM), activando NF- κ B (Dulaney, 2011; Sowd *et al.*). NF- κ B se ha relacionado con la activación de genes promotores de SOD, CAT y GSH en fibroblastos humanos (Echeverri y Mockus, 2008). Aunque no es claro si el aumento en la producción de ERO es un aspecto crítico o un efecto secundario de la infección con SV40 LT (Dulaney, 2011). De cualquier manera, el aumento en la producción de ERO y el daño oxidativo observado en las mitocondrias de macrófagos derivados de ratones que expresan SV40 LT (Kapplusch *et al.*, 2022) respalda la posibilidad de que la transfección con SV40 LT en este estudio haya activado la cascada DDR. Esto podría incluir la activación de ATM y NF- κ B, lo que aumenta las ERO

intracelulares y lleva a la muerte celular. Además, en casos de daño oxidativo mitocondrial severo, se pueden activar vías de muerte celular, como la apoptosis intrínseca mediada por caspasas y proteínas regulatorias relacionadas con p53, como Tp53 (Ott *et al.*, 2007; Giorgi *et al.*, 2008). En células epiteliales de riñón derivadas de mono verde y ratón, SV40 activa la vía apoptótica mediada por poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP-1) y caspasas (Butin-Israeli *et al.*, 2010). En presencia de ERO el calcio del retículo endoplásmico se libera en el citoplasma, promoviendo la liberación de las ERO contenidas en la mitocondria (Giorgi *et al.*, 2008, Dulaney, 2011), lo que puede derivar en daño oxidativo al ADN (Dulaney, 2011).

El músculo esquelético es un tejido altamente metabólico, tiene una densidad mitocondrial elevada, y requiere mayor energía en comparación con otros tipos celulares (Kanatous *et al.*, 1999). En el músculo de diversos pinnípedos, como el lobo marino de Steller (*Eumetopias jubatus*) y el oso marino de Ártico (*Callorhinus ursinus*), la densidad mitocondrial en promedio por volumen de fibra es de 8.8% (Kanatous *et al.*, 1999), mientras que en el de humano es del 3 al 8% (Larsen *et al.*, 2018). Por lo que es factible que la transfección de SV40 LT en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California y humano haya aumentado la producción de ERO al suprimir la actividad de proteínas clave en la regulación del ciclo celular, como p16, p53, p16, CBPO y p107, desencadenando vías de señalización de DDR. Esto posiblemente derivó en daño oxidativo en organelos importantes, como mitocondrias y retículo endoplásmico, activando vías de muerte celular, como la vía apoptótica mediada por poli (ADP-ribosa) PARP-1 y caspasas.

La SOD cataliza la conversión de $O_2^{\bullet -}$ a H_2O_2 , una especie reactiva con más alcance de daño dado su mayor tiempo de vida media, capacidad de migrar lejos del sitio de generación y participación en procesos de señalización celular (Oter *et al.*, 2012; Halliwell y Gutteridge, 2015). Esta ERO puede dañar el ADN, alterar el sistema de transporte de electrones, y puede activar o desactivar diversos procesos celulares, como la remodelación de la cromatina (Tan *et al.*, 2016). En fibroblastos humanos la respuesta a H_2O_2 depende de la concentración: dosis muy bajas (3 a 15 μM) inducen una respuesta mitogénica de 25-45%; a dosis medias (120 a 150 μM) se detiene temporalmente el crecimiento para evitar el daño a ADN; a concentraciones de 250 a 400 μM H_2O_2 , se detiene permanente el crecimiento de fibroblastos humanos; a dosis altas (0.5 a 1 mM

H₂O₂) sucede la apoptosis, y concentraciones superiores (5 a 10 mM H₂O₂) conducen a la necrosis por desintegración de la membrana celular y desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos (Davies, 1999; Lafon, 2003). La CAT es la principal enzima encargada de regular los niveles de H₂O₂ presentes en el citosol y peroxisomas (Halliwell y Gutteridge, 1999). Su actividad fue menor en células transfectadas en comparación con los controles. Esto probablemente haya resultado en una sobreproducción y/o acumulación de H₂O₂, deteniendo el crecimiento celular a los 14-21 días post-puromicina, manteniendo una confluencia de 65% por dichos días (Fig. 13). Los resultados de este estudio sugieren que a medida que el H₂O₂ fue acumulándose, las células entraron en apoptosis entre los días 21-24 post-puromicina, lo que se refleja en un declive pronunciado de la confluencia celular (Fig. 14). Las células transfectadas que resistieron hasta este punto probablemente continuaron en arresto del crecimiento, hasta que el H₂O₂ alcanzó niveles que indujo necrosis/apoptosis entre los días 47-50 post-puromicina (Fig. 16). Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Han *et al.* (2019), quienes observaron que el tratamiento con 50 µM H₂O₂ indujo apoptosis en células mesenquimales humanas inmortalizadas en las primeras 24 horas (Han et al., 2019). De manera similar, Lafón (2003) reportó que dosis superiores de 100 µM el H₂O₂ disminuyó la viabilidad celular e indujo daño al ADN, llevando a la apoptosis al menos a un 50% del cultivo de células derivadas de médula suprarrenal de rata. Estos resultados respaldan la hipótesis de este estudio de que las células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California acumularon H₂O₂ progresivamente como parte de un efecto genotóxico, inducido por las interacciones del SV40 LT con p53, p16, RB, entre otras, lo cual al final favoreció la activación de vías de muerte celular, como la apoptótica mediada por poli (ADP-ribosa) PARP-1 y caspasas.

El mayor daño oxidativo observado en las células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California transfectadas, en comparación con las células mantenidas bajo condiciones control, podría estar relacionado a una acumulación de H₂O₂. Este compuesto tiene como blanco principal el grupo tiol o sulfhidrilo de los residuos de cisteína presentes en diversas proteínas (Carvajal, 2019). La formación de radicales peroxilo y la oxidación de residuos de cisteína durante el estrés oxidativo provoca cambios conformacionales, que, en última instancia, pueden afectar las funciones y modificar las interacciones proteína-proteína (Stadtman y Levine, 2000;

Jagannathan *et al.*, 2017; Carvajal, 2019). Por ejemplo, el daño a proteínas cinasas o fosfatasas lleva a fallas en la cascada de señalización, afectando múltiples funciones celulares (Jagannathan *et al.*, 2017). Las proteasas degradan proteínas dañadas, pero algunos residuos son resistentes a la degradación proteolítica y pueden acumularse (Stadtman y Levine, 2000). Esto se ha vinculado a necrosis y apoptosis en fibroblastos de humano (Davies, 1999). Lo anterior refuerza la hipótesis de que la transfección directa con SV40 LT induce la acumulación de H₂O₂ en células derivadas de músculo esquelético en lobo marino de California.

En las células derivadas de músculo esquelético de humano es posible que, posterior a la transfección y dadas las diferencias encontradas en condiciones control, se haya acumulado H₂O₂ llevando a una rápida muerte celular. La actividad de CAT, enzima clave en la regulación de los niveles de H₂O₂ (Halliwell y Gutteridge, 1999), fue significativamente mayor en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California, siendo 3.2 veces superior en comparación con las células derivadas de músculo esquelético de humano en condiciones control (prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon, W=14, p = 0.005196). A pesar de que las células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California exhibieron una producción de O₂^{•-} significativamente mayor (6 veces), el daño oxidativo a proteínas fue mayor en células derivadas de músculo esquelético de humano (NS). Esto sugiere que las mayores defensas antioxidantes en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California, especialmente la actividad de CAT, contribuyeron a prolongar su viabilidad posterior a la transfección. En contraste, en células derivadas de músculo esquelético de humano, la capacidad antioxidante pudo haberse saturado rápidamente debido a la acumulación de H₂O₂ posterior a la transfección, contribuyendo a su muerte prematura.

La mayor actividad de GST observada en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California transfectadas, en comparación con las células mantenidas bajo condiciones control, sugiere que el proceso de transfección activó vías de desintoxicación, particularmente GST enzima de la fase II que cataliza la conjugación de GSH con xenobióticos electrofílicos, incluyendo toxinas (Sharma *et al.*, 2004; Roncalli *et al.*, 2015). El GSH, como el principal tiol no proteico en las células, contribuye a la homeostasis redox y señalización en condiciones de estrés oxidativo

(Rahantaniaina *et al.*, 2017). El H_2O_2 tiene como principal blanco el grupo tiol en proteínas, lo que puede alterar su estructura y función (Carvajal, 2019). Por ende, es posible que la acumulación de H_2O_2 en las células transfectadas haya reducido la disponibilidad GSH, afectando la actividad de GST y GPx, enzimas que requieren de este tiol para su funcionamiento (Chin *et al.*, 2007, Mejía-Sánchez *et al.*, 2018). En estudios previos, el aumento en actividad y expresión de GST en células derivadas de músculo esquelético humano expuestas a di(2-etilhexil) ftalato (DEHP), un plastificante, se asoció con mecanismos de protección (Brassea *et al.*, 2024). De manera similar, los resultados obtenidos en el presente estudio podrían reflejar una respuesta al estrés oxidativo generado por el vector SV40 LT. En condiciones control, la actividad de GPx y GST fue significativamente mayor en células derivadas de músculo esquelético de humano en comparación con aquellas de lobo marino de California. Esto podría sugerir que en las células humanas transfectadas, la acumulación de H_2O_2 haya sobrepasado rápidamente la disponibilidad de GSH, dejando inactivas estas enzimas. Este mecanismo puede haber contribuido a la eventual muerte celular observada para ambas especies posterior a la transfección con SV40 LT.

9. CONCLUSIONES

En este estudio se evaluaron los efectos de la immortalización mediante transfección del SV40 LT, conocido por su interacción con proteínas reguladoras del ciclo celular como p16 y p53, en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California y humano. Se analizaron los cambios en los indicadores de estrés oxidativo y la viabilidad celular; lamentablemente, la immortalización no tuvo éxito. Es posible que el proceso de transfección con SV40 LT haya ocasionado un desbalance en la producción de ERO, relacionado con la mayor tasa de producción de $O_2^{\bullet-}$ y actividad de SOD y la menor actividad de CAT, que condujo a la acumulación de H_2O_2 en las células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California y de humano. Esta acumulación progresiva de H_2O_2 pudo desencadenar un arresto del crecimiento celular a los 14-21 días post-tratamiento con puromicina. Este efecto genotóxico se caracterizó por daño oxidativo a proteínas, y potencialmente al ADN, lo cual, posiblemente activó vías de muerte celular. Una acumulación de H_2O_2 puede explicar las anomalías observadas a lo largo del cultivo, como el *debris celular*, los cúmulos de células satélite, los micronúcleos o vesículas y la apariencia de rupturas en el citoplasma de las células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California y de humano. Se observaron diferencias entre especies; las células de lobo marino mostraron mayor actividad de CAT y menor daño oxidativo en comparación con las células humanas en condiciones control, potencialmente contribuyendo a la prolongación de la viabilidad celular tras la transfección. Sin embargo, la escasez de información sobre la interacción del SV40 LT con proteínas regulatorias en mamíferos marinos limita la comprensión del mecanismo exacto y complica la obtención de líneas celulares immortalizadas en estas especies. Se recomienda estudiar si la transfección con SV40 LT induce un efecto genotóxico en las células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California y de humano, si este efecto está asociado a la inactivación de p53 y/o p16, si estas últimas tienen un papel clave en la regulación de ERO, y si se activan mecanismos de muerte celular mediados por ATM, la activación de caspasas o la vía PARP-1. Con base en los resultados de este estudio, se sugiere explorar el uso de estrategias complementarias, como la co-transfección con telomerasa transcriptasa reversa humana (hTERT) para estabilizar el efecto del SV40 LT y aumentar las posibilidades de generar líneas celulares immortalizadas y estables de células derivadas de músculo esquelético de lobo

marino de California y de humano. La combinación sugerida podría mejorar la eficiencia del proceso de inmortalización, reduciendo los efectos genotóxicos y aumentando la estabilidad de los cultivos. Además, el uso de sistemas basados en lentivirus podría optimizar la transfección al incrementar la eficacia de la integración genética y permitir una manipulación más precisa del material celular. Futuros estudios deberían enfocarse en el papel de las proteínas regulatorias en la interacción con el SV40 LT en especies no modelo, como los mamíferos marinos, para así avanzar en la comprensión de los mecanismos celulares implicados y optimizar los protocolos experimentales.

En conclusión, este estudio establece una base para mejorar los métodos de inmortalización en células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California y humanos, subrayando la importancia de optimizar las condiciones experimentales para avanzar en la comprensión de las adaptaciones celulares y su potencial aplicación en el entendimiento del estrés oxidativo en mamíferos marinos y terrestres.

10. LITERATURA CITADA

- Addgene. (2023). General transfection. Disponible en: <https://www.addgene.org/protocols/transfection/> [consulta: 31 de marzo de 2023].
- Addgene. (2023). Recovering plasmid DNA from bacterial culture. Disponible en: <https://www.addgene.org/protocols/purify-plasmid-dna/> [consulta: 13 de marzo de 2023].
- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. In: *Methods in enzymology, oxygen radicals in biological systems*. Elsevier, New York, U.S.A., pp. 121-126.
- Allen, K. y Vázquez-Medina, J. (2019). Natural tolerance to ischemia and hypoxemia in diving Mammals: A review. *Frontier Physiology*, 10: 1-10. doi: 10.3389/fphys.2019.01199.
- Anand, A., Sankar, S. y Vani, V. (2012). Immortalization of neuronal progenitors using SV40 large T antigen and differentiation towards dopaminergic neurons. *Journal of Cellular Molecular Medicine*, 16(11): 2592-2610. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01607.x.
- Arandel, L., Polay-Espinoza, M., Matloka, M., Bazinet, A., De Dea-Diniz, D., Naouar, N., Rau, F., Jollet, A., Edom-Vovard, F., Mamchaoui, K., Tarnopolsky, M., Puymirat, J., Battail, C., Boland, A., Deleuze, J.F., Mouly, V., Klein, A.F. y Furling, D. (2017). Immortalized human myotonic dystrophy muscle cell lines to assess therapeutic compounds. *Disease Models and Mechanisms*, 10(4):487-497. doi: 10.1242/dmm.027367.
- Arango-Rincón, J.C., Gámez-Díaz, L.Y. y López-Quintero, J. A. (2010). Sistema NADPH oxidasa: nuevos retos y perspectivas. *Iatreia*, 23(4): 362-372.
- Araki, K., Ohashi, Y., Sasabe, T., Kinoshita, S., Hayashi, K., Yang, X.Z., Hosaka, Y., Aizawa, S. y Handa, H. (1993). Immortalization of rabbit corneal epithelial cells by a recombinant SV40-adenovirus vector. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 34(9):2665-71.
- Armstrong, H.C., Russell, D.J.F, Moss, S.E., Pomeroy, P. y Bennett KA. (2023). Fitness correlates of blubber oxidative stress and cellular defences in grey seals (*Halichoerus grypus*): support for the life-history-oxidative stress theory from an animal model of simultaneous lactation and fasting. *Cell Stress Chaperones*, 28(5):551-566. doi: 10.1007/s12192-023-01332-1.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. y Patel, H.R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5:209-219.
- Asakawa, T., Yamada, A., Kugino, M., Hasegawa, T., Yoshimura, K., Sasa, K., Kinoshita, M., Nitta, M., Nagata, K., Sugiyama, T., Kamijo, R. y Funatsu, T. (2022) Establishment of Down's syndrome periodontal ligament cells by transfection with SV40T-Ag and hTERT. *Human Cell*, 35(1):379-383. doi: 10.1007/s13577-021-00621-0.
- Aurioles-Gamboa, D. y Zavala-González, A. (1994). Algunos factores ecológicos que determinan la distribución y abundancia del Lobo marino *Zalophus californianus*, en el Golfo de California. *Ciencias Marinas*, 20(4): 535-553 pp. doi: 10.7773/cm.v20i4.976.
- Aurioles-Gamboa, D., Sinsel, F., Fox, C., Alvarado, E. y Maravilla, O. (1983). Winter migration of subadult male California sea lions (*Zalophus californianus*) in the southern part of Baja California. *Journal of Mammalogy*, 64(3):513-518.
- Baraibar, M., HyzewiczJ., Rogowska-Wrzesinska, A., Ladouce, R., Roepstroff, P., Mouly, V. y Friguet, B. (2011). Oxidative stress-induced proteome alterations target different cellular pathways in human myoblasts. *Free Radical Biology & Medicine*, 51: 1522-1532. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.032

- Birben, E., Murat-Sahiner, U., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, (1):9–19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
- Bischoff, R. (1974). Enzymatic liberation of myogenic cells from adult rat muscle. *The Anatomical Record*, 180(4):645-61.
- Black, C., Bot, M., Scheffer, P.G., Cuijpers, P. y Penninx, B.W. (2015). Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 51:164–175. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.09.025.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brassea, E. (2023). Evaluación de la actividad y expresión génica de enzimas antioxidantes (SOD, GPx, GST, GR y CAT) como biomarcadores de exposición ftalatos en cultivo celular. *Tesis Doctoral*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), México.
- Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D., Reid, J., Bannister, A. y Kouzarides, T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*, 391 (6667): 597-601 pp.
- Borras, C., Gómez-Cabrera, M. y Viña, J. (2011). The dual role of p53: DNA protection and antioxidant. *Free Radical Research*, 45(6): 643-652. doi: 10.3109/10715762.2011.571685.
- Budanov, A. (2014). The role of tumor suppressor p53 in the antioxidant defense and metabolism. *Sub-cellular Biochemistry*, 85: 337-358. doi :10.1007/978-94-017-9211-0_18.
- Butin-Israeli, V., Drayman, N. y Oppenheimer, A. (2010). Simian virus 40 infection triggers a balanced network that includes apoptotic, survival, and stress pathways. *Journal of Virology*, 84(7): 3431-3442. doi: 10.1128/JVI.01735-09.
- Butterfield, D.A. y Halliwell, B. (2019). Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Review Neuroscience*, 20(3):148-160. doi: 10.1038/s41583-019-0132-6.
- Burkard, M., Bengtson-Nash, S., Gambaro, G., Whitworth, D. y Schirmer, K. (2019). Lifetime extension of humpback whale skin fibroblasts and their response to lipopolysaccharide (LPS) and a mixture of polychlorinated biphenyls (Aroclor). *Cell Biology and Toxicology*, 35:387–398. doi: 10.1007/s10565-018-09457-1.
- Cantú-Medellín, N., Byrd, B., Hohn A., Vásquez-Medina, J.P. y Zenteno-Savín, T. (2011). Differential antioxidant protection in tissues from marine mammals with distinct diving capacities. Shallow/short vs. deep/long divers. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 158: 438-443. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.11.029.
- Carbone M., Gazdar, A. y Butel, J.S. (2020). SV40 and human mesothelioma. *Translational Lung Cancer Research*, 9(Suppl 1): S47-S59. doi: 10.21037/tlcr.2020.02.03.
- Carter, M. y Shieh, J. (2015). Guide to research techniques in neuroscience. Second edition. Elsevier, U.S.A. 388 pp. ISBN 9780128005118. doi:10.1016/B978-0-12-800511-8.00014-9
- Carvajal, C. (2019). Especies reactivas de oxígeno: Formación, función y estrés oxidativo. *Revista Medicina Legal de Costa Rica*, (36)1: 91-100.
- Carvan, M.J., Santostefano, M., Safe, S. y Busbee, D.L. (1994). Characteristics of a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) epithelial cell line. *Marine Mammal Science*, 10: 52–69.
- Castaño, M. E. (2008). Cultivos celulares. En: Urcuqui, S. y Ossa, J. (eds). *Principios de virología*, Cuarta edición. Biogenesis, Colombia. 29-46 pp.

- Castellini, M. (2012). Life under water: Physiological adaptations to diving and living at sea. *Comprehensive physiology*, Vol (2): 1889-1919 pp. doi: 10.1002/cphy.c110013.
- Chen, T., Wu, Y., Hou, J., Chiang, Y., Cheng, C., Sifiyatun, E., Chiu, C., Wang, L. y Chen, W. (2018). A novel p53 paralogue mediates antioxidant defense of mosquito cells to survive dengue virus replication. *Virology*, 519: 156-169. doi: 10.1016/j.virol.2018.04.011.
- Chen, Y., Hu, S., Wang, M., Zhao, B., Yang, N., Li, J., Chen, Q., Liu, M., Zhou, J., Bao, G. Wu, X. (2019). Characterization and establishment of an immortalized rabbit melanocyte cell line using the SV40 large T antigen. *International Journal of Molecular Sciences*, 20:4874. doi: 10.3390/ijms2019487.
- Chin, F., Schafer, F., Buettner G. y Rodgers, J. (2007). The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: Mathematical insight into in vivo H₂O₂ and GPx concentrations. *Free Radical Research*, 41(11): 1201-1211pp. doi: 10.1080/10715760701625075
- Clark, R., Stampfer, M., Milley, R., O'Rourke, E., Walen, K., Kriegler, M., Kopplin, J. y McCormick, F. (1988). Transformation of human mammary epithelial cells by oncogenic retroviruses. *Cancer Research*, 48(16): 4689-4694.
- Clontech Laboratories. (2020). Xfect™ Transfection reagent protocol. A Takara Bio Company. Disponible en: <http://www.clontech.com>. [consulta: 12 febrero 2023]
- Conde-Guerrero, P. (2019). Expresión diferencial de genes involucrados en la respuesta a la variación ambiental diurna y estacional en el pez críptico arrecifal *Lythrypnus dalli* (Gilbert 1890). *Tesis de Maestría*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), México.
- Davies, K. (1999). The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *Life*, 48: 41-47.
- Davis, R. (2013). A review of the multi-level adaptations for maximizing aerobic dive duration in marine mammals: from biochemistry to behavior. *Journal of Comparative Physiology Part B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 184: 23-53 pp. doi:10.1007/s00360-013-0782-z.
- Davis, R. y Williams, T. (2012). The marine mammal dive response is exercise modulated to maximize aerobic dive duration. *Journal of Comparative Physiology Part A. Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 198(8):583-91. doi: 10.1007/s00359-012-0731-4.
- De Almeida, A., de Oliveira, J., Pontes, L., Junior, J., Goncalves, T., Dantas, S., de Almeida, M., Silva, A. y Medeiros, I. (2022). ROS: Basic concepts, sources, cellular signaling, and its implications in aging pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 19:1225578. doi: 10.1155/2022/1225578.
- de Zwart, L.L., Meerman, J.H.N., Commandeur, J.N.M. y Vermeulen, N.E.P. (1999). Biomarkers of free radical damage. Applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 202–226.
- DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Lynch, D, Furukawa, Y., Griffin, J., Piwnica-Worms, H., Huang, C. y Livingston, D. (1989). The product of retinoblastoma susceptibility gene has properties of cell cycle regulatory element. *Cell*, (58):1085-1095.
- Devi, B.G., Schenker, S., Mazloun, B. y Henderson, G.I. (1996). Ethanol-induced oxidative stress and enzymatic defenses in cultured fetal rat hepatocytes. *Alcohol*, 13: 327–332.
- Díaz-Acosta, A. y Membrillo-Hernández, J. (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, (9)1: 34-44 pp.

- DOF. (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo - CONAMER.
- Drossos, G., Lazou, A., Panagopoulos, P. y Westaby, S. (1995). Deferoxamine cardioplegia reduces superoxide radical production in human myocardium. *The Annals of Thoracic Surgery*, 59: 169-172 pp.
- Dulaney, W. (2011). Determining the mechanism of SV40-induced DNA damage. *Master Thesis in Biological Sciences*. Vanderbilt University, Nashville, TN. 49 p.
- Ebihara, S., Endo, S., Ito, Y., Obinata, M. y Takai, T. (2004). Immortalized dendritic cell line with efficient cross-priming ability established from transgenic mice harboring the temperature-sensitive SV40 large T-antigen gene. *Journal of Biochemistry*, 136: 321–8.
- Echeverri, N. y Mockus, I. (2008). Factor Nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$): Signalosoma y su importancia en enfermedades inflamatorias y cáncer. *Revista de la Facultad de Medicina*, 56(2): 133-146.
- Ehrt, S. y Schnappinger, D. (2003). Isolation of plasmids from E. coli by Alkaline Lysis. In: Casali, N. y Preston, A. (eds). *E. coli plasmid vectors: Methods and applications*. Humana Press. U.S.A. 316 p.
- Elsner R, Øyasaeter S, Saugstad O L y Scytte-Blix A. (1995). Seal adaptations for long dives: recent studies of ischemia and oxygen radicals. In: *Developments in marine biology, whales, seals, fish and man*. International Symposium on the Biology of Marine Mammals in the North East Atlantic. Tromso, Norway vol. 4. Elsevier Science B.V, Amsterdam. pp. 371–376.
- Elsner, R., D. D. Hammond. y H. R. Parker. (1969). Circulatory responses to asphyxia in pregnant and fetal animals: a comparative study of Weddell seals and sheep. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 42(3-4): 202-217.
- Engeland, K. (2022). Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death and Differentiation*, (29):946–960. doi: 10.1038/s41418-022-00988-z.
- Elsner, R., S. Øyasæter., R. Almaas. & O. D. Saugstad. (1998). Diving seals, ischemia-reperfusion and oxygen radicals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A. Molecular and Integrative Physiology*, 119: 975-980.
- Flohé, L. y Günzler, W. A. (1984). Assays for glutathione peroxidase. In: Packer, L. (ed.). *Methods in enzymology: Oxygen radicals in biological systems*. Academic Press, Inc. U.S.A. pp. 114-120.
- Fong-Ho, T., Lee, M. Y., Chin-Goh, H., Ning, Y., Lee, J., Kannan, S., Lim, Y., Zhao, T., Lim, E., Phua, C., Fei-Lee, Y., Lim, R., Hao, P., Yuan, J., Chan, D., Lieske, B., Chong, C., Lee, K., Lum, J., Cheong, W., Yeoh, K., Tan, K., Sobota, R., Verma, C., Lane, D., Tam, W. y Venkitaraman, A. (2023). Domain-specific p53 mutants activate EGFR by distinct mechanisms exposing tissue-independent therapeutic vulnerabilities. *Nature Communications*, (14):1726. doi: 10.3390/antibiotics12030511.
- Forman, H.J. y Zhang, H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20: 689–709. doi: 10.1038/s41573-021-00233-1.
- Foster, G.E. y Sheel, A.W. (2005), The human diving response, its function, and its control. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 15: 3-12. doi: 10.1111/j.1600-0838.2005.00440.x
- Freshney, R. I. (2010). Culture of animal cells. A manual of basic technique and specialized applications. 6 th ed. Wiley, New Jersey, U.S.A. 566 p.

- Freshney, R.I. (2016). Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 7 th ed. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Fu, Y., Chen, Z., Li, C. y Liu, G. (2012). Establishment of a duck cell line susceptible to duck hepatitis virus type 1. *Journal of Virology Methods*, 184:41– 5. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.05.004.
- Garcia-Mesa, Y., Jay, T., Checkley, M., Luttge, B., Dobrowolski, C., Valadkhan, S., Landreth, G., Karn, J. y Alvarez-Carbonell, D. (2017). Immortalization of primary microglia: a new platform to study HIV regulation in the central nervous system. *Journal of Neurovirology*. 23: 47-66 pp. doi: 10.1007/s13365-016-0499-3.
- Garson, G. D. (2012). *Testing statistical assumptions*. Statistical Associates Publishing, Asheboro, NC, U.S.A. 54p.
- Goldberg, D. M. y Spooner, R.J. (1987). Assay glutathione reductase. In: *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, Germany. pp. 258-265.
- Giorgi, C., Romagnoli, A., Pinton, P. y Rizzuto, R. (2008). Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. *Current Molecular Medicine*, 8: 119-130.
- Gong, G., Waris, G., Tanveer, R. y Siddiqui, A. (2001). Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98:9599-9604.
- Gooden, B. A. y Elsner, R. (1985). What diving animals might tell us about blood flow regulation. *Perspectives in Biology and Medicine*, 28: 465-474.
- Gooden, B.A. (1994). Mechanism of the human diving response. *Integrative Physiological and Behavioral Science*, 29: 6–16. doi: 10.1007/BF02691277.
- Gospodaryov, D. y Lushchak, V. (2012). Oxidative stress: Cause and consequence of diseases. In: Volodymyr, I., Lushchak, V y Gospodaryov, V. (eds.). *Oxidative stress and diseases*. IntechOpen, Ukraine. doi: 10.5772/38093.
- Guo, D., Zhang, L., Wang, X., Zheng, J. y Lin, S. (2022). Establishment methods and research progress of livestock and poultry immortalized cell lines: A review. *Frontiers in Veterinary Science*, 9:956357. doi: 10.3389/fvets.2022.956357.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. y Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of General Virology*, 36(1):59-74. doi: 10.1099/0022-1317-36-1-59.
- Habig, W. H. y Jakoby, H. B. (1981). Glutathione S-transferases (rat and human). In: Jakoby, W. B. (Ed.). *Methods in enzymology*. Academic Press, Inc. Orlando, Florida. pp. 218-235.
- Haider, S.R., Wang, W. y Kaufman, S. (1994). SV40 T Antigen inhibits expression of MyoD and myogenin, up-regulates Myf-5, but does not affect early expression of desmin or alpha 7 integrin during muscle development. *Experimental Cell Research*, 210:278–286. doi: 10.1006/excr.1994.1040.
- Halliwell, B. (2014). Cell culture, oxidative stress and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomed Journal*, 37(3): 99-105. doi: 10.4103/2319-4170.128725.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. 3rd. ed. Oxford University Pres, London, U.K. 936 p.
- Han, L., Zhao, Q., Yoshida, T., Okabe, M., Soko, C., Rehman, M., Kondo, T. y Nikaido, T. (2019). Differential response of immortalized human amnion mesenchymal and epithelial cells against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 135: 79-86 pp. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.017.

- Hara, E., Tsurui, H., Shinozaki, A., Nakada, S. y Oda, K. (1991). Cooperative effect of antisense-Rb and antisense-p53 oligomers on the extension of life span in human diploid fibroblasts, TIG-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (179)1: 528-534.
- Hasegawa, K., Arakawa, E., Oda, S., Yanai, N., Obinata, M. y Matsuda Y. (1997). Novel smooth muscle cell lines from transgenic mice harboring temperature-sensitive SV40 large T-antigen gene. temperature-dependent expression of smooth muscle myosin heavy chain-1 and calponin genes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29: 2177–86.
- Hayflick, L. y Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 585-621 p. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
- Hein, J., Boichuk, S., Wu, J., Cheng, Y., Freire, R., Jat, P., Roberts, T. y Gjoerup, O. (2009). Simian virus 40 large T antigen disrupts genome integrity and activates a DNA damage response via Bub1 binding. *Journal of Virology*, 83(1): 117-127p. doi: 10.1128/JVI.01515-08.
- Hermes-Lima, M., Storey, J. M. y Storey, K. B. (2001). Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. In: *Cell and Molecular Responses to Stress* vol. 2. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp. 263-287.
- Hermes-Lima, M. y Zenteno-Savín, T. (2002). Animal response to drastic changes in oxygen availability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 133: 537-556.
- Hernández-Almaraz, P., Lugo-Lugo, O., Brassea-Pérez, E., Gaxiola-Robles, R. y Zenteno-Savín, T. (2022). Morphometric characteristics of human skeletal muscle cells in primary culture. *International Journal of Morphology*, 40(2):521-529.
- Hochachka, P. W. (1981). Brain, lung, and heart functions during diving and recovery. *Science*, 212(4494): 509–514.
- Huang, Y., Yang, Y., Jiang, M., Lin, M., Li, S. y Lin, Y. (2015). Immortalization and characterization of human dental mesenchymal cells. *Journal of Dentistry*, 43(5):576-82. doi: 10.1016/j.jdent.2015.02.008.
- IBIAN Technology. (2023). Antibióticos de selección y su uso en la ingeniería genética. Disponible en: <https://www.ibiantech.com/antibioticos-de-seleccion-y-su-aplicacion-en-la-ingenieria-genetica/> [Consultado el 7 de octubre de 2023]
- Invitrogen. (2013). Lipofetamine® 2000 Reagent. Protocol Pub. No. MAN0007824 Rev.1.0. Disponible en: www.lifetechnologies.com/support. [Consultado el 13 de octubre de 2023]
- Jackson, S. y Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461:1071–1078. doi: 10.1038/nature08467.
- Jagannathan, L., Cuddapah, S y Costa, M. (2016). Oxidative stress under ambient and physiological tension in tissue culture. *Current Pharmacology Reports*, 2(2):64-72. doi: 10.1007/s40495-016-0050-5.
- Jenkins, N., Liu, T., Cassidy, P., Leachman, S., Broucher, K., Goodson, A., Samadashwily, G. y Grossman, D. (2011). The p16^{INK4A} tumor suppressor regulates cellular oxidative stress. *Oncogene*, 30(3): 265-274. doi: 10.1038/onc.2010.419.
- Jones, D. (2006). Redefining oxidative stress. Forum review. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8(9): 1865-1879 pp.
- Kameoka J., Yanai, N. y Obinata M. (1995). Bone marrow stromal cells selectively stimulate the rapid expansion of lineage-restricted myeloid progenitors. *Journal of Cellular Physiology*, (164): 55–64.

- Kanatous S. B., DiMichele L. V., Cowan D. F. y Davis R. W. (1999). High aerobic capacities in the skeletal muscles of pinnipeds: adaptations to diving hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, 86: 1247-1256.
- Kanerva, M., Routti, H., Tamuz, Y., Nyman, M. y Nikinmaa, M. (2012). Antioxidative defense and oxidative stress in ringed seals (*Pusa hispida*) from differently polluted areas. *Aquatic Toxicology*, 114-115: 67-72. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.02.013.
- Kapplusch, F., Schulze, F., Reinke, S., Russ, S., Linge, M., Kulling, F., Kriechling, F., Höhne, K., Winkler, S., Hartmann, H., Rösen-Wolff, Anastassiadis, K., Hedrich, C. y Hofmann, S. (2022). RIP2-deficiency induces inflammation in response to SV 40 Large T induced genotoxic stress through altered ROS homeostasis. *Clinical Immunology*, 238:108998. doi: 10.1016/j.clim.2022.108998.
- Katakura, Y., Alam, S. y Shirahata, S. (1998). Chapter 5. Immortalization by gene transfection. In: *Methods in cell biology: Animal cell culture methods*. Academic Press, San Diego, U.S.A. (57): 69-91 pp.
- Kavsan, V., Lershov, A. y Balynska, O.V. (2011). Immortalized cells and one oncogene in malignant transformation: old insights on new explanation. *BMC Cell Biology*, 12:23. doi: 10.1186/1471-2121-12-23.
- Keehan, W., Barnes, D., Reid, L., Stanbridg4e, E., Murakami, H. & Sato, G. (1990). Frontiers in mammalian cell culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology: Journal of the Tissue Culture Association*, (26):9-23.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R., & Hammerschmidt, W. (1995). Immortalization of human primary B lymphocytes in vitro with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(13): 5875–5879.
- Kim, C., Go, R., Lee, G., Kim, C., Chun, Y. y Choi, K. (2016). Immortalization of human corneal epithelial cells using simian virus 40 large T antigen and cell characterization. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 78: 52–57. doi: 10.1016/j.vascn.2015.11.005.
- Kinnula, V.L., Yankaskas, J.R., Chang, L., Virtanen, I., Linnala, A., Kang, B.H. y Crapo, J.D. (1994). Primary and immortalized (BEAS 2B) human bronchial epithelial cells have significant antioxidative capacity in Vitro. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, (11): 568-576.
- Köhler, G. y Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody predefined specificity. *Nature*, 256(5517):495-7. doi: 10.1038/256495a0.
- Kurata, M., Suzuki, M. y Agar, N. (1993). Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Vol. 106 (3): 477-487 pp.
- Kuwata, T., Oda, T., Sekiya, S. y Morinaga, N. (1976). Characteristics of a human cell line successively transformed by Rous sarcoma virus and simian virus 40. *Journal of the National Cancer Institute*, 56(5):919-926. doi: 10.1093/jnci/56.5.919.
- Kyono, T., Foster, S., Koop, J., MacDougall, J., Galloway, D. & Klingelutz, A. (1998). Both Rb/p16^{INK4a} inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*, 396 (6706): 84-88.
- Lafon, L. (2003). Estudios de los mecanismos de muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno y de la protección por la quercetina en células PC12. *Tesis de Maestría*. Universidad de la República, Departamento de Neuroquímica-IIBCE, Montevideo, Uruguay.
- Lanza, A., Soon-Kim, D. y Alper, P. H. (2013). Evaluating the influence of selection markers on obtaining selected pools and stable cell lines in human cells. *Biotechnology Journal*, 8(7):811-821.

- Lichtenberg, D. y Pinchuk, I. (2015). Oxidative stress, the term and the concept. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol 461 (3): 441-444. doi: 0.1016/j.bbrc.2015.04.062.
- Lill, N.L., Tevethia, M.J., Eckner, R., Livingston, D.M. y Modjtahedi, N. (1997). p300 family members associate with the carboxyl terminus of simian virus 40 large tumor antigen. *Journal of Virology*, 71: 129–137 pp.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods: a companion to methods in enzymology*, 25:402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lesser, M. (2012). Oxidative stress in tropical marine ecosystems. In: *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. Blackwell Publishing Ltd. USA. doi:10.1002/9781444345988.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C., Amici, A., Climent, I., Lenz, A., Ahn, B., Shaltiel S., Stadtman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method in Enzymology*, 186: 464-478.
- Louis, K.S. y Siegel, A. C. (2007). Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods in Molecular Biology*, 740: 7-12 pp. doi: 10.1007/978-1-61779-108-6_2.
- Lu, Y., Aguirre, A.A., Hamm, C., Wang, Y., Yu, Q., Loh, P.C. y Yanagihara, R (2000). Establishment, cryopreservation, and growth of 11 cell lines prepared from a juvenile Hawaiian monk seal, *Monachus schauinslandi*. *Methods in Cell Science*, 22(2-3):115-24. doi: 10.1023/a:1009816715383.
- Ma, X., Deng, D. y Chen, W. (2017). Inhibitors and activators of SOD, GSH-Px, and CAT. In: *Enzyme inhibitors and activators*, 1st ed. InTech, London, England.
- Mamchaoui, K., Trollet, C., Bigot., A., Negroni, E., Chaouch, S., Wolff, A., Kandalla, P., Marie, S., Di-Santo, J., Lacau, J., Guily, J., Muntoni, F., Kim, J., Philippi, S., Spuler, S., Lexy, N., Blumen, S., Voit, T., Wright, W., Aamiri, A., Butler-Browne, G. & Mouly, V. (2011). Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skeletal Muscle*, 1(34):1-11. doi:10.1186/2044-5040-1-34.
- Markert, M., Andrews, P. C. y Babior, B. (1984). Measurement of O₂^{•-} production by human neutrophils. In: Packer, L. (ed.) *Methods in enzymology, oxygen radicals in biological systems, vol. 105*. Academic Press, Orlando, U.S.A. pp. 358-365.
- Marseglia, L., D'Angelo, G., Manti, S., Arrigo, T., Barberi, I., Reiter, R.J. y Gitto, E. (2014). Oxidative stress-mediated aging during the fetal and perinatal periods. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 358375. doi: 10.1155/2014/358375.
- Massenet, J., Gitiaux, C., Magnan, M., Cuvellier, S., Hubas, A., Nusbaum, P., Dilworth, J., Desguerre, I. y Chazaud, B. (2020). Derivations and characterization of immortalized human muscle satellite cell clones from muscular dystrophy patients and healthy individuals. *Cells*, (9): 1780. doi: 10.3390/cells9081780.
- Mata-López, S., Balog-Alvarez, C., Canessa, E., Hathout, Y., Brown, K., Vitha, S., Bettis, A., Boehler, J., Kornegay, J. y Nghiem, P. (2020). Creation and characterization of an immortalized canine myoblast cell line: Myok9. *Mammalian Genome*, 31: 95-109. doi:10.1007/s00335-020-09833-5.
- Maqsood, M. I., Marayam, M.M., Bahrami, A. R. y Ghasroldasht, M. (2013). Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment. *Cell Biology International*, (10): 1038-45. doi: 10.1002/cbin.10137.

- Mejia-Sanchez, F., Montenegro-Morales, L.P. y Castillo-Cadena, J. (2018). Enzymatic activity induction of GST-family isoenzymes from pesticide mixture used in floriculture. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 601-606.
- Morales, C.P., Shawn, E.H., Ouellete, M., Kaur, K. J., Yan, Y., Wilson, K.S., White, M., Wright, W. E. y Shay, J. (1999). Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nature genetics*, (21): 115- 118.
- Mouly, V., Aamiri, A., Périe, S., Mamchaoui, K., Barani, A., Bigot, A., Bouazza, B., Francois, V., Furling, D., Jacquemin, V., Negroni, E., Riederer, I., Vignaud, A., St-Guily, J. & Butler-Browne, G. (2005). Myoblast transfer therapy: is there any light at the end of the tunnel? *Acta Myologica*, XXIV: 128-133.
- Mutinati, M., Pantaleo, M., Roncetti, M., Piccinno, M., Rizzo, A. y Sciorsci, R.L. (2014) Oxidative stress in neonatology: a review. *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 49 (1): 7–16.
- Neville, C.; Rosenthal, N.; McGrew, M.; Bogdanova, N. y Hauschka, S. (1997). Skeletal muscle cultures. In: *Methods in Cell Biology*, 52: 85-116.
- NCBI. (2013). *RCAN1 regulator of calcineurin 1 [Homo sapiens (human)] – Gene. Nih.gov*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1827> [Consultado: el 19 de marzo de 2024].
- Obinata, M. (2001). Possible applications of conditionally immortalized tissue cell lines with differentiation functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (286): 667–672.
- Obinata, M. (2007). The immortalized cell lines with differentiation potentials: their establishment and possible application. *Cancer Science*, 98 (3): 275-283. doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00399.x.
- Oter, S., Cucullo, L y Dormn, D. (2012). Oxidants and antioxidants: Friends or foes? *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 1(1):1-4. doi: 10.5455/oams.080612.ed.001.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S. y Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12:913-922. doi: 10.1007/s10495-007-0756-2.
- Ozer, H. L., Banga, S. S., Dasgupta, T., Houghton, J., Hubbard, K., Jha, K. K., Kim, S., Lahan, M., Pang, Z., Pardinas, J. y Pastalis, P. (1996). SV40-Mediated immortalization of human fibroblasts. *Experimental Gerontology*, 3(12): 303-310.
- Peisker, F., Halder, M., Nagai, J., Ziegler, S., Kaesler, N., Hoeft, K., Li, R., Bindels, E.M., Kuppe, C., Moellmann, J., Lehrke, M., Stoppe, C., Schaub, M., Schneider, R., Costa, I. y Kramann, R. (2022). Mapping the cardiac vascular niche in heart failure. *Nature Communications*, 13(1): 3027. doi: 10.1038/s41467-022-30682-0.
- Pereiro, X., Beriain, S., Rodríguez, L., Roiz-Valle, D., Ruzafa, N. y Vecino, E. (2022). Characteristics of whale Müller glia in primary and immortalized cultures. *Frontiers in Neuroscience*, 16:854278. doi: 10.3389/fnins.2022.854278.
- Persky, A.M., Green, P.S., Stublely, L., Howell, C.O., Zaulyanov, L., Brzaeau, G.A. y Simpkins, J.W., (2000). Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 223: 59–66. doi: 10.1046/j.1525-1373.2000.22308.x.
- Pham-Huy L.A., He, H. y Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2):89-96.
- Pine, M. D., K. Greer. y D. Busbee. (2007). Comparison of reactive oxygen scavenging systems between a cetacean (DKN1) and a porcine renal epithelial cell line (LLC-PK1). *Comparative*

biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology, 147: 550-555. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.02.005.

- Pintor-Cora, A., Tapia, O., Elexpuru-Zabaleta, M., Alegría, C., Rodríguez-Calleja, J., Santos, J. y Ramos-Vivas, J. (2023). Cytotoxicity and antimicrobial resistance of aeromonas strains isolated from fresh produce and irrigation water. *Antibiotics*, (12): 511. doi: 10.3390/antibiotics12030511.
- Piñeiro-Ramil, M. (2016). Inmortalización de células madre mesenquimales humanas con el antígeno T del virus SV40. *Tesis de Maestría*. Universidad de Coruña, Coruña, España.
- Piñeiro-Ramil, M., Castro-Viñuelas, R., Sanjurjo-Rodríguez, C., Rodríguez-Fernández, S., Hermida-Gomez, T., Blanco-García, F., Fuentes-Boquete, I y Díaz-Prado, S. (2020). Immortalizing mesenchymal stromal cells from aged donors while keeping their essential features. *Stem Cells International*, ID 5726947: 1- 24. doi: 10.1155/2020/5726947.
- Piñeiro-Ramil, M., Sanjurjo-Rodríguez, C., Rodríguez-Fernández, S., Hermida-Gómez, T., Blanco-García, F., Fuentes-Boquete, I., Vaamonde-García, C. y Díaz-Prado, S. (2023). Generation of human immortalized chondrocytes from osteoarthritis and healthy cartilage. *Bone and Joint Research*, 12(1):46–57. doi: 10.1302/2046-3758.121.
- Pisoschi, A. M. & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97: 55-74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W. y Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, 389(6648):300–305.
- Promjantuek, W., Chaicharoenaudomrung, N., Phonchai, R., Kunhorm, P. y Noisa, P. (2022). Transgenic immortalization of human dermal fibroblasts mediated through the MicroRNA/SIRT1 pathway. *In Vivo*, (36): 140-152. doi: 10.21873/invivo.12685.
- Promega. (2023). FuGENE® HD Transfection Reagent Technical Manual. Promega Corporation, U.S.A. 20 P.
- Pugliares, K., Bogomolni, A., Touhey, K., Herzig, S. M., Harry, C.T. y Moore, M. J. (2007). Marine mammal necropsy: An introductory guide for stranding responders and field biologists. *Wood Hole Oceanographic Institution, Technical Report (2007-006)*. 133p. doi: <https://doi.org/10.1575/1912/1823>.
- Rahantaniaina, M., Li, S., Chatel-Innocenti, G., Tuzet, A., Mhamdi, A., Vanacker, H. y Noctor, G. (2017). Glutathione oxidation in response to intracellular H₂O₂: Key but overlapping roles for dehydroascorbate reductases. *Plant Signaling & Behavior*, 12(8). doi: 10.1080/15592324.2017.1356531.
- Rivera, A. y Maxwell, S.A. (2005). The p53-induced gene-6 (proline oxidase) mediates apoptosis through a calcineurin-dependent pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 29346–29354.
- Rivera-Pérez, C., Gaxiola-Robles, R., Olgún-Monroy, N., Lugo-Lugo, O., López-Cruz, R. y Zenteno-Savín, T. (2021). Effect of hypoxia on purine metabolism in human skeletal muscle cells. *Biotechnica*, (2): 141-148.
- Rokicki, W., Strzałkowski, A., Kłapcinska, B., Danch, A. y Sobczak, A. (2003). Antioxidant status in newborns and infants suffering from congenital heart defects. *Wiadomości Lekarskie*, 56(7-8): 337–340.
- Rotondo, J.C., Mazzone, E., Bononi, I., Tognon, M. y Martini, F. (2019) Association between simian virus 40 and human tumors. *Frontiers in Oncology*, (9):670. doi: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00670>.

- Sablina, A., Budanov, A., Ilyinskaya, G., Agapova, L., Kravchenko, J. y Chumakov, P. (2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature Medicine*, 11(12): 1306-1313. doi: 10.1038/nm1320.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M. y Munck, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, 21(1):55–89. doi:10.1210/er.21.1.55.
- Segawa, M., Sugano, S. y Yamaguchi, N. (1980). Association of simian virus 40 T antigen with replicating nucleoprotein complexes of simian virus 40. *Journal of Virology*, 35(2):320-30. doi: 10.1128/JVI.35.2.320-330.1980.
- Shay, J., Pereira-Smith, O. y Wright, W. (1991a). A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Experimental Cell Research*, 196: 33-39 pp. doi: 10.1016/0014-4827(91)90453-2.
- Stillström, J. (1973). Immunogenicity and immunosensitivity of SV40-transformed cells with different oncogenic potential. *International Journal of Cancer*, (12)2: 493-501. doi: 10.1002/ijc.2910120220.
- Shay, J., Wright, W. y Werbin, H. (1991b). Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1072: 1-7. doi: 10.1016/0304-419x(91)90003-4.
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4: 180 -183.
- Sies, H., Berndt, C., y Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86: 715–748. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037.
- Sigma Aldrich. (2023). Antibiotic kill curve. Protocol. Disponible: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/antibiotic-kill-curve> [consulta: 19 de abril de 2023].
- Stadtman, E.R. y Levine, R.L. (2000). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899: 191–208.
- Stewart, N y Bacchetti, S. (1991). Expression of SV40 Large T antigen, but not small T antigen, is required for the induction of chromosomal aberrations in transformed human cells. *Virology*, (180): 49-57 pp.
- Stewart, S.A. y Weinberg, R.A. (2002). Senescence: does it all happen at the ends? *Oncogene*, 21(4): 627-30.
- Scherer, W.F., Syverton, J.T. y 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. *The Journal of Experimental Medicine*, 97(5):695-710. doi: 10.1084/jem.97.5.695.
- Stoddart, M. (2011). Cell viability assays: Introduction. In: Stoddart, M. (ed). *Mammalian Cell Viability. Methods in Molecular Biology vol 740*. Springer Protocols. Humana Press. London, U.K. 244 p.
- Strober, W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology, Appendix 3: Appendix 3B*. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.
- Song, M., Liu, Y., Huang, X., Ding, S., Wang, Y., Shen, J., y Zhu, K. (2020). A broad-spectrum antibiotic adjuvant reverses multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Nature Microbiology*, 5: 1040–1050. doi:10.1038/s41564-020-0723-z.
- Sowd, G., Mody, D., Eggold, J., Cortez, D., Friedman, K. y Fanning, E. (2014). SV40 utilized ATM kinase activity to prevent non-homologous end joining of broken viral DNA replication products. *PLoS Pathogens*, 4(12):e1004536. doi: 10.1371/journal.ppat.1004536.

- Subamanian, N., Dhar, R., y Weissman. (1977). Nucleotide sequence of a fragment of SV40 DNA that contains the origin of DNA replication and specifies the 5' ends of "early" and "late" viral RNA. III. Construction of the total sequence of EcoRII-G fragment of SV40 DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 152(1):355-367. doi: 10.1016/S0021-9258(17)32837-5.
- Suzuki, K. (2000). Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. In: Taniguchi, N., Gutteridge, J. (Ed.). *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species*. Oxford University Press, U.K. pp. 91-95.
- Sweet, B. y Hilleman, M. (1960). The vacuolating virus, S.V. 40. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 105:420-7. doi: 10.3181/00379727-105-26128.
- Tabin, C. J., Bradley, S. M., Bargmann, C. I., Weinberg, R.A., Papageorge, A., Scolnick, E. M., Dhar, R., Lowy, D. y Chang, E. (1982). Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature*, 11(300): 143-149.
- Tabuchi, Y., Ohta, S., Yanai, N., Obinata, M., Kondo, T., Fuse, H. y Asano, S. (2002). Development of a conditionally immortalized testicular Sertoli cell line TTE3 expressing Sertoli cell-specific genes from mice transgenic for temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Cell Structure and Function*, 167 (3): 1538–45. doi: 10.1247/csf.28.87.
- Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida S, Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, K., Ide, T. y Hara, E. (2006). Mitogenic signalling and the p16^{INK4a}-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nature Cell Biology* 8: 1291–1297.
- Tashiro, K., Segawa, T., Futami, T., Suzuki, M. y Itou, T. (2023). Establishment and characterization of novel kidney cell line derived from the common bottlenose dolphin. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Animal*, (59): 536-549. doi: 10.1007/s11626-023-00786-y.
- Tevethia, M.J. y Ozer, H. (2001). SV40-Mediated Immortalization. In: Raptis, L. (eds.) *SV40 Protocols. Methods in Molecular Biology: SV40 Protocols, vol 165*. Humana Press. doi: 10.1385/1-59259-117-5:185.
- Thenet, S., Benya, P.D., Demignot, S., Feunteun, J. y Adolphe, M. (1992). SV40-immortalization of rabbit articular chondrocytes: alteration of differentiated functions. *Journal of Cellular Physiology*, 150:158–67. doi: 10.1002/jcp.1041500121.
- Tran, E., Shi, T., Li, X., Chowdhury, A., Jiang, D., Liu, Y., Wang, H., Yan, C., Wallace, W., Lu, R., Ryan, A.L., Marconett, C.N., Zhou, B., Borok, Z. y Offringa, I. (2022). Development of human alveolar epithelial cell models to study distal lung biology and disease. *iScience*, 25: 103780. doi: 10.1016/j.isci.2022.103780.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. y Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1):44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- Valls, E., Blanco-García, N., Aquizu, N., Piedra, D., D Estarás, C., Cruz, X. y Martínez-Balbás, M. (2007). Involvement of chromatin and histone deacetylation in SV40 T antigen transcription regulation. *Nucleic Acids Research*, (35) 6: 1958–1968. doi: 10.1093/nar/gkl1113.
- Van Der Haegen, B. y Shay, J. (1993). Immortalization of human mammary epithelial cells by SV40 Large T-Antigen involves a two step mechanism. *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Journal of the Tissue Culture Association*, 29A:180-182. doi: 10.1007/BF02634177.
- Vander-Heiden, M., Cantley, L. y Thompson, C. (2009). Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324: 1029. DOI: 10.1126/science.1160809.

- Vázquez-Medina, J., Zenteno-Savín, T. y Elsner, R. (2006). Antioxidant enzymes in ringed seal tissues: Potential protection against dive-associated ischemia/reperfusion. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 142: 198-204. doi: 10.1016/j.cbpc.2005.09.004.
- Vázquez-Medina, J. (2007). *Defensas antioxidantes en pinnípedos. Tesis de maestría*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). México. 88 pp.
- Vázquez-Medina, J.P., Zenteno-Savín, T., Elsner, R. y Ortiz, R. (2012). Coping with physiological oxidative stress: A review of antioxidant strategies in seals. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 182:741–750. doi: 10.1007/s00360-012-0652-0.
- Vogelstein, B., Lane, D. y Levine, A. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408: 307-310.
- Wang, J., Su, W., Nie, W., Wang, J., Xiao, W. y Wang, D. (2011). Establishment and characterization of fibroblast cell lines from the skin of the Yangtze finless porpoise. *In Vitro Cellular and Developmental Biology. Animal*, 47:618-630. doi: 10.1007/s11626-011-9448-x.
- Wartzok, D. (2008). Breathing. In: Würsig, B., W. Perrin., J. G. M. Thewissen (eds). *Encyclopedia of Marine Mammals*, 2 nd ed. Academic Press, U.S.A, pp. 152-155.
- Welcker, M. y Clurman, B. (2005). The SV40 large T antigen contains a decoy phosphodegron that mediates its interactions with Fbw7/hCdc. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (9): 7654-7658.
- Wilhelm Filho, D. W., F. Sell., L. Ribeiro., M. Ghislandi., F. Carrasquedo., C. G. Fraga., J. P. Wallauer., D. E. Simões-Wilson. y M. M. Uhart. (2002). Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 133: 885-892. doi: 10.1016/s1095-6433(02)00253-2.
- Winterbourn, C. (2020). Biological chemistry of superoxide radicals. *ChemTexts*, 6:7. doi: /10.1007/s40828-019-0101-8.
- Wright, J., Jordan, M. y Wurm, F. (2001). Extraction of plasmid DNA using reactor scale alkaline lysis and selective precipitation for scalable transient transfection. *Cytotechnology*, 35: 165-173 pp.
- Wright, W., Perreira-Smith, O. y Shay, J. (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 9(7): 3088-3092 pp.
- Wright, W. & Shay, J. (1992). The two stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Experimental Gerontology*, (27): 383-389.
- Xu, H., Xiang, X., Ding, W., Dong, W. y Hu, Y. (2023). The research progress on immortalization of human B cells. *Microorganisms*, 11:2936. doi:10.3390/microorganisms11122936.
- Yajing, S., Rajput, I.R., Ying, H., Fei, Y., Sanganyado, E., Ping, L., Jingzhen, W. y Wenhua, L. (2018). Establishment and characterization of pygmy killer whale (*Feresa attenuata*) dermal fibroblast cell line. *PLoS ONE*, 13(3): e0195128. doi: 10.1371/journal.pone.0195128.
- Yanai, Y., Suzuki, M. y Obinata, M. (1991). Hepatocyte cell lines established from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T antigen gene. *Experimental Cell Research*, 197: 50–6. doi: 10.1016/0014-4827(91)90478-d.
- Yang, H., Song B., Sim, B., Jung, Y., Chae, U., Lee, D., Cha, J., Baek, S., Lim, K., Choi, W., Lee, H., Son, H., Park, S., Jeong, K., Kang, P., Baek, S., Koo, B., Kim, H., Jin, Y., Park, Y., Choo, Y. y Kim, S. (2020). Establishment and characterization of immortalized miniature pig pancreatic cell lines expressing oncogenic K-Ras^{G12D}. *International Journal of Molecular Sciences*, 21:8820. doi:10.3390/jms21228820.

- Yao, T. y Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(2): 99-117. doi: 10.1002/rmb2.12024.
- Yu, J., Boyapati, A. y Rundell. (2001). Critical role for SV40 small-t antigen in human cell transformation. *Virology*, 290:192-198.
- Yuan, H., Veldman, T., Rundell, K. y Schlegel, R. (2002). Simian virus 40 small tumor antigen activates AKT and telomerase and induces anchorage-independent growth of human epithelial cells. *Journal of Virology*, 76 (21): 10685-10691. doi: 10.1128/JVI.76.21.10685-10691.2002.
- Zaika, A.I., Wei, J., Noto, J.M. y Peek R.M. (2015) Microbial regulation of p53 tumor suppressor. *PLoS Pathogens*, 11(9): e1005099.
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical analysis, 4th ed.* Prentice Hall, Upper Saddle River, U.S.A. 663p.
- Zenteno-Savín, T., Hernández-Clayton, E. y Elsner, R. (2002). Diving seals: are they a model for coping with oxidative stress? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 133: 527-536. doi: 10.1016/s1532-0456(02)00075-3.
- Zenteno-Savín, T., Vázquez-Medina, J. P., Cantú-Medellín, N., Ponganis, P. y Elsner, R. (2012). Ischemia/Reperfusion in diving birds and mammals: How they avoid oxidative damage. In: *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. Blackwell Publishing, U.S.A. doi:10.1002/9781444345988.
- Zhang, Y., Wang, Z., Chen, H., Chen, Z. y Tian, Y. (2014). Antioxidants: potential antiviral agents for Japanese encephalitis virus infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 24: 30-36.
- Zhang, K., Li, H., Dong, S., Liu, Y., Wang, D., Liu, H., Su, F., Ge, L. y Jiang, Y. (2019). Establishment and evaluation of a PRRSV-sensitive porcine endometrial epithelial cell line by transfecting SV40 large T antigen. *BMC Veterinary Research*, 15:299. doi: 10.1186/s12917-019-2051-1.
- Zhao, J.J., Gjoerup, O.V., Subramanian, R.R., Cheng, Y., Chen, W., Roberts, T.M. y Hahn, W.C. (2003). Human mammary epithelial cell transformation through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer Cell*, 3(5):483-95. doi: 10.1016/S1535-6108(03)00088-6.