



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**“Efectos de la activación prolongada
del receptor TLR4 sobre la expresión de
marcadores de senescencia en células
cebadas”**

T E S I S

Que presenta

Méd. Cir. Paola Mendoza Montiel

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS EN

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directora de Tesis:

Dra. Claudia González Espinosa

Este proyecto se desarrolló en el laboratorio 11 del Departamento de Farmacobiología y en el laboratorio N2L4 del Centro de Investigación en Envejecimiento del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) del I.P.N. (Unidad Sede Sur) bajo la dirección de la Dra. Claudia González Espinosa.

El trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) mediante la beca de posgrado con número de CVU: 1148727 y el proyecto CF-2019-51488.

“Science is magic that works”

-Kurt Vonnegut.

A la persona que, hace un tiempo, se propuso ser fiel a sus sueños sin importar lo que la sociedad considerara aceptable, y después de ocho años de esfuerzo, ha logrado alcanzar uno de esos objetivos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Claudia González Espinosa, mi directora de tesis, le agradezco por brindarme la oportunidad de formar parte de su laboratorio, por su paciencia y por enseñarme que el esfuerzo, la dedicación y la perseverancia son fundamentales para la formación de científicos de excelencia académica y, por ende, para el desarrollo de investigaciones científicas de alto impacto.

A la Dra. Mónica Lamas Gregori y la Dra. Marina Macías Silva, mi comité sinodal, cuyas aportaciones y correcciones me ayudaron a enriquecer y mejorar el desarrollo de mi proyecto.

Al Dr. Emilio Galván, por sus aportaciones e interés en el desarrollo de mi proyecto.

A la Dra. Iris Karina Madero Salcedo, por su asesoría y disponibilidad en los estudios de citometría de flujo.

A Alfredo Ibarra Sánchez, por su infinita paciencia y por enseñarme paso por paso cada técnica que empleé durante mi estancia en el laboratorio.

A Rodolfo Pérez Lagunes, por su apoyo técnico en el laboratorio, así como el cuidado de los ratones y por organizar mi lugar de trabajo para que se viera ordenado.

A la Dra. Tzindilú Molina Muñoz, por su paciencia e interés en obtener los mejores resultados para mi proyecto en cada sesión de microscopía confocal.

A mis compañeras: Frida Martínez, por su disposición para enseñarme a utilizar el microscopio confocal y asesorarme en la técnica de inmunofluorescencia; a Monse Osorio, por siempre escucharme sin juzgar cuando necesitaba un respiro; a Alicia Hernández, por siempre estar dispuesta a ayudarme, resolver mis dudas y compartir esa pasión por la ciencia; y a Diana Esparza, por compartir el último periodo de mi maestría y siempre sacarme una sonrisa cuando llegaba al laboratorio. A todas, gracias por su agradable compañía y las eternas horas de plática que teníamos en el aula de estudiantes.

A mis compañeros de maestría por su cálida compañía en las pocas veces que nos reunimos.

A Shareny Freyffeldt Flores, por su eficacia y su amable atención para resolver cada duda y trámite que necesitaba realizar.

Al personal del bioterio: Dr. Jorge Fernández Hernández, Manuel García Gómez, Ricardo Gaxiola Centeno, María Antonieta López López y Benjamín E. Chávez Alvarez, por el cuidado y manejo de los animales del bioterio.

A Víctor Manuel Mendoza Salas, por su apoyo y amable atención en cada ocasión en la que requerí material de la biblioteca.

A mi madre, Alma Delia Montiel Tejeda, por siempre apoyarme y estar presente en todo lo que le planteo sin importar las circunstancias. Sin ti nunca habría conocido un amor incondicional.

A mi padre, Alejandro Mendoza Grajeda, quien me ha brindado todas las herramientas para poder llegar al lugar en el que me encuentro en este momento. Gracias por enseñarme a no rendirme nunca y saber que todo, a excepción de la muerte, tiene una solución.

A mis hermanos, Alejandro Mendoza Montiel y Mariana Mendoza Montiel, para quienes espero fungir de apoyo en algún momento. Sin ustedes no tendría recuerdos tan divertidos, no sabría el significado de compartir, ni mucho menos entendería lo que es tener personas a la distancia y sentir las presentes en mi mente y corazón día a día.

A mi abuelita, María Luisa Tejeda Rodríguez, por mostrarme su fortaleza aún en situaciones tan difíciles como las que ha vivido. De solo pensarte, tu alegría se contagia.

A mi tío, Marco Antonio Mendoza Grajeda, por apoyarme durante mis etapas académicas.

A Ana Karen Mendoza San Vicente, por ser mi contención emocional, por no juzgar ni una mínima parte de mí, aun sabiendo mis imperfecciones.

A Erick Fernando Rosales Valdes, quien fue, es y continúa siendo mi guía, mi lugar seguro y mi fuente de inspiración para lograr ver en mí todas las posibilidades que me rodean y las capacidades que tengo para alcanzar mis objetivos. Gracias por formar parte de mi vida.

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	II
RESUMEN	VI
ABSTRACT.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Generalidades de las células cebadas: características morfológicas y fisiológicas.....	1
1.2 Activación de las células cebadas	3
2. El lipopolisacárido bacteriano, su rol en la salud y el envejecimiento	8
3. Panorama general del ciclo celular	9
4. Envejecimiento y senescencia celular: definición, características y función	13
5. Fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP).....	18
6. Antecedentes	20
6.1 El LPS como inductor de senescencia	20
6.2 Las células cebadas y el envejecimiento	25
6.3 Antecedentes directos	27
7. JUSTIFICACIÓN.....	30
8. HIPÓTESIS.....	30
9. OBJETIVOS	30
9.1 Objetivo general	30
9.2 Objetivos específicos	30
10. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
10.1 Animales y generación de células cebadas (BMMCs).....	31
10.2 Ensayo de desgranulación	32
10.3 Western Blot.....	32
10.4 Inmunofluorescencia.....	33

10.5 Ensayo de β -galactosidasa.....	34
10.6 ELISA	35
10.7 Ciclo celular	36
11. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	39
12. RESULTADOS	42
13. DISCUSIÓN	52
14. CONCLUSIONES.....	60
15. PERSPECTIVAS	60
16. BIBLIOGRAFÍA.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN
Figura 1	Célula cebada de un ratón joven observada mediante micrografía electrónica
Figura 2	Receptores de superficie en células cebadas humanas
Figura 3	Activación mediada por IgE en células cebadas
Figura 4	Señalización del TLR4
Figura 5	Etapas del ciclo celular y su regulación
Figura 6	Traslocación citoplasmática de p21
Figura 7	Inductores y vías de señalización que conllevan a la senescencia celular
Figura 8	Cambios característicos de las células senescentes
Figura 9	Expresión de p21 y p16 en BMMCs de distintas edades en cultivo
Figura 10	La expresión de RNAm de citocinas en BMMCs jóvenes y senescentes
Figura 11	Distribución de las fases del ciclo celular en BMMCs procedentes de ratones jóvenes vs. ratones envejecidos
Figura 12	Tinciones y tubos utilizados para el análisis de las BMMCs mediante citometría de flujo. Detalles en el texto.
Figura 13	Estrategia de gating para la evaluación de las fases del ciclo celular
Figura 14	Diseño experimental para evaluar la expresión de p21 y la actividad de la enzima β -galactosidasa en BMMCs
Figura 15	Diseño experimental para evaluar la inducción del SASP, la redistribución subcelular de p21 y el arresto del ciclo celular en BMMCs
Figura 16	La exposición prolongada al LPS incrementa la expresión de p21 en BMMCs
Figura 17	La exposición prolongada al LPS no induce cambios en la redistribución subcelular de p21 en BMMCs

Figura 18	La exposición prolongada al LPS produce un aumento en la actividad enzimática de la β -galactosidasa en BMMCs
Figura 19	La exposición prolongada al LPS induce un fenotipo secretor asociado a senescencia transitorio en células cebadas murinas
Figura 20	La exposición prolongada al LPS induce un arresto en la fase G1 del ciclo celular en BMMCs
Figura 21	Resumen gráfico de resultados. La exposición prolongada al LPS induce la adquisición de marcadores de senescencia en BMMCs postmitóticas en un modelo de SIPS

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCIÓN
Tabla 1	Inducción de senescencia celular a través de la exposición al LPS en concentración, tiempo y tipos celulares diversos
Tabla 2	Reactivos utilizados para el análisis mediante citometría de flujo
Tabla 3	Marcadores de senescencia en células postmitóticas

TABLA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS	
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico
AREG	Anfirregulina
ARN/RNA	Ácido ribonucleico
ARN/RNA_m	ARN mensajero
ASAP	Fenotipo asociado a estrés agudo
ATM	Ataxia Telangectasia Mutada
ATR	Proteína relacionada con Rad-3
BMMCs	Células cebadas derivadas de médula ósea
CCs	Células cebadas
Cip/Kip	Proteína que interactúa con CDK/Proteína inhibidora de cinasa
CDKs	Cinasas dependientes de ciclinas
CDKIs	Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas
CDKN1A	Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1 A
CEBPβ	Proteína beta de la familia de proteínas de unión a potenciadores de CCAAT
CLRs	Receptores de lectina-C
c-KIT	Receptor para el SCF
DAG	Diacilglicerol
DPS	Senescencia programada del desarrollo
FcεRI	Receptor de alta afinidad a la inmunoglobulina E
GFB4	Proteína 4 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina
γ-H2A.X	Gamma histona de la familia H2AX fosforilada en la posición Ser139
HUVEC	Células endoteliales derivadas de la vena umbilical de humanos
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
ICAM1	Molécula de adhesión intercelular 1
IgE	Inmunoglobulina E
IKK	Cinasa de IκB
IL-	Interleucina
IMPS-1	Inhibidor tisular de la metaloproteinasas 1
INHBA	Subunidad Beta A de Inhibina
INK4	Inhibidor de CDK4
IRAK	Cinasa del complejo IL-1R
IP3	Inositol 1,4,5,-trifosfato

ITAMs	Motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores
LAT	Proteína de andamiaje para la activación de células T
LBP	Proteína de unión a lipopolisacárido
LIMK	Cinasa 1 del dominio LIM
LPS	Lipopolisacárido
LRRs	Dominios ricos en leucinas
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MMP	Metaloproteinasas de matriz
miRNA	Micro RNA
MyD88	Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
NLRs/NOD like receptors	Receptores similares a NOD/ Receptores similares al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
NLAT	Proteína de andamiaje para la activación de células no T
NK	Natural killer
NFkB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
OIS	Senescencia inducida por oncogenes
PAI-1	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
PDGF-A	Proteína 1 asociada al factor de crecimiento derivado de plaquetas
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
PI3K	Fosfatidil-inositol-3-cinasa
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKC	Proteína cinasa C
PLCγ	Fosfolipasa C
pRB	Proteína asociada al retinoblastoma
PRR	Receptores de reconocimiento de patógenos
RIG-I	Gen I inducible por ácido retinoico
RLRs	Receptores similares a RIG-I
rTEM	Migración transendotelial inversa
ROCK1	Cinasa 1 dependiente de Rho
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RS	Senescencia replicativa
SASP	Fenotipo secretor asociado a senescencia

SAHF	Focos de heterocromatina asociados a senescencia
SAMHD1	Proteína 1 que contiene el dominio SAM y el dominio HD
SCF	Factor de células madre
Ser	Serina
SIPS	Senescencia prematura inducida por estrés
TBK1	Cinasa 1 de unión a TANK
Thr	Treonina
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TIR	Dominio de receptor Toll/interleucina 1
TIRAP	Proteína adaptadora que contiene un dominio TIR
TLR	Receptores tipo toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAF-6	Factor asociado al factor de necrosis tumoral
TRAM	Molécula adaptadora relacionada a TRIF
TRAP	Proteínas adaptadoras transmembrana
TRIF	Proteína adaptadora que contiene un dominio TIR inductora de interferón-β
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
WAF1/CIP1	Péptido intestinal vasoactivo

RESUMEN

Una de las características más distintivas del envejecimiento de los seres vivos es la senescencia celular (SC). Este proceso ocurre en todas las células con capacidad proliferativa y recientemente, se ha observado que incluso las células postmitóticas también se vuelven senescentes. Los marcadores clásicos de la SC son un grupo de moléculas y cambios que ocurren en los procesos celulares y que aparecen con el paso del tiempo y los ciclos de división celular. Los marcadores clásicos de senescencia son 1) el arresto en la fase G1 del ciclo celular; 2) el aumento de proteínas reguladoras negativas del ciclo celular, como p21 y p16; 3) cambios en la morfología celular, donde las células se notan aplanadas y agrandadas; 4) un aumento en la actividad de la enzima β -galactosidasa debido a un aumento en la masa lisosomal; 5) la pérdida de proteínas involucradas en la arquitectura nuclear como la lámina B; y 6) la adquisición de un fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP), el cual incluye diversas moléculas proinflamatorias como el TNF α , la IL-6, metaloproteinasas, quimiocinas y factores de crecimiento, entre otros. Según el tipo de inductor, es posible clasificar a la senescencia en 1) replicativa, 2) inducida por estrés (SIPS), y 3) inducida por la represión de oncogenes. En el presente proyecto se evaluó la aparición de marcadores de SIPS en un linaje celular del sistema inmune innato: las células cebadas (CCs). Esas células se encuentran en todos los tejidos vascularizados del cuerpo y controlan el inicio y mantenimiento de diversas reacciones inflamatorias desencadenadas por varios estímulos, como los complejos de inmunoglobulina E (IgE)/antígeno (Ag) y distintos patrones moleculares asociados a daño o a patógenos (DAMPs y PAMPs). En el adulto, se generan a partir de precursores de la médula ósea y tienen una vida media larga en los tejidos donde residen. En este trabajo se puso a prueba la hipótesis de que el lipopolisacárido bacteriano (LPS), un PAMP producido por bacterias gram-negativas, puede inducir la expresión de distintos marcadores de SC. Utilizando cultivos de CCs derivadas de la médula ósea de ratones (BMMCs), encontramos que la estimulación del receptor Toll-like 4 (TLR4) con LPS indujo la expresión de diversos marcadores de SC, como la síntesis de la proteína p21 (un regulador negativo del ciclo celular), el incremento en la actividad de la enzima β -galactosidasa y la expresión, de manera transitoria, del

SASP. Finalmente, se observó también que una exposición prolongada al LPS indujo el arresto de BMDCs postmitóticas en la fase G1 del ciclo celular.

En conjunto, nuestros datos muestran que la exposición prolongada al LPS y, por tanto, la estimulación del receptor TLR4, es un inductor de marcadores de senescencia en BMDCs, indicando que éstas son células inmunes postmitóticas que pueden adquirir un fenotipo senescente tras someterlas a un estímulo canónico de la inmunidad innata.

ABSTRACT

One of the most distinctive features of living beings aging is cellular senescence (CS). This process occurs in all cells with proliferative capacity. Recently, it has been observed that postmitotic cells can also become senescent. Classical hallmarks of SC are a group of molecules and changes that occur in cellular processes through time and cell cycle divisions. The classical hallmarks of senescence are 1) the arrest in G1 phase of cell cycle; 2) an increase in negative regulatory proteins of cell cycle, like p21 and p16; 3) changes in cellular morphology, where cells seem flat and enlarged; 4) an increase in β -galactosidase enzyme activity secondary to a rise in lysosomal mass; 5) loss of proteins involved in nuclear architecture like lamin B; and 6) the acquisition of a senescence associated secretory phenotype (SASP), which is composed of diverse proinflammatory molecules like TNF α , IL-6, metalloproteinases, chemokines and growth factors, among others. Depending on the inductor type, senescence can be classified as 1) replicative, 2) stress induced (SIPS), and 3) induced by oncogene repression. The present project evaluated the expression of SIPS hallmarks in a cellular lineage of the innate immune system: mast cells (MCs). These cells are found all over vascularized tissues in the body, and they control the beginning and maintenance of inflammatory reactions in response to some stimuli like immunoglobulin E (IgE)/antigen (Ag) complexes and different damage associated molecular or pathogen patterns (DAMPs and PAMPs). In adults, MCs are generated from bone marrow precursors, and they have a long-life expectancy in their residing tissue. This work proved the hypothesis that bacterial lipopolysaccharide (LPS), a PAMP produced by gram-negative bacteria, could induce the expression of distinct hallmark of CS. Using cultures of MCs derived from the bone marrow of mice (BMMCs), we found that the stimulation of Toll-like receptor 4 (TLR4) with LPS induced the expression of diverse hallmarks of CS like p21 synthesis (a cell cycle negative regulator), an increase in the β -galactosidase enzyme activity and the expression, in a transitory way, of the SASP. Finally, it was observed that long exposure to LPS induced the cell cycle arrest in G1 phase in postmitotic BMMCs.

Altogether, our data show that long exposure to LPS, therefore the stimulation of TLR4 receptor, is an inductor of senescence hallmarks in BMMCs indicating that these immune

postmitotic cells can acquire a senescent phenotype after the exposure to a canonical stimulus of innate immunity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de las células cebadas: características morfológicas y fisiológicas

Las células cebadas (CCs) son conocidas por su participación en respuestas de hipersensibilidad tipo I, así como por su papel como parte de la primera línea de defensa contra agentes patógenos dentro de la inmunidad innata. Son células residentes de tejidos que se encuentran en contacto estrecho con el ambiente externo como mucosas y piel ¹. Se originan a partir de células progenitoras hematopoyéticas en la médula ósea, no obstante, su maduración, a diferencia de otros linajes celulares del sistema inmune (SI), se lleva a cabo una vez que acceden a los tejidos periféricos donde residirán finalmente ^{1,2}.

Para que se lleve a cabo su maduración, las CCs dependen de la activación del receptor c-KIT por el factor de células madre (SCF) y de la presencia de interleucina 3 (IL-3) ¹. Las CCs maduras, expresan un perfil de marcadores membranales caracterizado por la expresión de CD117, CD203c, FcεRI, CD45 y CD33 en ausencia de CD34, CD38 y CD33, lo cual permite su identificación y diferenciación de otras células ³.

El proceso de diferenciación de las CCs da origen a dos subtipos principales de CCs en roedores: las células cebadas mucosales y las células cebadas de tejido conectivo. Normalmente, las CCs localizadas en tejido conectivo son redondas, sin embargo, cuando están cerca de los vasos sanguíneos adquieren una forma ovoide o elongada; en cambio, las CCs que se encuentran en fibras dérmicas se observan filiformes o estrelladas ⁴. Su diámetro promedio es de 12.6 a 13.5 μm, mientras que el diámetro aproximado del núcleo es de 4 a 7 μm ⁴. Una característica particular es su tiempo de vida, el cual se caracteriza por ser prolongado, en tejidos son capaces de sobrevivir durante meses hasta años ³. Asimismo, la superficie de las CCs contiene microvellosidades que difieren en longitud, así como protuberancias que reflejan la presencia de gránulos localizados debajo de la membrana plasmática o hendiduras que indican la exocitosis de estos. El número de gránulos es de 50 a 200 aproximadamente, abarcando alrededor de un 50 a 55% del citoplasma (Figura 1) ^{4,5}.

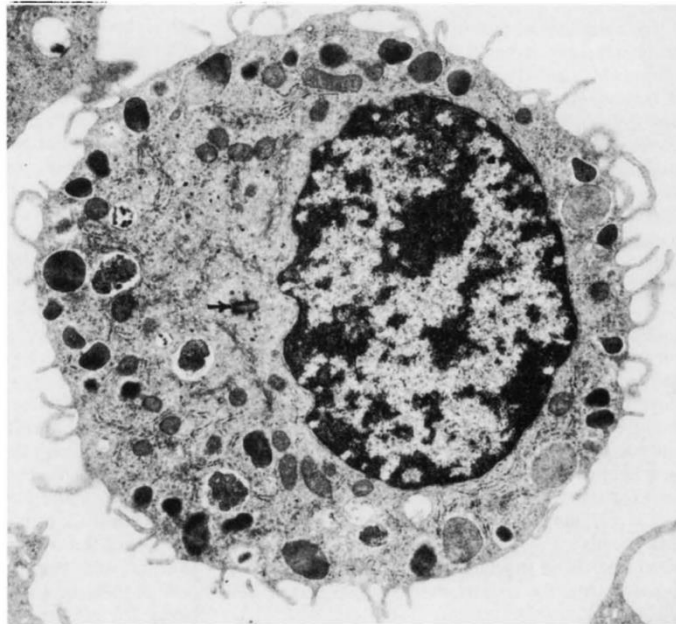


Figura 1. Célula cebada de un ratón joven observada mediante micrografía electrónica. Es posible observar las características morfológicas como las microvellosidades, los gránulos en diferentes etapas de maduración y algunos organelos como el centriolo marcado mediante una flecha. Imagen tomada de Yong, L. (1997).

Estos gránulos, también conocidos como lisosomas secretores, contienen diversos componentes, los cuales son liberados cuando las CCs desgranulan tras ser activadas por diversos estímulos externos ⁶. Dentro de los componentes que integran los gránulos se encuentran citocinas, aminos, factores de crecimiento, hidrolasas lisosomales, proteínas asociadas a membrana, proteoglicanos y proteasas ⁶. Cabe recalcar que las CCs son las únicas células capaces de almacenar citocinas y factores de crecimiento preformados en su forma activa, como el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) ⁶.

La importancia de la secreción de estos componentes radica en las funciones que ejercen en el organismo de manera fisiológica ⁵. Dentro de estas se encuentran la modulación de la vasodilatación, la angiogénesis, la homeostasis bronquial, la eliminación de bacterias, virus y parásitos, así como el crecimiento y remodelación del tejido óseo, la homeostasis mineral y en el caso de algunas proteasas tienen como objetivo inactivar venenos de diversos orígenes, regular la motilidad intestinal y la

permeabilidad de la barrera hematoencefálica ^{5,7}. Asimismo, las CCs también se encargan de regular las funciones de diversos linajes celulares, como las células dendríticas, los macrófagos, las células B y T, los fibroblastos, las células epiteliales y las endoteliales ⁵.

1.2 Activación de las células cebadas

El contacto estrecho con el ambiente externo obliga a las CCs a responder ante múltiples estímulos, esto es posible gracias al vasto número de receptores presentes en la superficie y en el citoplasma de las células cebadas que, ante una interacción con el estímulo, permite la activación y la consecuente respuesta de éstas ⁸.

Entre los receptores que se han observado en las CCs se encuentran receptores para componentes del complemento (ej. CR3, CR4), receptores de quimiocinas (ej. CXCR3, CCR2), receptores de histamina (ej. H1R-H4R), receptores Fc (ej. FCεRI, FcγRII), así como receptores de reconocimiento a patógenos (PRRs por sus siglas en inglés). Entre éstos se encuentran los receptores tipo toll (ej. TLR4, TLR2), receptores de lectina tipo-C, receptores tipo RIG-I y los receptores tipo NOD ⁸⁻¹⁰. (Figura 2)

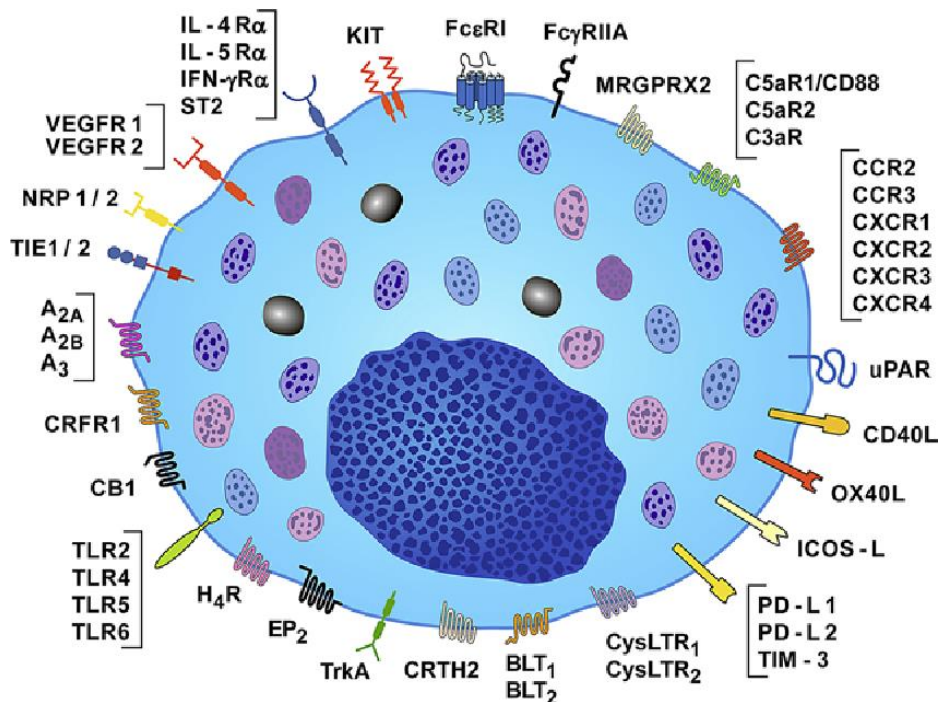


Figura 2. Receptores de superficie en células cebadas humanas.

Las células cebadas expresan una amplia gama de receptores en su superficie, como el FcεRI y el KIT, los cuales permiten su identificación y su activación en el caso del primero. También se encuentran receptores para quimiocinas, para el complemento, para histamina, así como receptores de reconocimiento a patógenos como los TLR. Existen algunas diferencias entre los receptores presentes en células cebadas humanas vs células cebadas murinas, por ejemplo, el MRGPRX2, se encuentra únicamente en CCs humanas, mientras que el homólogo en CCs murinas es el Mrgprb2 ^{11,12}. Imagen tomada de Varicchi et al (2019).

Para su estudio, los mecanismos de activación de las CCs se dividen en aquellos dependientes del receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E (FcεRI) y los independientes de ese receptor ¹³.

En el primer caso, la activación es desencadenada cuando el FcεRI es activado por complejos de inmunoglobulina E (IgE) y algún antígeno (Ag). Estos complejos se forman abundantemente en las reacciones de hipersensibilidad tipo I. El receptor FcεRI está constituido por una cadena alfa, que une a la IgE, una subunidad beta, que atraviesa cuatro veces la membrana plasmática y dos subunidades gamma, que están ancladas a la membrana y se encuentran unidas por puentes disulfuro (Figura 3) ^{9,14}. La unión de los complejos IgE/Ag al receptor permite la dimerización del receptor y activa dos cinasas de la familia Src: Fyn y Lyn, las cuales fosforilan los motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores (ITAMs) en los extremos citoplasmáticos de las subunidades β y γ del receptor a través de la unión de la proteína cinasa de tirosina Lyn (miembro de la familia Src) ^{9,15}. Posteriormente, la proteína Syk es reclutada en la cadena y conduciendo a la fosforilación de proteínas de andamiaje transmembrana (TRAP) como LAT (adaptador para la activación de células T) y NLAT (enlazador para la activación de células no T) ⁹. Esto origina dos rutas de señalización, una llamada Fyn/NTAL y la otra Lyn-LAT ¹⁵. La primera conlleva a la activación de PI3K, contribuyendo a la traslocación de NFκB al núcleo mediante la regulación de IKK ¹⁶. La otra cascada de señalización lleva a la activación de la fosfolipasa C (PLCγ), que cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), un fosfolípido membranal, para generar dos segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4, 5,-trifosfato (IP3) ^{9,16}. El IP3 se une a receptores en el retículo endoplásmico promoviendo la salida de Ca²⁺ intracelular y la apertura de canales de calcio operados por depósitos mediante un mecanismo dependiente de la molécula de interacción estromal (STIM1); por otro lado, el DAG activa

isoformas clásicas de la proteína cinasa C (PKC), las cuales también participan en la translocación del factor NFκB del citoplasma al núcleo a través de la fosforilación de IKK. Estos pasos desencadenan eventos posteriores asociados con la promoción de la expresión génica de citocinas, la producción de mediadores lipídicos como prostaglandinas y leucotrienos, así como la desgranulación de los mediadores preformados contenidos en los gránulos de las CCs ¹⁶.

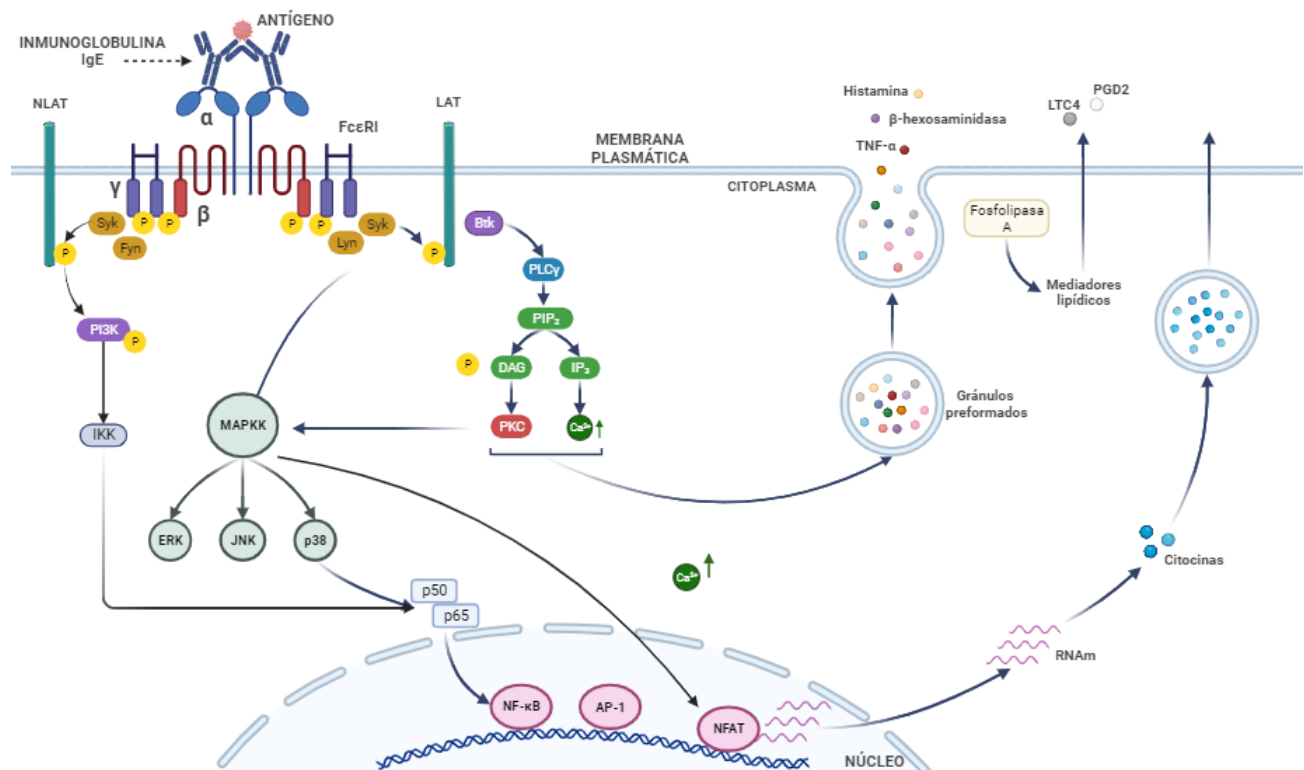


Figura 3. Activación mediada por IgE en células cebadas.

El entrecruzamiento de dos moléculas de IgE por un antígeno multivalente (círculo rojo claro) desencadena una cascada de señalización compleja, que involucra al receptor FcεRI (localizado en la membrana celular) y una vasta cantidad interacciones moleculares río abajo que conllevan a la desgranulación de mediadores proinflamatorios preformados contenidos en los gránulos, así como mediadores lipídicos y síntesis de novo en etapas tardías de la activación de las células cebadas. Ver texto para más detalles. Imagen creada con Biorender.

Otras vías de activación involucran otros ligandos y receptores distintos a la IgE/FcεRI. Por ejemplo, el lipopolisacárido bacteriano (LPS), clasificado como un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), funge como un ligando del receptor de reconocimiento a patrones, el TLR4 ^{13,17}.

El receptor TLR4 es una molécula transmembranal que pertenece a la superfamilia de proteínas con dominios ricos en leucinas (LRRs) y está compuesto de tres dominios: un ectodominio, un dominio de hélice transmembranal y un dominio intracelular llamado dominio Toll/interleucina 1 (TIR) ¹⁸. El dominio extracelular se divide en el dominio N-terminal, el central y el dominio C-terminal ¹⁸. El dominio intracelular TIR es responsable de iniciar la cascada de señalización río abajo ¹⁸.

La vía de señalización desencadenada tras la unión del LPS al receptor, involucra diversas proteínas como los complejos adaptadores MyD88/TIRAP o TRIF/TRAM, las cinasas IRAK, la ligasa de ubiquitinas TRAF-6 y las cinasas MAPK e IKK. Esta cascada de señalización culmina con la translocación del factor de transcripción NFκB y la síntesis del RNAm para distintas citocinas ¹⁸.

El primer paso para el reconocimiento del LPS por las CCs consiste en que una proteína soluble presente en el suero (LBP) une al LPS liberado de la membrana bacteriana y posteriormente la transfiere a un co-receptor membranal llamado CD14, el cual transfiere el LPS a un complejo formado por el TLR4 y la molécula accesoria MD2. Una vez que el LPS es reconocido, se forma un complejo compuesto por dos moléculas de LPS-TLR4-MD2 y se inicia la cascada de señalización ¹⁸.

El TLR4 tiene la capacidad de iniciar dos cascadas de señalización: una vía dependiente de los adaptadores MyD88/TIRAP y otra independiente de esos adaptadores y dependiente de los adaptadores TRIF/TRAM (Figura 4) ¹⁸. Cuando se activa el receptor en la superficie celular, se reclutan preferentemente MyD88 y TIRAP, los cuales incorporan al complejo a la cinasa IRAK4. Esta última activa a la ligasa de ubiquitinas TRAF-6 y después de pasar por la activación de cinasas como TAK1 e IKK, induce la translocación del factor de transcripción NF-κB al núcleo y promueve la transcripción de genes de varias citocinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF-α) e IL-6 ¹⁸.

Cuando el complejo TLR4-MD2 se endocita, activa la vía independiente de MyD88 en el compartimento endosomal y en lugar de reclutar a MyD88/TIRAP, incorpora a los adaptadores TRIF/TRAM. Esta vía de señalización lleva a la activación de la cinasa TBK1

y a la cinasas IKK ϵ , induciendo la translocación del factor de transcripción IRF3 y la transcripción de los genes para los interferones tipo beta ¹⁸.

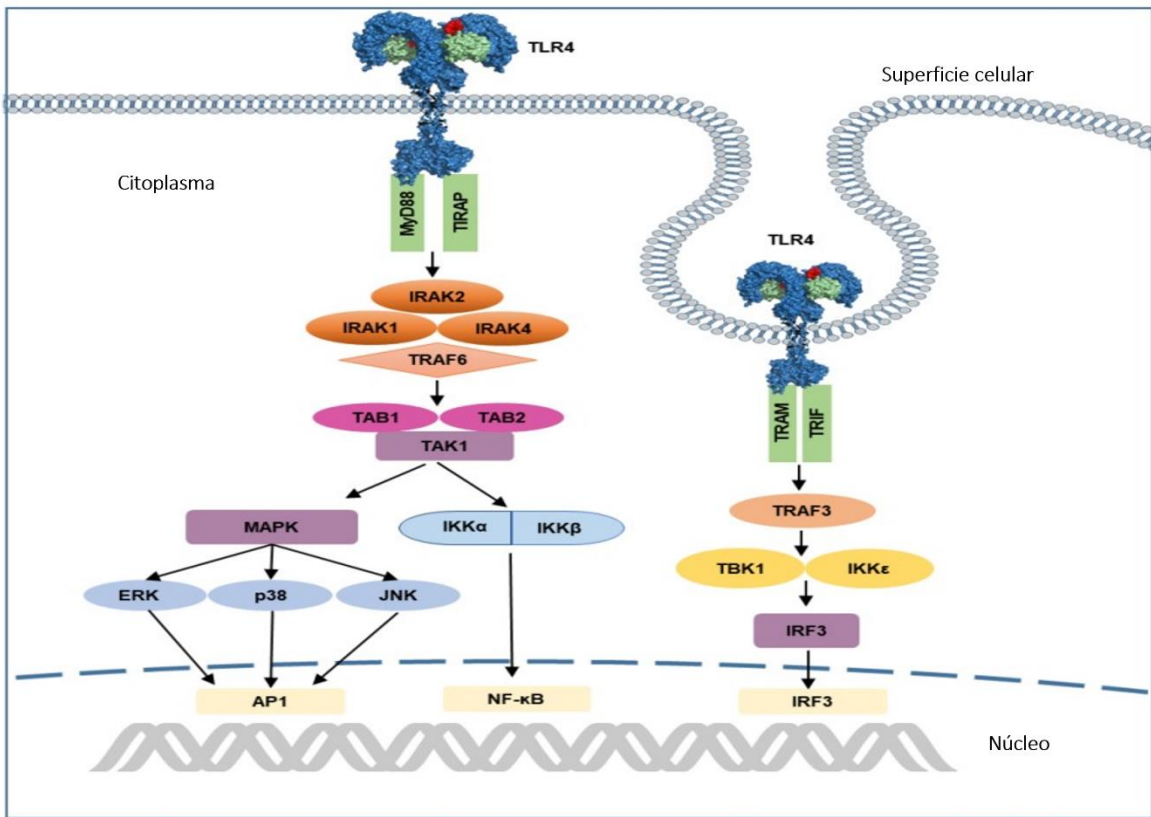


Figura 4. Señalización del TLR4

La activación del receptor TLR4 (molécula marcada en azul), requiere de la unión de la molécula MD2 (marcada en verde) para formar el complejo TLR4/MD2 que reconocerá la molécula de LPS (marcada en rojo) permitiendo la exposición de los dominios TIR, lo que favorecerá su acoplamiento a los adaptadores MYD88/TIRAP iniciando la cascada de señalización. Existen dos vías de señalización, la mediada por MYD88 y la que es independiente de MYD88. Ver texto para más detalles. Imagen modificada de Ain, Q. et al (2020).

El ligando de este receptor (el LPS) es uno de los antígenos más conocidos y estudiados. Tras someter a las células cebadas a una exposición aguda de éste, responden secretando varios mediadores inflamatorios a través de vías de señalización expuestas anteriormente que han sido descritas en distintos laboratorios, incluyendo el nuestro ¹⁹. Sin embargo, hasta el momento no se han estudiado los efectos de la exposición prolongada al LPS en células cebadas.

2. El lipopolisacárido bacteriano, su rol en la salud y el envejecimiento

El lipopolisacárido bacteriano (LPS) es una molécula constituyente de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Es una endotoxina conformada por tres dominios estructurales que son el lípido A, el oligosacárido central y el antígeno O ²⁰. La toxicidad es conferida por el lípido A y la inmunogenicidad se asocia al polisacárido ²⁰. Tiene un peso molecular >100.000 Da, es estable al calor (ebullición durante 30 minutos no desestabiliza la endotoxina), pero no a agentes oxidantes potentes como el superóxido, el peróxido y el hipoclorito ²¹.

Existen diversas formas en las que el LPS entra en contacto estrecho con el organismo. Es posible encontrarlo en agua y alimentos contaminados, en el mismo aire que respiramos proveniente de zonas industrializadas; incluso, forma parte de la microbiota intestinal, la cual es la principal fuente de LPS en individuos sanos. Allí, las bacterias que contribuyen en mayor grado a la producción de la endotoxina a nivel colónico forman parte del filo *Bacteroides* ²²⁻²⁴. Dosis altas de LPS son bien toleradas, sin embargo, cuando existe un proceso inflamatorio previamente establecido de origen diverso, es posible que esa molécula alcance el torrente sanguíneo, cobrando importancia y permitiendo el desarrollo de entidades patológicas que conducen o agravan la evolución de la enfermedad. La exposición a concentraciones altas de LPS puede llevar a la muerte de la persona porque provoca condiciones patológicas como el choque séptico, esteatosis hepática, fibrosis, cirrosis y cáncer. Por otro lado, la exposición prolongada a cantidades pequeñas de LPS se ha asociado con el desarrollo de enfermedades cardio-metabólicas como la obesidad y el síndrome metabólico; enfermedades dentales y respiratorias como periodontitis o cáncer de pulmón, incluso se ha reportado su participación en enfermedades autoinmunes y se ha propuesto que pudiera ocasionar envejecimiento prematuro ^{22,23,25-27}.

Con respecto a este último punto, existen diversas evidencias que indican que el LPS puede contribuir al envejecimiento. Por ejemplo, un estudio realizado por Kim y colaboradores en el 2016 evaluó la relación entre el envejecimiento y la inflamación inducida por el LPS proveniente de la microbiota intestinal. Mediante el análisis del contenido de la endotoxina en plasma y en heces de ratones C57BL/6J de 4 a 18 meses

de edad, observaron que los niveles de ambos parámetros eran mayores en los ratones envejecidos y que la endotoxina que provenía del filo *Firmicutes* se encontraba elevada en estos ratones ²⁵. Asimismo, los investigadores observaron un aumento en la activación de NFκB y un incremento en la expresión de p16 (una proteína reguladora del ciclo celular que forma parte de los marcadores de senescencia celular) en el colon de ratones envejecidos comparado con el colon de ratones jóvenes ²⁵. Otro parámetro analizado en este estudio fue la presencia de una proteína altamente expresada en células no replicativas llamada SAMHD1 (proteína 1 que contiene el dominio SAM y el dominio HD). Ese polipéptido se ha detectado en macrófagos peritoneales de ratones jóvenes expuestos a LPS. Este hallazgo, junto con la presencia de p16, ha dado origen a la hipótesis de que el LPS derivado de la microbiota intestinal participa en la aceleración del proceso inflamatorio crónico y de bajo grado característico del envejecimiento, mejor conocido como “inflammaging” ²⁵.

Otro estudio realizado en células endoteliales derivadas de la vena umbilical de humanos (HUVEC por sus siglas en inglés) por Budamagunta, V. y colaboradores en 2021, encontró que las células senescentes, además de expresar niveles basales elevados de algunas citocinas y quimiocinas inflamatorias con respecto a las células no senescentes, también exhibían una respuesta incrementada ante estímulos como el LPS, la IL-1β y el TNFα. Esto llevó a los autores a concluir que la evolución de algunas enfermedades infecciosas en personas mayores de 60 años, como COVID-19, tiende a la gravedad, ya que las células senescentes pueden predisponer a una respuesta inflamatoria exacerbada ²⁸.

3. Panorama general del ciclo celular

Al proceso mediante el cual, las células crecen y se dividen se le conoce como ciclo celular. Está conformado por dos etapas: la interfase y la mitosis ²⁹. La primera, se compone de la fase G1 donde la célula se prepara para la síntesis de DNA; la fase S, donde ocurre la síntesis del DNA; y la fase G2, donde la célula se prepara para la mitosis. Por otra parte, la segunda etapa (mitosis, M) da origen a dos células idénticas con 46 pares de cromosomas cada una. La etapa M se compone de cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase ³⁰. Además de las fases G1, S y G2, existe la fase G0,

donde las células pueden salir del ciclo celular y mantenerse en un estado no proliferativo llamado quiescencia. Éste les permite mantener sus funciones estables por tiempos prolongados y reingresar al ciclo celular en caso de que se presenten estímulos mitogénicos adecuados ³¹ (Figura 5).

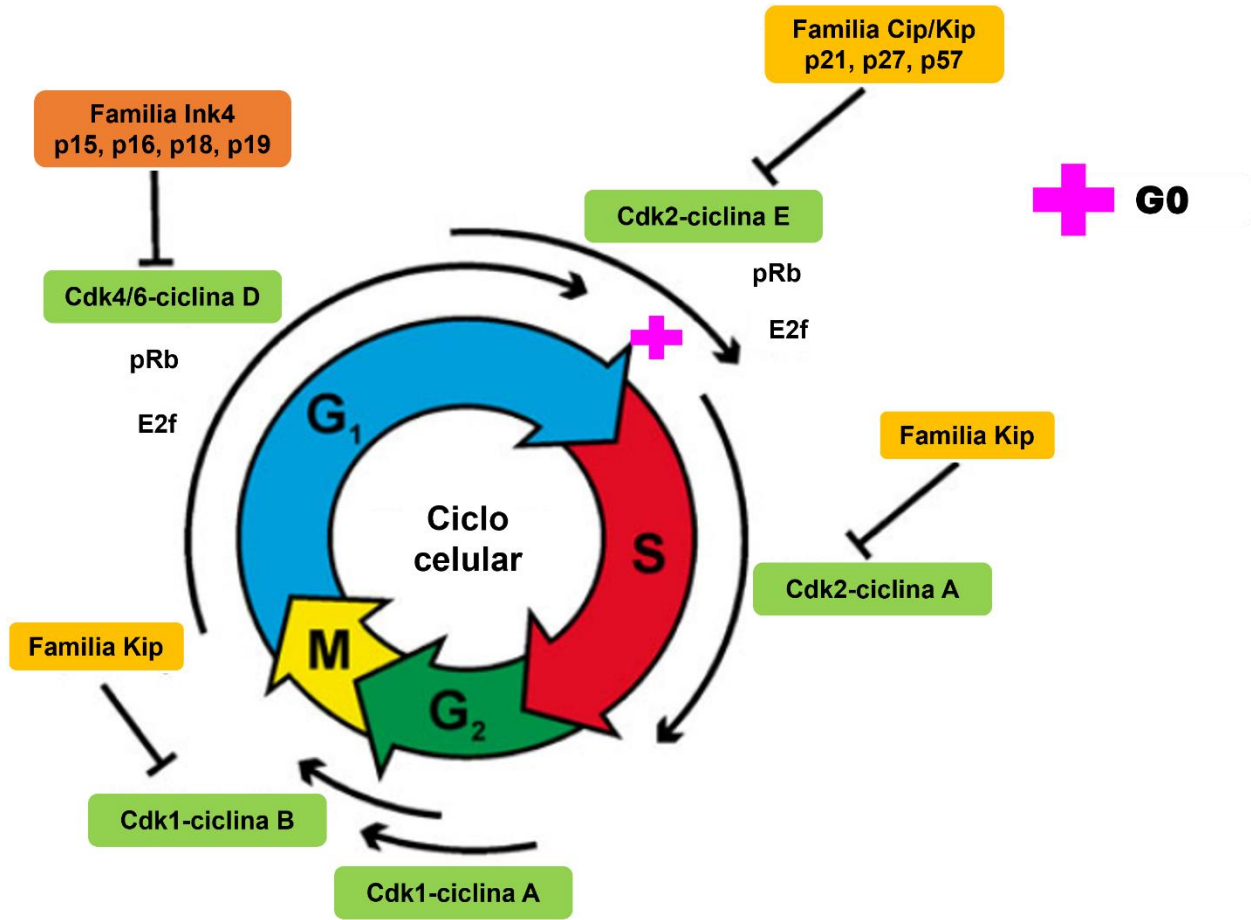


Figura 5. Etapas del ciclo celular y su regulación.

El ciclo celular está compuesto de diversas etapas que permiten la división celular, así como el crecimiento de las células. Como su nombre lo indica, es un proceso que se repite cierto número de veces, en algunos casos, las células son capaces de salir del ciclo celular y mantener por tiempo indefinido sin necesidad de dividirse, esta fase se conoce como G₀ (representado con una cruz rosa). La fase G₀ ocurre entre la fase G₁ y de síntesis o S. La progresión del ciclo se encuentra regulada por la formación de complejos entre proteínas llamadas ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (Cdks). A su vez, la actividad de las Cdks es regulada mediante reguladores negativos que pertenecen a dos familias conocidas como Ink4 y Cip/Kip. Los pasos e interacciones entre ellas se detallan en el texto. Imagen modificada de Cheffer, A., et al (2013).

Lo que permite la progresión del ciclo celular de una fase a otra es la expresión y activación de proteínas reguladoras que forman complejos entre sí y se conocen como cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y ciclinas ³².

Para que la fase G1 pueda progresar a la fase S, se requiere que se forme el complejo Cdk4/6-ciclina D, el cual permite la fosforilación de la proteína asociada al retinoblastoma (pRB) que interacciona con la familia de factores de transcripción E2F ³³. La pRB fosforilada permite la disociación de los factores de transcripción E2F, los cuales se traslocan al núcleo promoviendo la transcripción de genes necesarios para la progresión del ciclo celular ³⁴. Posteriormente, la formación del complejo Cdk2-ciclina E hiperfosforila a la pRB, lo que la inactiva, dando paso a la transcripción de genes que controlan la replicación del DNA y la transición de la fase G1 a la S del ciclo celular ^{35,36}.

Durante la fase S, el complejo Cdk2-ciclina A fosforila a la pRB permitiendo el recorrido de esta fase. Al final de ésta, se forma el complejo Cdk1-ciclina A, la cual da por finalizado este proceso dando paso a la fase G2. La transición entre G2 y la fase de mitosis se debe a la formación del complejo Cdk1-ciclina B ³³.

La actividad de las CDKs está regulada a su vez por proteínas conocidas como inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKIs). Este grupo está conformado por dos familias: la familia Cip/Kip y la familia INK4. Los principales miembros de la familia Cip/Kip son las proteínas p21, p27 y p57, que inhiben a la mayoría de los complejos, excepto Cdk4/6-ciclina D. Por su parte, la familia INK4, está conformada por las proteínas p15, p16, p18 y p19, que inhiben específicamente la actividad del complejo Cdk4/6-ciclina D ³⁷.

El arresto del ciclo celular involucra dos vías de señalización ³⁵. La primera involucra un miembro de los inhibidores de CDK, p16^{INK4}, cuya producción ocasiona su interacción con Cdk4/6 e inhibe su actividad ³⁸. La segunda, se inicia mediante las cinasas ATM y ATR, que fosforilan diferentes blancos, como la proteína p53 en su Serina-15 ^{35,38}. Esto permite su estabilización y la consecuente interacción con elementos del promotor p21/CDKN1A activando su transcripción ^{35,39}. Los niveles elevados de p21 inhiben la actividad del complejo Cdk2/ciclina E, preservando la asociación de la pRB con el factor

de transcripción E2F y lleva a la interrupción y consecuente arresto del ciclo celular ^{35,38}. (Figura 7, página 15).

La función de los reguladores negativos del ciclo celular que ejercen p21^{WAF1/CIP1} y p16^{INK4A} se lleva a cabo en el núcleo celular. No obstante, se ha reportado que p21^{WAF1/CIP1} es capaz de traslocarse al citoplasma mediante la fosforilación del residuo Thr145 donde funge como un regulador positivo del ciclo celular y participa en el control de la reorganización del citoesqueleto de actina y la migración celular ⁴⁰. En el citoplasma, p21^{WAF1/CIP1} se une a la cinasa 1 dependiente de Rho (ROCK1) lo que conlleva a la inhibición de la cascada de señalización ROCK-LIMK-cofilina (Figura 6). Algunos autores reportan que la distribución subcelular de p21^{WAF1/CIP1}, en el citoplasma, se encuentra asociada en algunos casos con eventos metastásicos o una motilidad aumentada, dependiendo del tipo celular ^{41,42}.

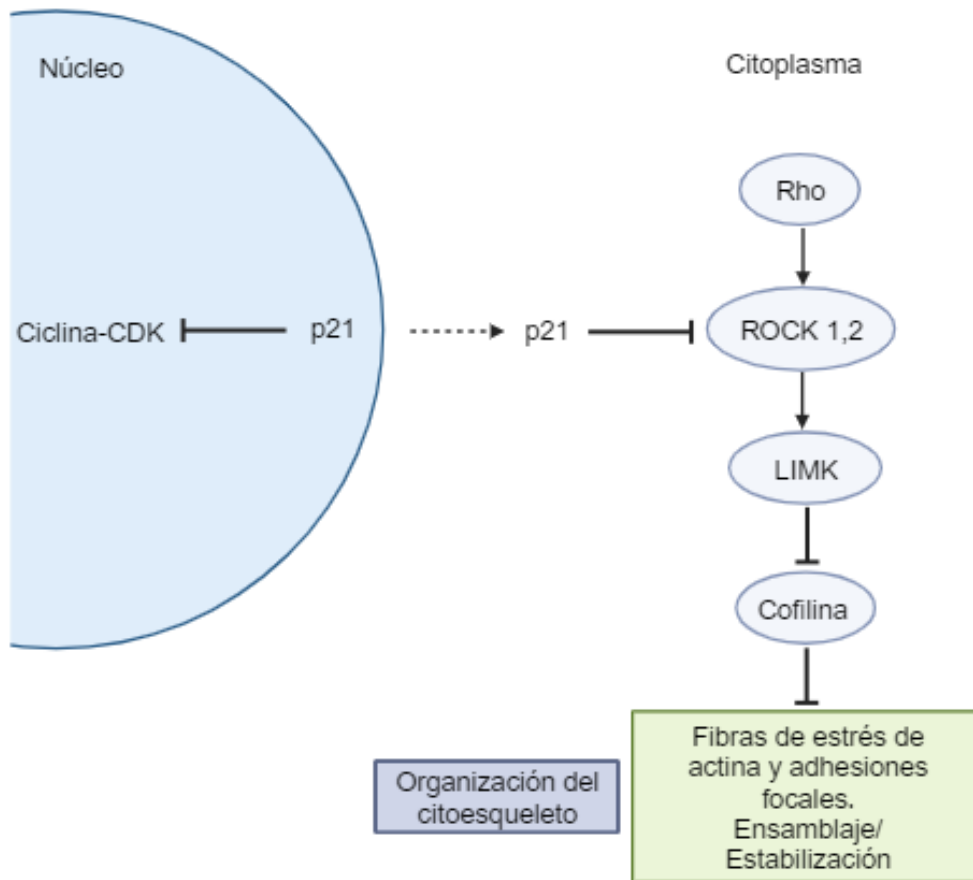


Figura 6. Traslocación citoplasmática de p21. En condiciones normales, p21 se encuentra en el núcleo ejerciendo su actividad de regulador negativo del ciclo celular. Además, en el citoplasma, modula la vía de señalización ROCK-LIMK-cofilina, que controla la formación de las fibras de estrés y las adhesiones focales ^{43,44}. Cuando p21 se transloca al citoplasma (flecha punteada), inhibe la cascada de señalización mediante su interacción con ROCK 1,2. Imagen modificada de Besson, A. et al., 2004.

4. Envejecimiento y senescencia celular: definición, características y función

El envejecimiento, es un proceso biológico que ocurre en la mayoría de los organismos uni y pluricelulares, sin embargo, conforme el grado estructural del organismo aumenta, dicho fenómeno se vuelve más complejo ⁴⁵. En organismos multicelulares, como los humanos, este proceso implica un deterioro en el funcionamiento de células, tejidos y órganos que conforman los diversos sistemas y aparatos del organismo, contribuyendo, por ejemplo, a la disminución en la agudeza visual y capacidad auditiva, cambios físicos reflejados en la piel y otros órganos, así como un decremento en la actividad psicológica que puede dificultar funciones cerebrales superiores como la memoria e incluso existe un aumento en la predisposición a sufrir enfermedades infecciosas como consecuencia de un sistema inmunológico debilitado ⁴⁶. No obstante, estos cambios, si no interfieren con la funcionalidad del organismo para desenvolverse en su entorno, se consideran parte de un envejecimiento normal o saludable ⁴⁶.

Aunado a estos cambios, se sabe que el envejecimiento se acompaña de una “inflamación sistémica crónica, estéril, de bajo grado con autorreactividad” conocida como envejecimiento inflamatorio o “inflammaging”, aumentando la predisposición del organismo para desarrollar enfermedades autoinmunes, cardiovasculares, neurodegenerativas e incluso cáncer ⁴⁷.

El envejecimiento inflamatorio se atribuye en parte al deterioro o envejecimiento del sistema inmunológico, también conocido como “inmunosenescencia”, el cual tiene un impacto sobre los componentes celulares tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa ⁴⁷.

Respecto a los cambios que suceden a nivel de la inmunidad innata, las células que se ven afectadas de manera importante son los macrófagos y los neutrófilos, ya que su actividad fagocitaria disminuye, derivando en la incapacidad de combatir infecciones de

manera eficaz y no lograr la eliminación de células muertas. Asimismo, las células Natural Killer (NK) disminuyen la secreción de moléculas citotóxicas ⁴⁷.

En la inmunidad adaptativa, se observa una disminución en el número de células T naïve y un aumento en la expansión oligoclonal de células T de memoria, secundario a una involución tímica, resultando en una menor diversidad en el repertorio inmunológico ⁴⁷. Asimismo, esto también contribuye a una liberación aumentada de células T autorreactivas y a una capacidad limitada por parte de las células T reguladoras para suprimir la acción de las células autorreactivas ⁴⁷. Esto trae como consecuencia un aumento en la predisposición del organismo para adquirir infecciones y no ser capaz de limitarlas, así como un aumento en la incidencia de cáncer ⁴⁷.

Otro fenómeno que contribuye al desarrollo y mantenimiento del envejecimiento inflamatorio es la senescencia celular, definida, de manera general, como un estado de arresto permanente del ciclo celular en la fase G1 del ciclo celular que ocurre en células proliferativas. Este fenómeno fue descubierto por los científicos Moorhead y Hayflick en los años 60's del siglo pasado, tras observar una capacidad de replicación limitada en fibroblastos humanos cultivados *in vitro* ^{48,49}. El fenómeno de senescencia puede presentarse también en células no proliferativas de larga vida media en el organismo, como en las neuronas o los miocitos cardiacos. Esas células permanecen en la fase G0 del ciclo celular, en un estado conocido como quiescencia. Con el paso del tiempo, las células quiescentes pueden pasar de la fase G0 a la G1, sin llegar a las fases G2, S o M del ciclo celular ⁵⁰.

La senescencia celular puede generarse por varios factores. Hasta el momento, según el inductor de estrés, se han identificado diversos tipos de senescencia; y aunque no todas las fuentes de estrés conducen a daño del DNA, aparentemente convergen en las mismas vías de señalización (Figura 7) ^{51,52}. Estos son:

1. Senescencia programada del desarrollo (DPS por sus siglas en inglés), identificada durante la etapa de embriogénesis en mamíferos. Se piensa que es un proceso fisiológico y su objetivo es establecer un balance entre poblaciones celulares durante el desarrollo; mientras que, en la etapa adulta, se cree que funge

como un proceso de regeneración y cicatrización tisular tras algún daño al tejido ⁵².

2. Senescencia replicativa (RS por sus siglas en inglés), atribuida al acortamiento de telómeros y a la vía de activación constituida por las proteínas p53/p21 en etapas tempranas ⁵¹.
3. Senescencia prematura inducida por estrés (SIPS por sus siglas en inglés), inducida por el estrés oxidativo y el estrés inducido por rayos ultravioleta ⁵¹.
4. Senescencia inducida por oncogenes (OIS por sus siglas en inglés), que ocurre como consecuencia a la sobreactivación de algunos oncogenes y otras proteínas asociadas a las vías de proliferación celular, principalmente el gen *ras* ⁵¹.

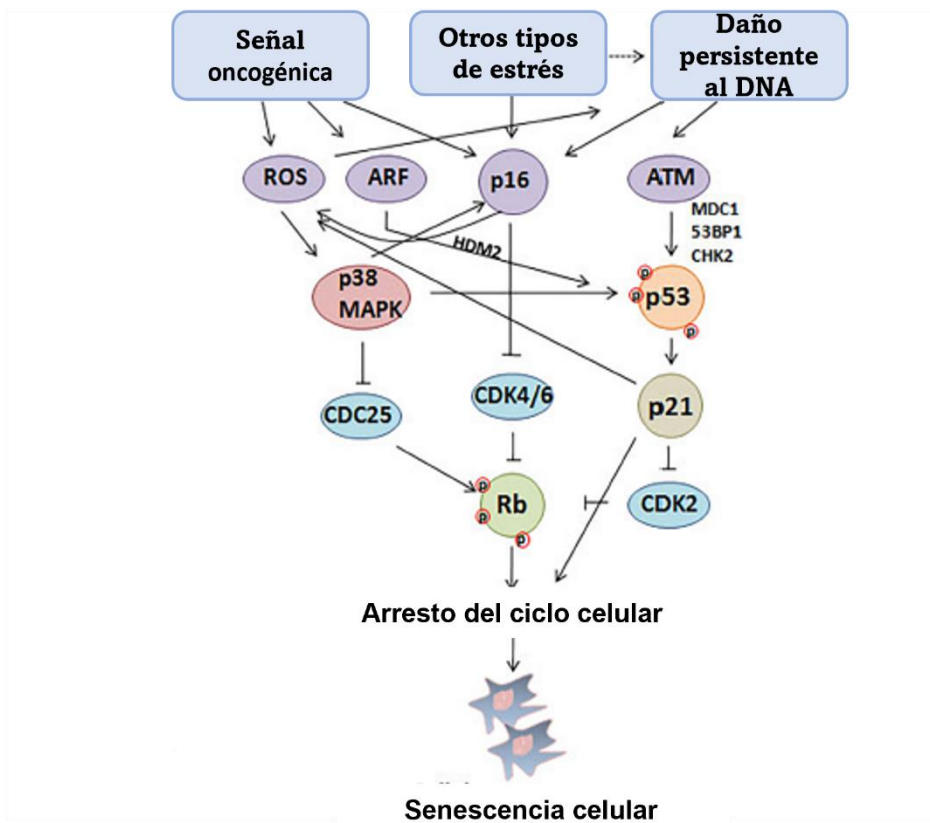


Figura 7. Inductores y vías de señalización que conllevan a la senescencia celular.

Diversas condiciones como la activación de oncogenes, diferentes tipos de estrés como el estrés genotóxico y el acortamiento de los telómeros producen señales de daño al DNA, activando de manera crónica vías de señalización como p16^{INK4a}/pRB y p53/p21^{WAF1/CIP1} a través de la inhibición de ciclinas CDK4/6, e impidiendo la activación de la familia de proteínas RB, lo que conlleva la detención del ciclo celular. De manera similar, la vía de p53/p21^{WAF1/CIP1} activa cinasas como ATM que permiten su

estabilización y conducen a una activación de genes anti-proliferativos y, consecuentemente, la activación de p21, que a su vez inhibirá la actividad de la cinasa CDK2 evitando la progresión del ciclo celular. Imagen modificada de Yang, et al. (2021).

Debido a que la senescencia celular es inducida por estímulos que dañan a las células, se considera que forma parte de un mecanismo de control de daño celular secundario a la activación de respuestas de estrés o de daño al DNA (DDR por sus siglas en inglés). La senescencia es un fenómeno que ocurre en diferentes etapas del desarrollo embrionario, así como en células de organismos adultos, donde se ha propuesto su participación en procesos de regeneración tisular tras el reclutamiento de células inmunológicas, principalmente macrófagos, de manera transitoria ⁵³. No obstante, las células senescentes también forman parte de diversas entidades patológicas en donde ejercen efectos duales, es decir pueden ejercer efectos positivos limitando el desarrollo de fibrosis en eventos isquémicos como en el caso de los infartos de miocardio; o todo lo contrario, pueden producir efectos negativos detonando una respuesta de estrés que conduce a la perpetuación de estados proinflamatorios como en la obesidad, que conlleva al desarrollo de resistencia a la insulina y esteatosis hepática ⁵³.

Aunado al arresto del ciclo celular, la senescencia se caracteriza por la presencia de marcadores de senescencia (hallmarks), que son moléculas, procesos y cambios fenotípicos cuya aparición se ha observado en numerosos tipos celulares. Los marcadores de senescencia permiten su estudio in vitro, dado que es posible caracterizar su aparición y desarrollo en respuesta al paso del tiempo o a distintos tipos de estrés en cualquier tipo celular. Los principales marcadores de senescencia están relacionados a cambios a nivel de la morfología celular, así como la expresión de un fenotipo secretor asociado a senescencia también conocido como SASP por sus siglas en inglés ⁵⁴.

Con respecto a los cambios morfológicos, se sabe que, en general, las células adherentes senescentes se tornan aplanadas e irregulares; la composición de la membrana plasmática sufre un aumento en la proteína caveolina (una proteína de andamiaje que participa en la señalización celular); existe una reorganización del citoesqueleto de actina; aumenta el número de lisosomas (que puede detectarse por un aumento en la actividad de la enzima β -galactosidasa); y el metabolismo celular se ve

alterado debido a una disfunción mitocondrial que produce niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS). Asimismo, se observan cambios a nivel nuclear a través de la pérdida de la proteína lámina B1 y la formación de focos de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF por sus siglas en inglés), los cuales juegan un rol importante en el arresto del ciclo celular, ya que funcionan como estructuras que evitan la transcripción de genes que promueven la proliferación y suelen asociarse a un daño al DNA (Figura 8) ⁵⁴⁻⁵⁸.

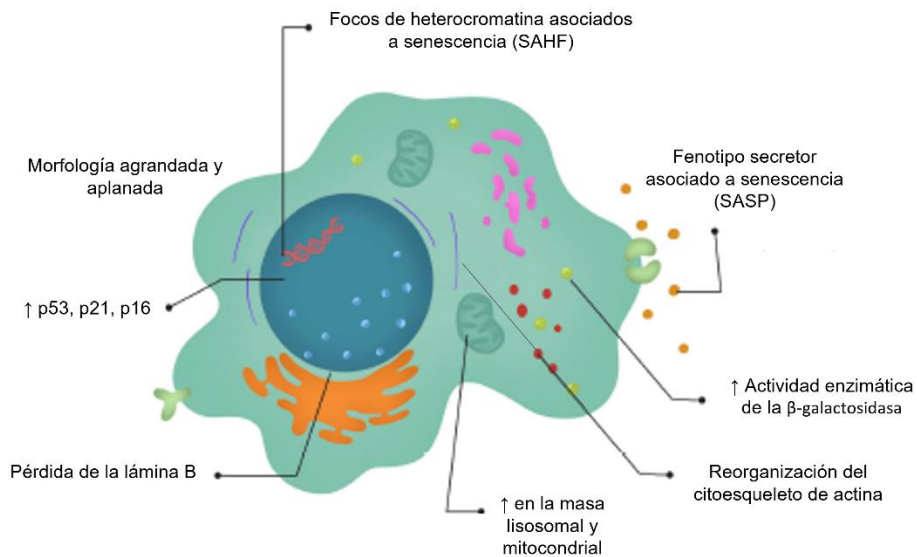


Figura 8. Cambios característicos de las células senescentes.

La imagen muestra algunos de los cambios morfológicos, estructurales y metabólicos que ocurren en células sometidas a senescencia, entre ellos se encuentra la formación de estructuras asociadas normalmente a daño del ADN como los focos de heterocromatina asociados a senescencia, la adquisición de un fenotipo secretor de moléculas proinflamatorias, un aumento en la actividad lisosomal, una reorganización del citoesqueleto de actina, pérdida de proteínas encargadas de la arquitectura nuclear como la lámina B, así como una expresión aumentada en proteínas que regulan el ciclo celular como p53, p21 y p16.

Otra de las características de la senescencia celular, es el aumento en la producción y maduración aberrante de algunos mRNAs ⁵⁹. Múltiples estudios han demostrado que diferentes miRNAs modulan los niveles de proteínas efectores claves de la senescencia ⁵⁹.

Además de esas alteraciones, existe un aumento en la síntesis de proteínas inhibidoras de cinasas dependientes de ciclina (CDK) como p21^{WAF1/CIP1} y p16^{INK4A} ⁴⁹. Es importante mencionar que la expresión de p21^{WAF1/CIP1} en conjunto con p53 es transitoria ya que, una vez establecida la senescencia, los niveles de estas proteínas disminuyen. Por otro lado, la expresión de p16^{INK4A} aumenta, manteniendo el arresto del ciclo celular en las fases G1 y G2 ⁶⁰. Debido a la detención irreversible del ciclo celular, la senescencia celular suele considerarse un mecanismo antitumoral ⁵⁴. Las vías de señalización, p53/p21^{WAF1/CIP1}/RB y p16^{INK4A} /RB, pueden actuar en conjunto o de manera individual para evitar la proliferación excesiva de células transformadas ⁵⁹. La sobreexpresión de esas proteínas basta para inducir senescencia ⁵⁹.

En conjunto, estas características se consideran marcadores de senescencia clásicos en células proliferativas. No obstante, no es del todo conocido si las células postmitóticas sometidas a senescencia cumplen con cada uno de estos marcadores. Lo que se ha observado es que las células de vida larga media como las neuronas pueden llegar a presentar sólo algunos marcadores y su SASP puede expresar otras moléculas que no han sido observadas en células proliferativas ⁶¹.

5. Fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP)

Las células senescentes son metabólicamente activas y constantemente se encuentran secretando una gran variedad de moléculas. A esta hipersecreción se le conoce como fenotipo secretor asociado a senescencia o SASP por sus siglas en inglés ⁵⁴. El SASP es un fenotipo heterogéneo y complejo, su composición varía acorde al tipo celular, el tipo de inductor de senescencia, así como al contexto fisiológico ⁶². Al momento, se ha logrado crear un atlas proteómico de los secretomas asociados a senescencia para el desarrollo de biomarcadores del envejecimiento. En él se encuentran perfiles producidos por diferentes tipos de inductores de senescencia como la radiación por rayos X, la sobreexpresión de RAS y el tratamiento con atazanivir; así como, el perfil de dos tipos celulares (fibroblastos y células epiteliales humanas) ⁶³. Cada uno involucra diversas moléculas que pueden o no compartir como parte del perfil asociado a senescencia ⁶³.

Dentro de las moléculas que se producen, se encuentra una mezcla compleja de factores que tienen el potencial de afectar el microambiente y alterar el comportamiento de las

células que rodean a células senescentes ⁵⁴. Entre ellos, se encuentran interleucinas reguladoras, citocinas pro-inflamatorias, factores de crecimiento, proteasas, lípidos bioactivos, componentes de la matriz extracelular y metaloproteinasas de matriz (MMP), proteínas de membrana como la fibronectina, colágena y laminina ⁶⁴. Ejemplo de éstas son la IL-1 α , la IL-6, la IL-8, el TNF, el VEGF, quimiocinas como CXCL1 y 2, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), entre otros ⁶⁴. Cada uno ejerce funciones que permiten el reforzamiento del arresto en el crecimiento celular (como la IL-6, la IL-8 y el inhibidor del activador de plasminógeno 1, PAI-1); otros permiten la comunicación paracrina sometiendo a senescencia a las células circundantes, como el TGF- β , la IL-1 α y el VEGF, así como las quimiocinas CCL2 y CCL20 ^{59,65}.

Es importante mencionar que la mayoría de las cascadas involucradas en la inducción y regulación dinámica del SASP convergen en la activación de dos factores de transcripción, NF- κ B y CEBP β , los cuales controlan de manera cooperativa la transcripción de reguladores clave de las proteínas inflamatorias del SASP, ya mencionadas ⁵⁹.

Otra característica importante del SASP es su desarrollo dinámico a lo largo del tiempo ⁶⁴. En cultivo, hay datos donde las células desarrollan un SASP completo aproximadamente cinco días después de la inducción de la senescencia y el arresto del crecimiento celular se puede observar con 24 h de daño ⁶⁴. La senescencia celular es claramente un fenómeno tardío y no necesariamente está asociado con respuestas tempranas. Por ejemplo, el fenotipo asociado a estrés agudo (ASAP) se caracteriza por la expresión de IL-6 y Timps-1 y representa una fase temprana de respuesta celular observada inmediatamente después de la exposición a agentes citotóxicos; sin embargo, en la mayoría de las células, el SASP se desarrolla gradualmente en un transcurso de cinco a diez días después de que se aplican estímulos estresantes y se detectan los primeros marcadores de senescencia ⁵⁹.

La instauración del SASP se considera un factor que predispone el desarrollo de enfermedades asociadas a la edad como las enfermedades cardiovasculares (p.ej. aterosclerosis), enfermedades neurodegenerativas (como la enfermedad de Alzheimer, enfermedades autoinmunes (como artritis reumatoide), así como diferentes tipos de

cáncer. Por otro lado, según su duración, el SASP puede tener efectos pleiotrópicos, es decir, puede ejercer efectos positivos y negativos sobre la fisiología de un tejido o célula ⁶⁶. Por ejemplo, se ha sugerido que este fenotipo pudo haberse originado con el propósito de ayudar a las células senescentes dañadas a comunicarse con las células vecinas e iniciar procesos de reparación y regeneración de tejidos, al estimular células progenitoras cercanas o células del sistema inmunitario para promover su eliminación ⁵⁹. Esta hipótesis tiene sustento en la presencia de diferentes metaloproteinasas y factores de crecimiento como VEGF y PDGF-A en el SASP, lo que indica la existencia y participación de células senescentes en la reparación de tejidos y en la cicatrización de heridas ⁶⁷.

Aún no se conocen exactamente los mecanismos reguladores de los efectos benéficos o deletéreos del SASP, sin embargo, se ha observado que un periodo corto de manifestación del SASP suele promover acciones positivas, mientras que una perpetuación de éste produce efectos negativos que conducen al desarrollo tumoral y metástasis ⁵³.

Finalmente, en la senescencia celular existen cambios dinámicos en la modificación de las histonas y en la metilación del DNA. Esos cambios epigenéticos se encuentran en estudio y no existe información detallada en células del sistema inmune ⁶⁴.

6. Antecedentes

6.1 El LPS como inductor de senescencia

El efecto de la exposición aguda y repetida al LPS en diversos linajes celulares del sistema inmune innato como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, entre otros, ha sido ampliamente investigado. Principalmente, los estudios se han centrado en la aparición del estado conocido como “tolerancia a la endotoxina” ⁶⁸. Este fenómeno biológico se caracteriza por la desensibilización de los sistemas de señalización activados por el LPS, lo que se traduce en una respuesta reducida de las células inmunes después de estar expuestas a dosis bajas de endotoxina. Esto conduce a que las células adquieran un estado transitorio de anergia, lo que les impide responder eficazmente ante futuras exposiciones a ese ligando ^{68,69}. En nuestro laboratorio se han desarrollado estudios en células cebadas donde es posible observar el fenómeno de tolerancia después de la estimulación repetida con concentraciones de LPS consideradas altas

para estas células (500 ng/ml) durante intervalos de tiempo cortos (hasta 4 horas). Esto se ve reflejado en la disminución de la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α en respuesta a una estimulación posterior ⁷⁰. Sin embargo, se desconoce el efecto que pudiera tener el LPS a concentraciones menores y de manera prolongada en este tipo celular.

Recientemente, el LPS ha comenzado a utilizarse como un inductor de senescencia celular en diferentes modelos *in vitro* que estudian el efecto del envejecimiento en distintos tipos celulares, incluyendo células epiteliales alveolares, células troncales de la pulpa dental, osteocitos, microglía y macrófagos. No obstante, la caracterización del LPS como un factor inductor de inmunosenescencia no se ha realizado en todas las estirpes celulares del sistema inmunitario y se desconoce si la exposición a ese PAMP puede inducir el SASP en otras células inmunes o si tiene componentes particulares dependiendo del tipo celular ⁷¹⁻⁷⁶. En la Tabla 1 se resumen los principales estudios sobre los efectos del LPS en la inducción de senescencia en distintos tipos celulares.

Línea celular	Cantidad de LPS	Tiempo de exposición al LPS	Marcadores de senescencia celular expresados	Autor y año de la publicación
Células BV2 (células microgliales)	10 ng/ml	1-6 días: <ul style="list-style-type: none"> • 1 ocasión • 3 ocasiones, una cada 48 horas durante 4 horas cada una • 6 ocasiones, una vez cada 24 horas durante 4 horas cada una. 	<i>IN VITRO</i> . La estimulación repetida en 3 y 6 ocasiones mostró los mejores resultados: <ul style="list-style-type: none"> • Formación de focos de ADN • Tinción de β-galactosidasa positiva • \downarrow Proliferación • Arresto del ciclo celular en fase G0/G1 	Yu, H. et al (2012)
Células epiteliales	0, 1, 5, 10, 15 y 20 μ g/ml	Única exposición durante 24 horas	<i>IN VITRO</i> . <ul style="list-style-type: none"> • Aumento del tamaño celular, 	Chang, O. et al. (2012)

<p>alveolares (A549)</p>			<p>morfología aplanada y atrófica con 10-20 µg/ml de LPS al quinto día post exposición</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↓ de la viabilidad celular con 15 µg/ml de LPS y con 20 µg/ml se observó un efecto apoptótico mediado por caspasa-3 y -7 • Aumento en la masa lisosomal y actividad de la β-gal con 15 µg/ml de LPS • Aumento en la concentración de H₂O₂ 	
<p>Células troncales de la pulpa dental</p>	<p>10 ng/ml</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 1 exposición durante 6 horas • 3 exposiciones, una cada 48 horas durante 6 horas • 6 exposiciones, una cada 24 horas durante 6 horas 	<p><i>IN VITRO</i>. Las exposiciones en 3 y 6 ocasiones obtuvieron mejores resultados:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Morfología aplanada y aumento en el tamaño, con disminución en la proliferación celular • Distribución de la F-actina desordenada y ensamblada 	<p>Feng, X., Li, L., & Zhifeng, Gu. (2014)</p>

			<p>alrededor de la región nuclear</p> <ul style="list-style-type: none"> • Arresto del ciclo celular en fase G1 • ↑ expresión de SA-β-Gal • ↑ en la expresión de la proteína γ-H2A.X como marcador de focos de daño en el ADN • ↑ en la expresión del nivel de ARN mensajero de p16^{INK4A} 	
Macrófagos (THP-1)	1 µg/ml	Única exposición durante 24 horas	<p><i>IN VITRO.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑ número de células positivas para β-Gal • ↑ en la expresión de p53, p21 y p16 • ↑ en la expresión relativa de ARNm de genes que conforman el SASP: IL-6, IL-8, IL-1b, TNF-α, CXCL1, CXCL6, MMP3, VEGFC, INHBA y AREG • ↑ en la expresión relativa de ARNm del factor de transcripción NFκB 	Wang, H. et al. (2020)
Osteocitos	10 ng/ml	6 exposiciones durante 24 horas	<p><i>IN VITRO.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑ en la expresión de p16^{INK4A} con 	Aquino-Martínez, R. et al. (2020)

			<p>una tendencia al aumento de p21</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑ en la expresión relativa de ARNm de 12 factores reconocidos del SASP: Icam1, Igfbp4, Il6, Il17, Mmp13 and Tnfa • ↑ en la expresión de γH2AX como marcador de focos de daño al ADN • ↑ de la actividad de la SA-β-gal • Redistribución de la F-actina <ul style="list-style-type: none"> • Morfología aplanada y agrandada <p>IN VIVO.</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑ en la expresión de p53, p21 y p16 • ↑ en la expresión relativa de ARNm de Il-1α, Il-6 and Tnfa 	
--	--	--	---	--

Tabla 1. Inducción de senescencia celular a través de la exposición al LPS en concentración, tiempo y tipos celulares diversos.

La concentración, el tiempo de estimulación y, sobre todo, el tipo celular que utilizan los autores es variable, por lo que algunos resultados muestran diferencias significativas. Sin embargo, la evidencia ha mostrado que todos o al menos la mayoría de los tipos celulares tras la exposición prolongada a la endotoxina, promueve la senescencia prematura inducida por estrés; no obstante, existe escasa evidencia sobre la inducción

de este fenómeno en células del sistema inmunitario innato como en las células cebadas⁷¹⁻⁷⁶.

6.2 Las células cebadas y el envejecimiento

El estudio de la inmunosenescencia abarca diferentes componentes celulares, tanto de la inmunidad innata, como de la inmunidad adaptativa. Sin embargo, no se han logrado definir específicamente los cambios o características de la senescencia inmunológica debido a que cada tipo celular comprende diversos fenotipos y cada tipo celular tiene distintas funciones. Asimismo, los estudios son limitados con respecto a los cambios asociados a la edad en algunas células inmunitarias, como las células cebadas^{77,78}.

De los pocos estudios donde se analiza la relación entre senescencia y las células cebadas destacan algunos realizados en el área del fotoenvejecimiento de la piel. De manera interesante, se ha observado que, histológicamente, la piel envejecida por efecto de la exposición a radiaciones solares es idéntica a la piel inflamada de forma crónica sin ningún estímulo externo, es decir la piel envejecida de forma intrínseca^{79,80}. Esta inflamación ha sido asociada al aumento en la población de CCs durante el envejecimiento. Un estudio realizado en ratones hembra sin pelo (SKH1) de 6-8 semanas de edad que fueron expuestos a luz UV durante un periodo crónico (2, 4, 6, 8, 10 min en tres ocasiones durante 10 semanas), demostró un incremento en el número de CCs localizadas en la epidermis y dermis dependiente de la exposición a luz UV, así como, un aumento en la cantidad del SCF, fundamental para la expansión, diferenciación y supervivencia de las CCs^{79,81}. Otro estudio, realizado por Pilkington y colaboradores en el 2018 en células cebadas humanas, provenientes de biopsias de piel de la región glútea de adultos mayores de 75 años, reportó que la distribución e interacción de las CCs con otros linajes celulares, comparada con las CCs de personas jóvenes (≤ 30 años) era distinta. En la piel de los adultos mayores, se encontró un aumento en el número de CCs con respecto a la piel de personas jóvenes y, además, se les encontró en contacto estrecho con macrófagos y fibras nerviosas que expresaban el péptido intestinal vasoactivo (VIP⁺), sugiriendo que la distribución alterada en piel envejecida pudiera tener un impacto sobre otras células del sistema inmune y estructuras de la dermis papilar con consecuencias importantes para la función tisular normal, como un proceso inflamatorio

desregulado en el contexto de infecciones bacterianas y virales, así como en los procesos de cicatrización. También observaron que en CCs de personas jóvenes, la tasa de desgranulación era más alta comparada con las CCs de adultos mayores, incluso, se encontraban en menor asociación con la vasculatura, donde normalmente se localizan, lo que sugiere, según los autores, que durante el envejecimiento de la piel, las CCs son menos activas y que su desgranulación pudiera encontrarse disminuida debido a la asociación que se observa con fibras nerviosas VIP⁺, ya que este péptido activa a las CCs con respecto a la producción de citocinas, pero suprime su desgranulación ⁸².

Las CCs, también se han asociado a procesos fibróticos e inflamación crónica, Elbasiony y colaboradores, evaluaron la contribución de estas células en la distrofia de la glándula lacrimal utilizando glándulas lacrimales de ratones jóvenes y envejecidos de la cepa C57BL/6J, observando un mayor número de CCs en las glándulas lacrimales de ratones envejecidos secundario a un aumento en la proliferación de éstas. Asimismo, se encontraban CCs activadas en mayor proporción y de forma persistente. Las glándulas de ratones envejecidos presentaban una inflamación exacerbada con niveles elevados de IL1- β , focos de células inmunitarias, tejido fibrótico y atrofia acinar ⁸³.

Recientemente se ha demostrado la participación de las CCs en el fenómeno de migración transendotelial inversa (rTEM) de neutrófilos en tejidos envejecidos inflamados mediante la producción excesiva de la quimiocina CXCL1 ⁸⁴. Una de las posibles respuestas de la participación de las CCs como fuente principal de CXCL1, es el fenómeno de senescencia y la adquisición del SASP, ya que los autores de este estudio observaron varios marcadores de la senescencia presentes en las CCs. Por ejemplo, éstas se mostraban morfológicamente más grandes, con un volumen nuclear mayor y una granularidad aumentada, así como una actividad de la enzima β -galactosidasa incrementada y una reducción en la apoptosis, lo que pareció contribuir al aumento del número de CCs ⁸⁴. Sin embargo, los autores refieren que las propiedades y causas de la senescencia en CCs requieren de un profundo estudio y afirman que un ambiente caracterizado por niveles altos de estrés oxidativo en los tejidos envejecidos es un inductor clave de senescencia ⁸⁴.

6.3 Antecedentes directos

En nuestro laboratorio se han llevado a cabo algunos experimentos para estudiar la senescencia replicativa en cultivos de células cebadas derivadas de la médula ósea de ratones (BMMCs) de la cepa C57BL/6J (de 6-8 semanas de edad). A partir de estos animales jóvenes, se obtuvo médula ósea que fue cultivada por métodos estandarizados en el protocolo de Meurer, 2016, para obtener una población de BMMCs de tipo mucosal con 5-6 semanas de edad en cultivo. Esos cultivos expresan al receptor FcεRI y secretan diversos mediadores después de su estimulación, por lo que se consideran maduros y jóvenes⁸⁵. Para estudiar la senescencia replicativa, esos cultivos se dejaron crecer por 10 o más semanas y las células fueron procesadas para evaluar la expresión de marcadores de senescencia (Ibarra-Sánchez, resultados no publicados).

De manera particular, se evaluó la expresión de las proteínas p21 y p16 en BMMCs de 5 hasta 13 semanas de edad en cultivo por medio de Western blot. En esos cultivos se observó una expresión basal de ambas proteínas en células consideradas jóvenes (5-9 semanas en cultivo). A partir de la décima semana, las BMMCs en cultivo fueron consideradas senescentes, ya que aumentaron la expresión de ambos reguladores negativos del ciclo celular (Figura 9).

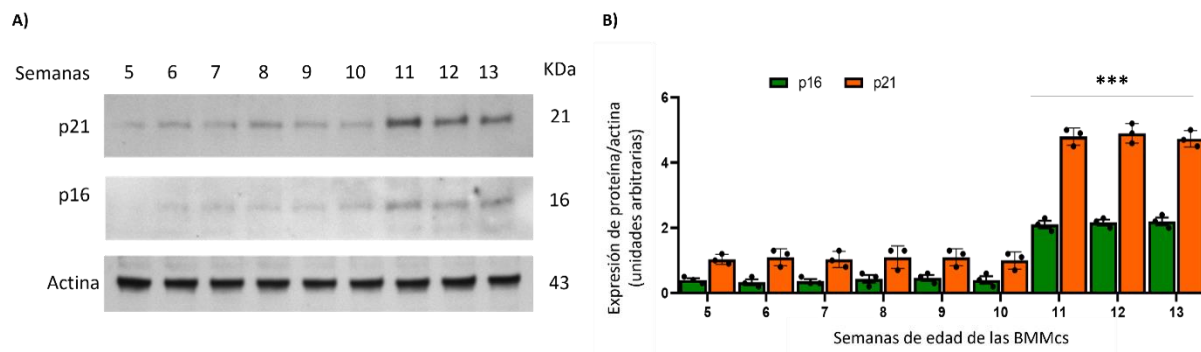


Figura 9. Expresión de p21 y p16 en BMMCs de distintas edades en cultivo. Panel A. Se muestran imágenes representativas de los inmuno-blots detectando p21 y p16 en células de 5 a 13 semanas de edad en cultivo. La expresión de β -actina se determinó como control. El panel B, muestra el análisis densitométrico de la expresión de p21 y p16 durante las semanas en las que permanecieron en cultivo las BMMCs. Los datos mostrados corresponden a la media \pm EE de al menos tres experimentos. ANOVA de dos vías seguida de la prueba post hoc de Tukey. *** $p < 0.001$ (semana 5-10 vs. semana 11, 12 y 13).

Asimismo, se llevó a cabo un análisis de la expresión del RNA mensajero de citocinas que conforman parte del SASP en BMMCs jóvenes *versus* BMMCs senescentes, observando un incremento de los RNAm de IL-6, VEGF, IL-1 α / β en BMMCs con más de 10 semanas en cultivo, en comparación con las células de cultivos jóvenes (Figura 10).

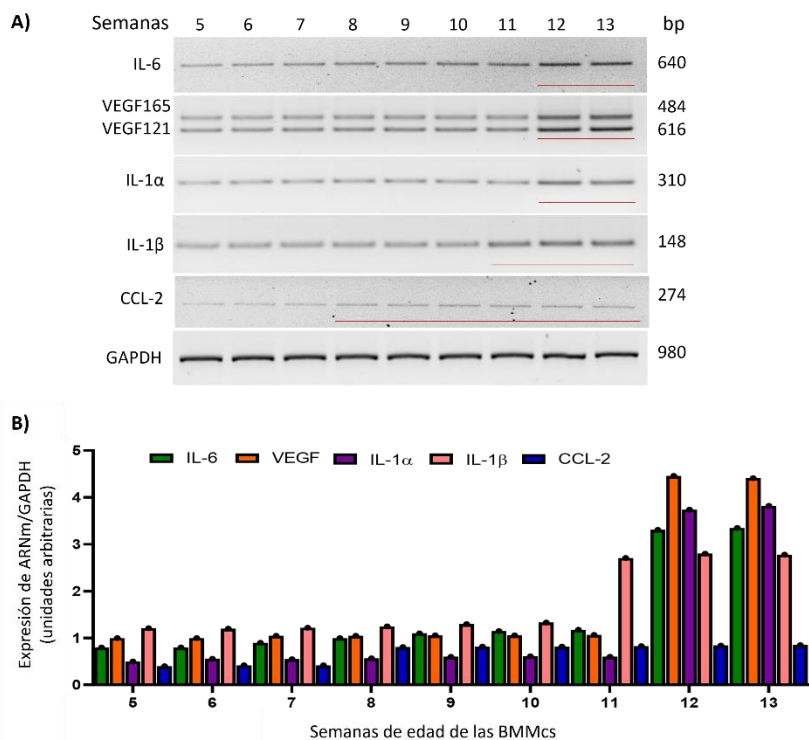


Figura 10. La expresión de RNAm de citocinas en BMMCs jóvenes y senescentes. Panel A. Imágenes representativas de los geles de agarosa detectando el ARN mensajero de moléculas que conforman parte del SASP en BMMCs de 5 a 13 semanas de edad en cultivo por medio de RT-PCR de punto final. Los niveles de RNA mensajero de GAPDH se determinaron como control. El panel B, muestra el análisis de la expresión de RNA mensajero de las diferentes moléculas analizadas durante las semanas en las que permanecieron en cultivo las BMMCs. Los datos mostrados corresponden a un experimento.

Otro experimento llevado a cabo en el laboratorio fue el análisis del ciclo celular de BMMCs derivadas de ratones jóvenes (de 8-12 semanas de edad) y de ratones envejecidos (60 semanas de edad) de la cepa C57BL/6J. Se siguió el mismo protocolo referido en los experimentos previos para diferenciar a las BMMCs. Los cultivos provenientes de ratones jóvenes se dejaron crecer durante 6, 8, 16, 18, 28 y 36 semanas; mientras que las BMMCs procedentes de ratones envejecidos se dejaron crecer durante 16 y 18 semanas. Una vez obtenidas las células diferenciadas, se realizó un análisis del

ciclo celular por medio de citometría de flujo. Como puede verse en la Figura 11, una proporción muy grande de las células de cultivos de 5 semanas provenientes de animales jóvenes se encontraron en la fase G₀ del ciclo celular, como corresponde a células diferenciadas post-mitóticas. Conforme avanzó el tiempo en el cultivo, la proporción de células en G₀ tendió a disminuir (ver zona gris de las barras en la gráfica de la Figura 11). De manera interesante, conforme disminuyó la proporción de BMMCs en G₀, aumentó la cantidad de células en la fase G₁ del ciclo celular, como corresponde a células senescentes (ver zona verde de las barras en la gráfica de la Figura 11). Con respecto a las BMMCs provenientes de animales envejecidos, se encontró que una gran proporción de las células se encontraban en la fase G₀, pero la cantidad de células en G₁ era mucho mayor a la detectada en cultivos de animales jóvenes.

Las células derivadas de ratones jóvenes en su semana 36 en cultivo alcanzaron un porcentaje similar de células en G₁ al de las BMMCs derivadas de ratones envejecidos.

Con respecto a la fase de síntesis (S) y G₂/M, no se observó un cambio importante que sugiriera que las BMMCs se encontraban en un proceso de división celular, lo que sugiere, aunque las células dejaban la fase G₀ para entrar a la G₁, que el ciclo celular no procedía a la fase de S, G₂ o M.

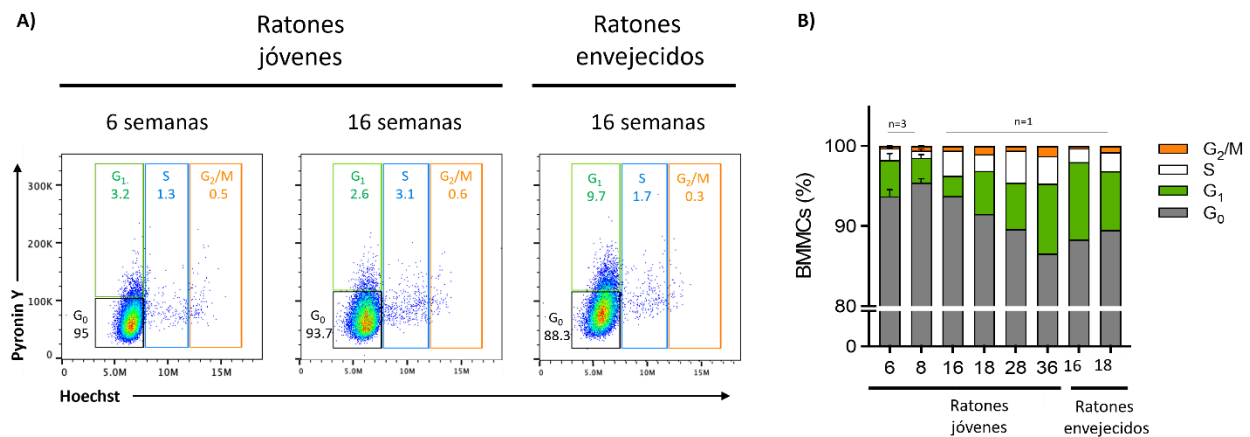


Figura 11. Distribución de las fases del ciclo celular en BMMCs procedentes de ratones jóvenes vs. ratones envejecidos. Panel A, muestra imágenes representativas del análisis de las distintas fases del ciclo celular en las que las BMMCs derivadas de ratones jóvenes y ratones envejecidos se encontraron

tras un periodo prolongado en cultivo. De izquierda a derecha se observan dos recuadros que abarcan las BMMCs derivadas de ratones jóvenes cultivadas *in vitro* durante 6 y 16 semanas; del lado derecho, se muestra el recuadro de las células procedentes de ratones envejecidos cultivadas durante 16 semanas. El panel B muestra la representación gráfica en porcentaje de las fases del ciclo celular en las que se encontraron las BMMCs de ratones jóvenes y ratones envejecidos cultivadas durante diferentes periodos de tiempo. Los datos mostrados en la sexta y octava semana corresponden a al menos tres experimentos; mientras que el resto de los datos corresponden a un experimento.

Los resultados del análisis del ciclo celular mostraron que los cultivos de BMMCs generados *in vitro* presentan las mismas características que las CCs *in vivo*, ya que se sabe que esas células son de vida media larga y no se ha encontrado evidencia sólida de su división en los tejidos ⁸⁶. Asimismo, el análisis mostró que, cuando ocurre la senescencia replicativa (ya sea *in vitro* o *in vivo*), una fracción de las CCs pasa de la fase G0 a la fase G1 y no procede a las siguientes fases del ciclo celular, tal y como corresponde a las células senescentes.

7. JUSTIFICACIÓN

La senescencia celular es un proceso que ocurre en todos los linajes celulares de manera fisiológica, sin embargo, no en todas las células ha sido documentado. Por esta razón, el proyecto en curso pretende explorar, por primera vez, si la exposición crónica a un PAMP (el LPS bacteriano) induce senescencia en las células cebadas. Esta información generará conocimiento nuevo sobre los mecanismos de inducción de senescencia en ese tipo celular.

8. HIPÓTESIS

La exposición crónica al LPS inducirá la expresión de marcadores celulares asociados a senescencia en células cebadas.

9. OBJETIVOS

9.1 Objetivo general

Averiguar si la estimulación prolongada con LPS induce la expresión de marcadores de senescencia en células cebadas.

9.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto de la exposición prolongada al LPS sobre:

- a) La expresión de la proteína p21 y su distribución subcelular
- b) La actividad de la enzima β -galactosidasa
- c) La secreción de IL-6 y TNF, que forman parte del fenotipo secretor senescente
- d) El arresto del ciclo celular en G1 característico de las células senescentes en células cebadas murinas derivadas de la médula ósea (BMMCs).

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Animales y generación de células cebadas (BMMCs)

Para la obtención de las BMMCs se utilizaron ratones de la cepa C57BL6/J (Stock No. 000664 del Laboratorio Jackson, Maine, U.S.A) de 6 a 8 semanas de edad con un peso de 25 a 35 gramos. Se mantuvieron de 4 a 6 ratones por caja, bajo condiciones de temperatura controlada (22-24°C), con acceso libre a alimento y agua, bajo condiciones de humedad entre el 45 y 60%, y ciclos de luz/oscuridad (12h/12h). Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el comité Institucional del Cinvestav para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, protocolo 0137-15) bajo las reglas de la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Para realizar los cultivos, los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO₂, se disecaron ambas tibias de las que se extrajo la médula ósea acorde al protocolo reportado en Meurer, 2016. El canal medular se lavó por ambos extremos con 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (SIGMA, cat. R4130-1L), suplementado con 20 ng/ml de IL-3 (Preprotech, cat 213-13), 1X de aminoácidos no esenciales (NEAA 100x; Biofluids #332-100), 50 μ M de β -mercaptoetanol (SIGMA #M6250), 25 nM del buffer HEPES (stock 1 M, pH 7.7; SIGMA #H7006), 10% de Suero Fetal Bovino (FBS, GIBCO BRL cat. 261400779), 1mM de piruvato de sodio (stock 100 mM, Biofluids #33-100), 1U/ de penicilina-0.1 mg/ml de estreptomicina (Gibco #1378-016) y 1x de antimicótico (stock 100X Gibco #15240062).

El medio con la médula ósea fue recolectado en un tubo Falcon de 50 ml y se centrifugó a 1200 rpm a 4°C. El sobrenadante fue removido y el pellet celular se resuspendió en 30 ml del mismo medio, que fue colocado en cajas de cultivo Sarsted T-75 y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ durante 4-6 semanas, con cambio de medio cada

7-8 días. La maduración de los cultivos se comprobó por citometría de flujo (Meurer, 2016).

10.2 Ensayo de desgranulación

Con la finalidad de evaluar la funcionalidad de las BMMCs y su capacidad de producir mediadores inflamatorios, se determinó la secreción de la enzima β -hexosaminidasa después de la estimulación del receptor Fc ϵ RI (Manetz, 2001) con diferentes concentraciones de DNP-HSA (dinitrofenol acoplado a albúmina sérica humana, HSA).

Para cada ensayo se utilizó un millón de células, las cuales fueron sensibilizadas con 100 ng/mL de IgE monoclonal anti-dinitrofenol (DNP), clona SPE-7, por 24 h a 37°C. Posteriormente, se centrifugaron a 1200 rpm a temperatura ambiente por 5 min, se retiró el medio por decantación, el pellet celular se re-suspendió en 7 ml de buffer Tyrodes-BSA (20mM HEPES pH7.4, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5.6 mM glucosa, 0.05% albúmina bovina). A continuación, se procedió a colocar 1 ml de la suspensión en microtubos que contenían distintas diluciones de DNP-HSA (para obtener concentraciones finales de 0, 1, 3, 9, 27, 81 y 243 ng/ml), se incubaron por 30 min a 37°C y se centrifugaron a 10 000 rpm a 4°C por 5 min). La actividad de la β -hexosaminidasa se midió colocando en una placa de 9 pozos 60 μ l del sobrenadante y 40 μ l de p-nitrofenil-N-acetil- β -d-glucosamina 1 mM (PNAG, de SIGMA). La placa se incubó a 37°C por 1 h. Al término de la incubación, se añadieron 120 μ l de solución *Stop* (1.05 g carbonato de sodio, 0.84 g bicarbonato de sodio y 100 ml H₂O mQ) para detener la reacción.

La liberación de β -hexosaminidasa fue cuantificada en un espectrofotómetro (Tecan Sunrise) a una longitud de onda de 405 nm y el porcentaje de liberación se calculó utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Desgranulación} = (\text{D.O. de la muestra} \times 100) / (\text{D.O. de la muestra control})$$

10.3 Western Blot

Para evaluar la expresión de p21, regulador negativo del ciclo celular, las BMMCs se recolectaron y se centrifugaron a 2550 rpm a 4°C por 5 min. El sobrenadante se decantó y mediante vacío se retiró el restante. Se añadieron 150 μ l de buffer Laemmli preparado con ortovanadato (5mM) y β -mercaptoetanol (0.28 M), las muestras fueron incubadas en

baño María durante 15 min y agitadas en un vórtex cada 5 min. Las muestras se resguardaron a -80°C hasta su uso.

El Western Blot se realizó utilizando un gel de acrilamida-SDS al 14%. Los tubos con extracto se colocaron a baño María por 5 min, se centrifugaron y se cargaron 20 µl en cada pozo del gel. Posteriormente el gel se corrió a 100 mV por aproximadamente 2.5 h. Después, el gel fue transferido a una membrana de PVDF (Perkin Elmer, Polyscreen NEF1002001PK) mediante una cámara de transferencia semi-húmeda a 20 V por 45 min por un gel o 1 h por dos geles. Una vez terminado este paso, la membrana fue bloqueada durante 2 h con leche descremada (Svelty de Nestlé) al 4% en TBS-T. Posteriormente, la membrana se lavó por 10 min y se incubó con el anticuerpo específico para cada experimento: p21 Waf1/Cip1/CDKN1A 1:750 (Marca Santa Cruz, catálogo SC-6246) y β-actina 1:10 000 (Marca Santa Cruz, catálogo SC-81178) toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, la membrana se lavó con TBS-T (60 g Trizma base, 90g cloruro de sodio, 1000ml H₂O mQ, 1 ml Tween-20) por 30 min para el anticuerpo primario, p21 y β-actina. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-mouse a una dilución de 1:10,000 durante 1 h. Una vez transcurrido el tiempo, se realizaron tres lavados de 10 min de duración cada uno con TBS-T y se procedió a la detección de la proteína mediante las soluciones necesarias para la reacción de quimioluminiscencia (BM Chemiluminiscense Western Blotting Mouse/Rabbit de Roche #1152070901). Se utilizó el fotodocumentador ChemiDoc XRS+ marca Bio Rad. Las membranas fueron expuestas a placas de rayos X de KODAK y la cuantificación de las bandas se realizó mediante el análisis de densitometría utilizando los programas Image Studio (MiniBis) y las herramientas de cuantificación de intensidad de imagen de Photoshop.

10.4 Inmunofluorescencia

Para evaluar la distribución subcelular de una de las proteínas involucradas en la detención del ciclo celular, p21, las células se centrifugaron a 1200 rpm y se lavaron en una ocasión con PBS1x, posteriormente, se colocaron en un portaobjetos de cristal electrocargado previamente dividido por cuadrantes con plumón hidrofóbico por 20 min y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 minutos más. Los cuadrantes se lavaron en tres ocasiones con PBS1x. Posteriormente se agregó solución de bloqueo

(PBS1x 919 IL- μ l, BSA al 4% 30 μ l, suero de burro 50 μ l y Tween-20 1 μ l) durante 2 h. Una vez bloqueada, la laminilla se incubó con el anticuerpo monoclonal mouse p21 Waf1/Cip1/CDKN1A (marca Santa Cruz, catálogo SC-6246) a una dilución de 1:100 durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó el portaobjetos en 10 ocasiones con PBS-T y se incubó con anticuerpo secundario que contenía el fluoróforo Alexa 488 junto con 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), ambos a una dilución de 1:500 durante 2 h. Posteriormente se volvieron a realizar lavados con PBS-T en 10 ocasiones. Finalmente se añadieron 10 μ l de DABCO para sellar la preparación y las células se analizaron mediante microscopía confocal utilizando el microscopio DMI 8 Confocal Stellaris 5, de la marca Leica Microsystems, objetivo 63x.

10.5 Ensayo de β -galactosidasa

Con la finalidad de evaluar la actividad de la enzima β -galactosidasa, las BMBCs se centrifugaron a 1200 rpm, se decantó el sobrenadante y se lavaron en una ocasión con 100 μ l de PBS1x. Después se colocaron en un portaobjetos electrocargado previamente dividido en cuadrantes con un marcador hidrofóbico o en microtubos, dependiendo el destino final de las células (microscopía electrónica o espectrofotometría, respectivamente). En el primer caso, el portaobjetos se colocó en cámara húmeda y se añadieron 50 μ l de las células suspendidas en PBS1x y se dejaron sedimentar durante 20 min, posteriormente se añadió PFA al 4% para fijar las células durante 20 min más. Se hicieron 3 lavados con PBS1x para retirar el exceso de PFA y se añadieron 50 μ l por cuadrante de 1x SA- β -gal (Detection Solution). En el segundo caso, las células únicamente se centrifugaron, se decantó el sobrenadante, se lavaron y se les añadió 50 μ l de 1x SA- β -gal (Detection Solution).

En ambos casos, la reacción enzimática se llevó a cabo durante 9 h dentro de una incubadora a 37°C.

Una vez cumplido el tiempo, se retiró la solución del portaobjetos mediante vacío o centrifugando a 1200 rpm y decantando la solución de los microtubos. En ambos casos las células se lavaron con PBS1x en una ocasión.

Para observar las células teñidas en azul mediante el microscopio, se añadieron 5 µl de DABCO (medio de montaje) y se colocó una laminilla encima. Las imágenes se tomaron con el objetivo 40x. Para el análisis de espectrofotometría, se añadieron 100 µl de Tritón para lisar las células y se colocaron en una placa de 96 pozos.

10.6 ELISA

Para determinar la secreción de algunas de las principales citocinas que conforman el SASP (IL-6 y TNF) se colectaron los sobrenadantes de las células previamente sometidas a su respectivo tratamiento (ver Diseño experimental) y se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento. Para la cuantificación de cada citocina se utilizó el kit de ELISA de la marca PeproTech específico para cada una de ellas (IL-6, catálogo 900-K50; TNF, catálogo 900-K54), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Primero se realizó una mezcla de Coating Buffer y la citocina correspondiente. La mezcla se agitó por vortex brevemente. Posteriormente, en una placa de 96 pozos se añadieron 100 µl de la mezcla y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron dos lavados con Wash Buffer Concentrate 25x (1 tableta de PBS P4417 en 200 ml de H₂O Milli-Q y 200 µl de Tween) y se añadieron 10 µl de AD10x. La placa se incubó durante 2 h a 37°C. Posteriormente se realizó una curva estándar con concentraciones distintas para cada determinación (10000 pg, 5000 pg, 2500 pg, 1250 pg, 625 pg, 156 pg y 0 pg) y se añadieron 200 µl de la curva estándar de manera vertical en la placa previamente lavada con Wash Buffer; asimismo, se colocaron 200 µl de los sobrenadantes y la placa se incubó por 1.5 h a 37°C. Una vez terminada la incubación, la placa se lavó nuevamente con Wash Buffer en tres ocasiones y se colocaron 100 µl del anticuerpo de detección específico para cada citocina previamente preparado con AD 3x, la placa se incubó por 1.5 h. Posteriormente, se decantó la placa y se realizaron 3 lavados con Wash Buffer. Se añadieron 100 µl de Avidina a cada pozo y la placa se incubó por 30 min a 37°C resguardado de la luz. Finalmente, se realizaron tres lavados más y se colocaron 100 µl del sustrato quimioluminiscente 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio (ABTS) a cada pozo, la placa se incubó a 37°C durante 30 min protegiendo lo de la luz. Posteriormente se procedió a la

cuantificación mediante el espectrofotómetro Tecan Sunrise y el software Magellan 7.3 a una longitud de onda de 405 nm.

10.7 Ciclo celular

Con el objetivo de evaluar los cambios en el ciclo celular ocasionados por la exposición prolongada al LPS, se realizó un análisis mediante citometría de flujo en el cual las BMMCs fueron sometidas a distintas tinciones e inmunotinciones (ver tabla 2) que permitieron su identificación a través de diversos parámetros descritos a continuación (ver figura 12): la primera condición (tubo 1) consistió en BMMCs sin colorante ni anticuerpo utilizadas para establecer el tamaño y la granularidad celular; en la segunda condición (tubo 2) las BMMCs se tiñeron con el colorante Pironina Y, el cual permite la identificación de RNA; en la tercera condición (tubo 3) las BMMCs se tiñeron con el colorante Hoechst, el cual permite la identificación del DNA; la cuarta condición (tubo 4) utilizó una inmunotinción que marca las membranas celulares íntegras, el Ghost red 780, para delimitar las células viables; y la quinta condición (tubo 5) consistió en la identificación del receptor FcεRI a través de la inmunotinción APC647, con el objetivo de conocer el grado de maduración de las BMMCs.

Para el resto de las condiciones (tubo 6, 7 y 8), en las que se evaluó el tratamiento con vehículo y ambas concentraciones de LPS (50 y 100 ng/ml), se realizó un multimarcaje con todos los colorantes y anticuerpos descritos anteriormente.

Todas las tinciones e inmunotinciones se realizaron a temperatura ambiente. Su lectura se realizó en el NovoCyte Quanteon Flow Cytometer Systems 4 Lasers, marca Agilent.

Tinción	Parámetro que mide	Dilución/Concentración	Diluyente	Marca	Catálogo
Ghost Dye™ Red 710	Viabilidad celular	1:4000	PBS 1x	Cytek Biosciences	13-0871
APC647	Expresión del FcεRI	1:1000	PBS 1x	eBioscience	17589882
Hoechst33342	Separación de fases G0/G1 (colorante fluorescente de unión a ADN bicatenario)	10µg/10ml	RPMI	Sigma	B2261
Pironina Y	Separación de fases G0/G1 (colorante intercalante de ARN)	500 ng/ml	RPMI	Sigma	213519

Tabla 2. Reactivos utilizados para el análisis mediante citometría de flujo.

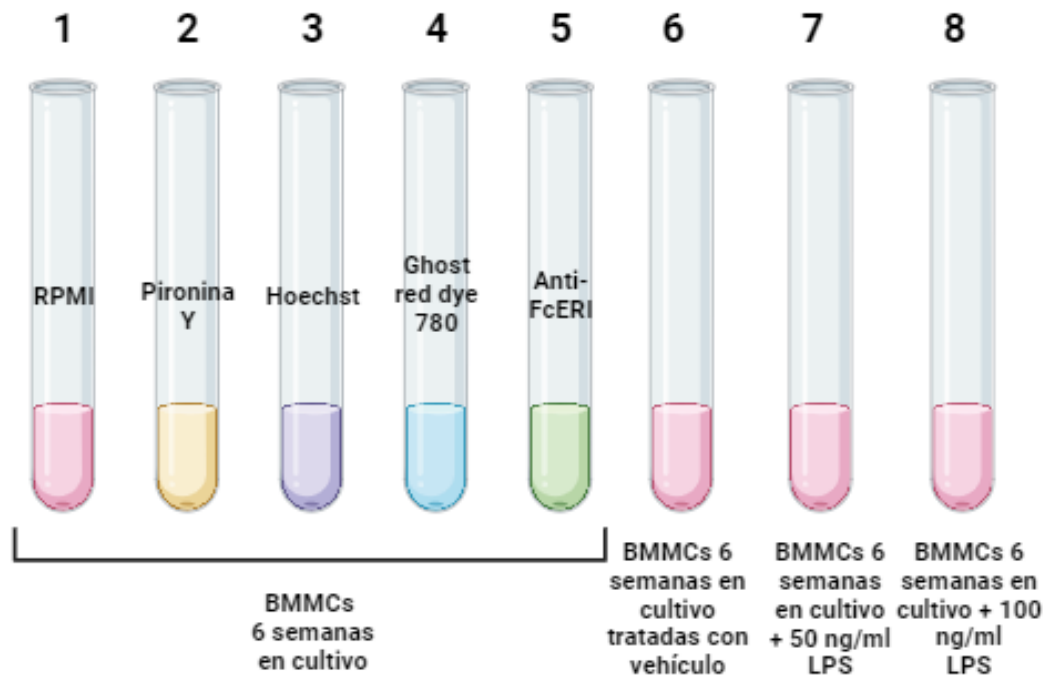


Figura 12. Tinciones y tubos utilizados para el análisis de las BMMCs mediante citometría de flujo. Detalles en el texto.

El análisis de los resultados se realizó con el programa FlowJo de la compañía Beckton Dickinson (BD) con la siguiente estrategia de selección de poblaciones (gating): los eventos fueron definidos en el gráfico Side-Scattered light (SSC) versus Forward-Scattered light (FSC) indicando el grado de granularidad vs tamaño celular de las BMMCs (Figura 13). Se excluyeron los dobletes y se consideraron únicamente las células asiladas (los singletes). Se consideraron únicamente las células vivas para el análisis de resultados. Para la separación de fases G0/G1 y la demarcación de las regiones del ciclo celular se siguió el protocolo descrito por Camelia Botnar Laboratories, asimismo por el Instituto de Ciencia Molecular y Celular Blizzard^{87,88}.

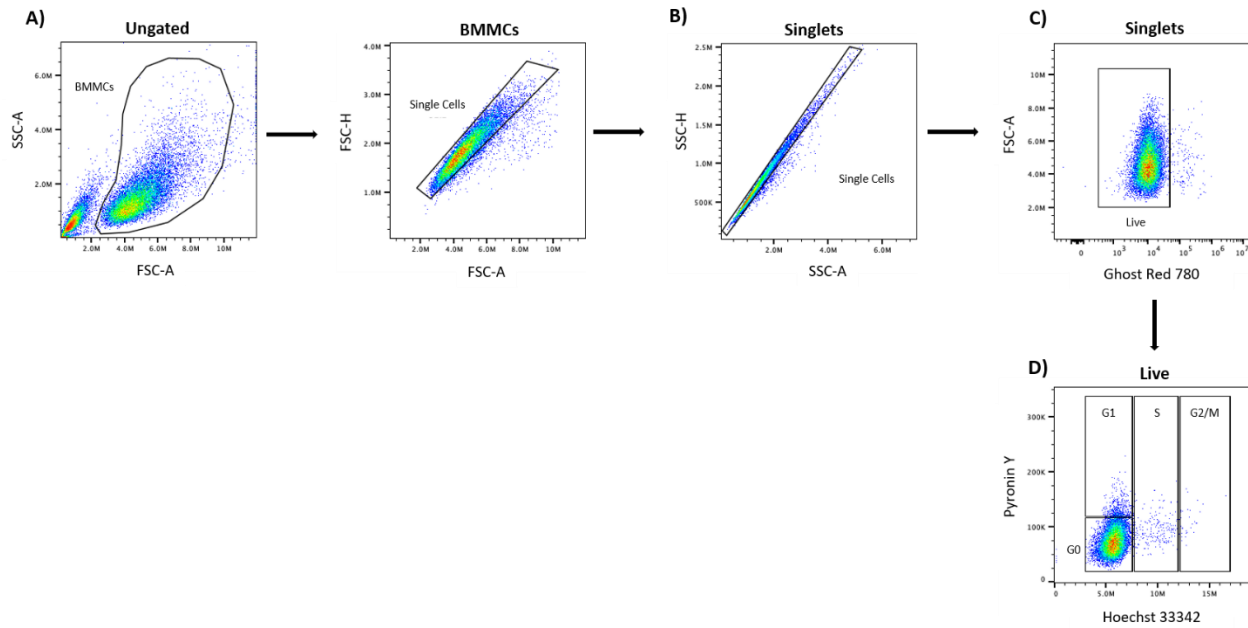


Figura 13. Estrategia de gating para la evaluación de las fases del ciclo celular. Panel A. Estrategia utilizada para definir los eventos a analizar mediante el SSC vs. FSC. Panel B. Selección de singlets. Panel C. Selección de las células viables a través de la tinción Ghost Dye Red 710. Panel D. Estrategia utilizada para demarcar las fases del ciclo celular y separar las fases G1/G0 mediante la tinción de Hoechst33342/Pironina Y.

11. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para cumplir los objetivos planteados, se siguió el diseño experimental esquematizado en la Figura 14. Se generaron BMMCs derivadas de la médula ósea de ratones C57BL6/J y se verificó que su diferenciación fuera completa por medio de la evaluación de la expresión del receptor FcεRI en la membrana plasmática y su capacidad de secretar β-hexosaminidasa en respuesta a la estimulación por medio de complejos IgE/Ag. Solamente aquellos cultivos donde más del 95% de las células expresaban al mencionado receptor y mostraban una desgranulación mayor al 50% en concentraciones óptimas de IgE/Ag fueron utilizados. Para todos los experimentos, las BMMCs fueron sensibilizadas con IgE monoclonal anti-DNP (100 ng/ml) durante 24 h a 37°C previo a su uso.

Las BMMCs se colocaron en una placa de 96 pozos y se expusieron a dos concentraciones distintas de LPS (50 o 100 ng/ml), los estímulos se realizaron en una sola ocasión sin cambio de medio hasta cumplir el tiempo indicado. Al finalizar los 7 días,

las células se recolectaron y se analizó la expresión de marcadores de senescencia, como la proteína p21 y la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia, ver figura 14.

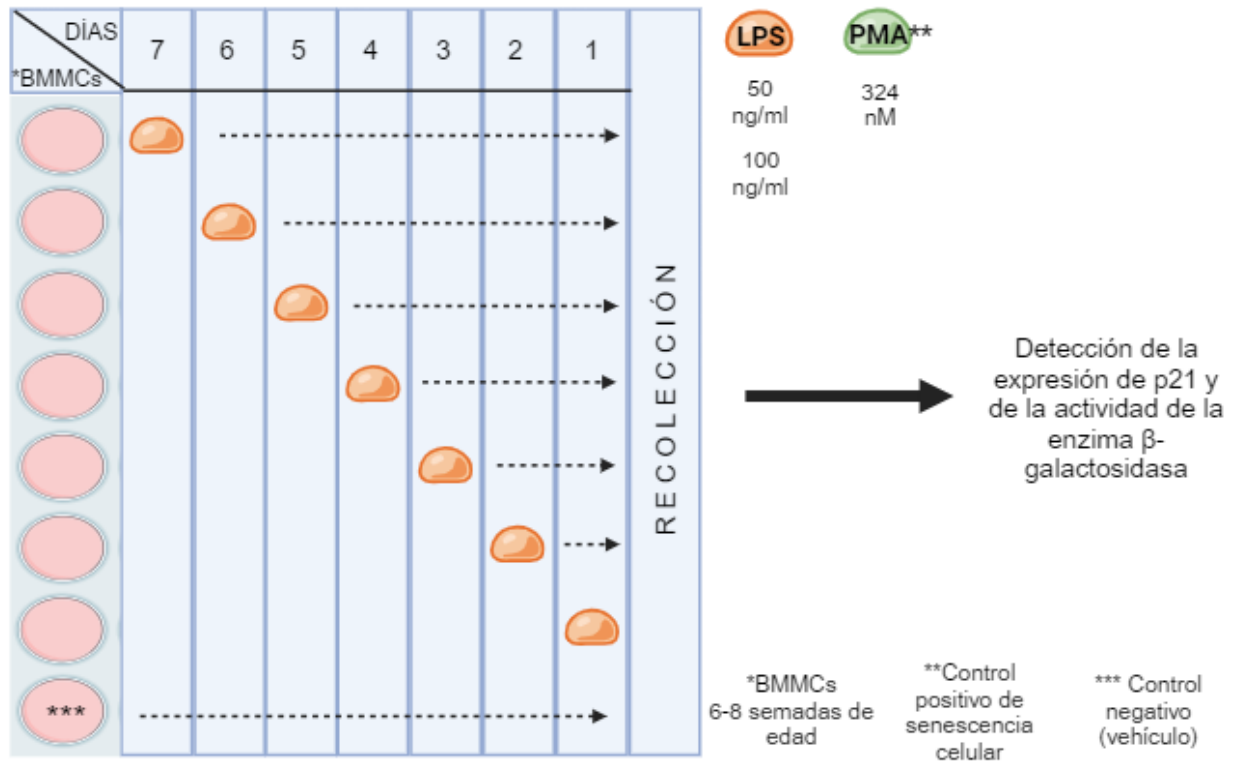


Figura 14. Diseño experimental para evaluar la expresión de p21 y la actividad de la enzima β -galactosidasa en BMMCs. El tratamiento con PMA, un inductor de senescencia en otros linajes celulares, se colocó siguiendo el diseño experimental utilizado para el tratamiento con LPS.

Para llevar a cabo la evaluación de la distribución subcelular de p21, así como para realizar el análisis de la secreción de algunas citocinas que conforman el SASP (IL-6 y TNF) y la identificación de la fase del ciclo celular en la que se encontraban las BMMCs, las células fueron expuestas a dos concentraciones de LPS (50 o 100 ng/ml) por una sola ocasión sin cambio de medio durante 3 y 5 días. Estos tiempos se decidieron con base en los resultados obtenidos de la técnica de Western Blot, la cual permitió observar la mayor expresión de p21 posterior al tratamiento con LPS. Ver sección de resultados y figura 15.

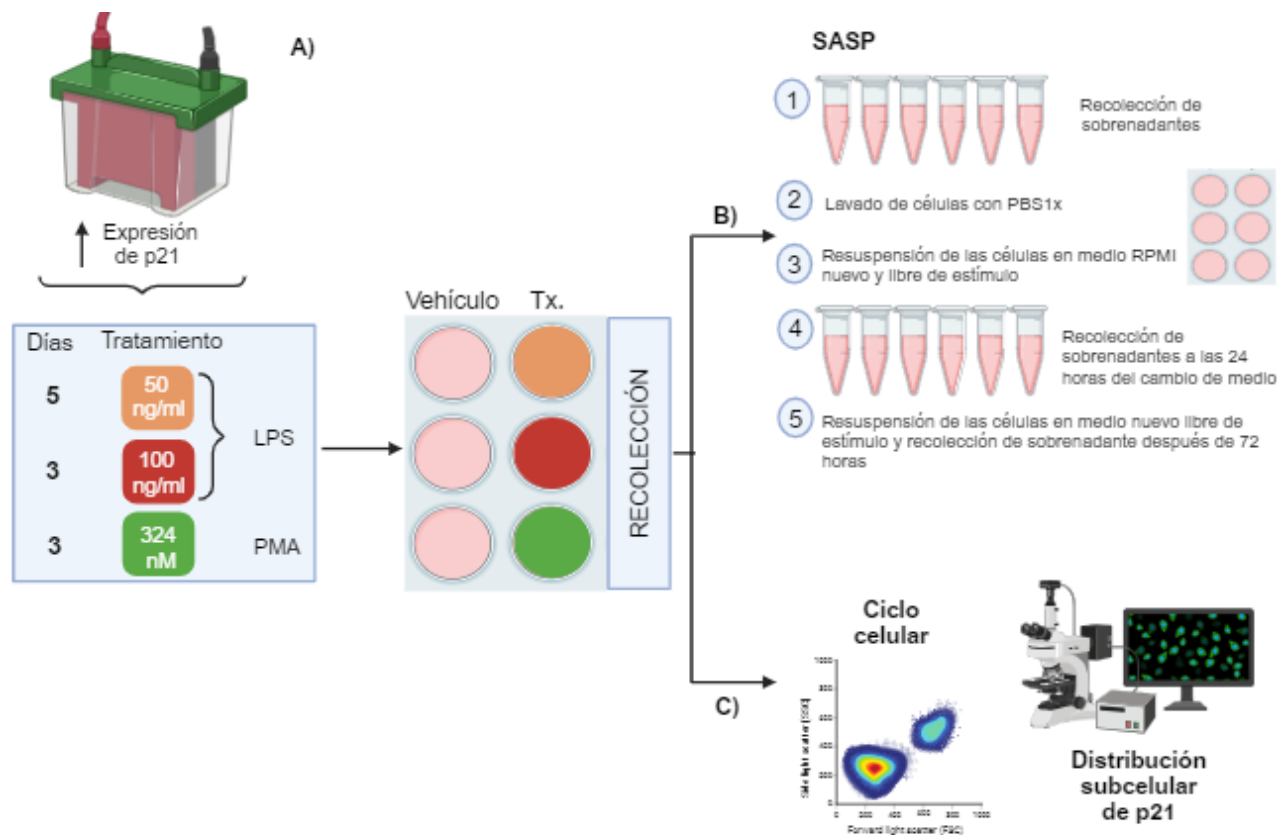


Figura 15. Diseño experimental para evaluar la inducción del SASP, la redistribución subcelular de p21 y el arresto del ciclo celular en BMMCs.

Para identificar la inducción y persistencia del SASP (tercer objetivo) se siguió el diseño experimental mostrado en la Figura 14B. Una vez cumplidos los días de exposición al LPS, el sobrenadante fue recolectado para detectar la secreción de TNF por medio de ELISA. Posteriormente, las BMMCs se lavaron con PBS1x y fueron resuspendidas en medio nuevo libre de estímulo, con el fin de evaluar si en ausencia de LPS, se conservaba la secreción de TNF. El sobrenadante se recolectó a las 24 y 72 h siguiendo el protocolo mencionado. El pellet celular restante se procesó y se almacenó a -80°C para ser utilizados en determinaciones futuras.

Como control negativo se utilizaron células tratadas solamente con el vehículo del LPS (medio RPMI) y como control positivo, se utilizaron células tratadas con 324 nM de forbol 12-miristato-13 acetato (PMA), que es un activador de la proteína cinasa (PKC) que induce senescencia en distintos tipos celulares ⁸⁹.

12. RESULTADOS

- I. La exposición prolongada de BMMCs a diferentes concentraciones de LPS induce la expresión de p21, uno de los principales marcadores de senescencia celular

Para evaluar la expresión de la proteína p21, un regulador negativo del ciclo celular conocido por ser uno de los principales marcadores de senescencia, se utilizaron BMMCs de 5 a 6 semanas en cultivo, las cuales se expusieron a 50 o 100 ng/ml de LPS en un curso temporal de 1 a 7 días. Ver diseño experimental.

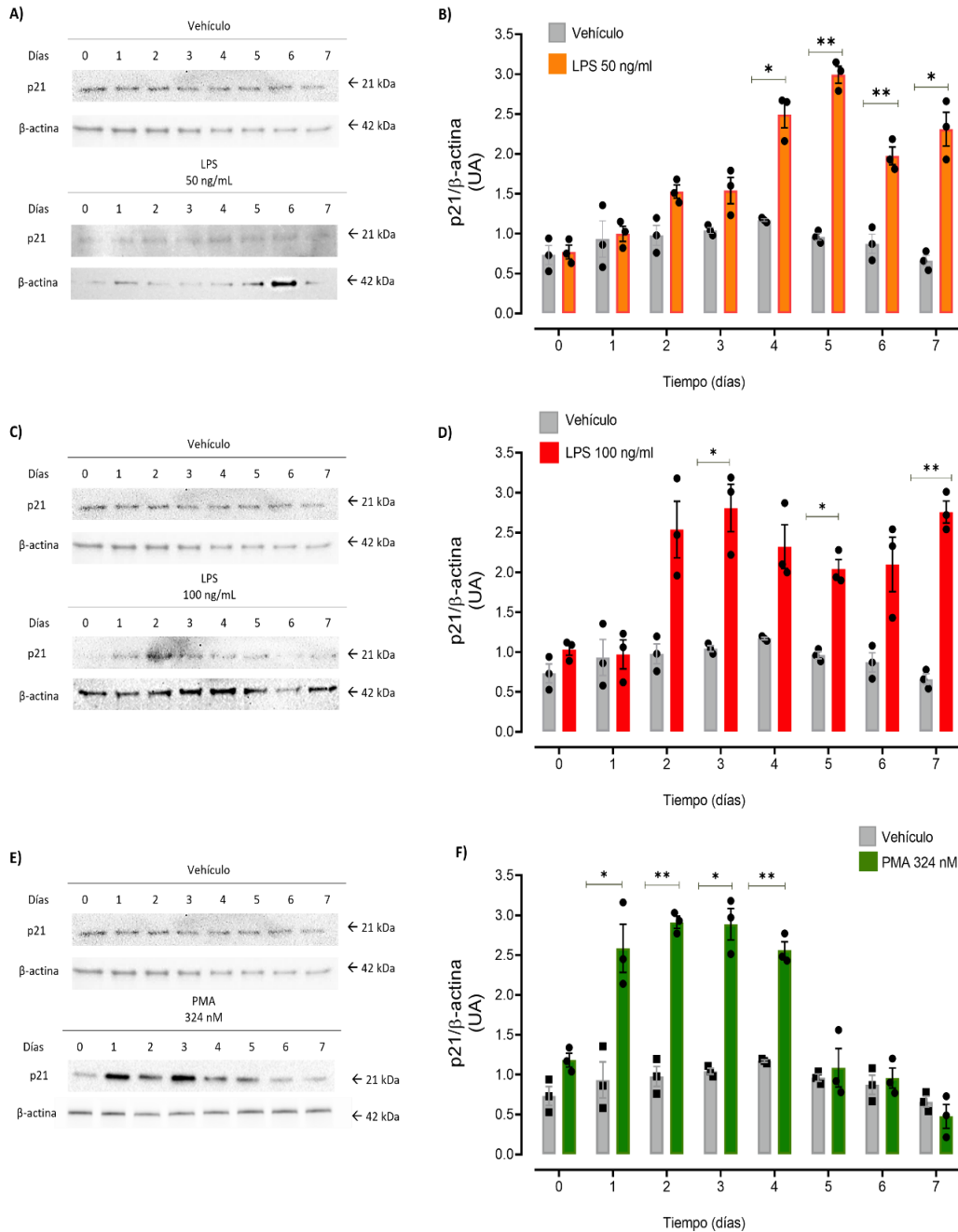


Figura 16. La exposición prolongada al LPS incrementa la expresión de p21 en BMSCs.

Los paneles A, C y E muestran imágenes representativas de los blots detectando p21 en células tratadas con vehículo o después de los tratamientos indicados (LPS 50 ng/ml, 100 ng/ml y PMA 324 nM). La expresión de β-actina se determinó como control. Los paneles B, D y F muestran el análisis densitométrico de la expresión de p21 tras la exposición de LPS o PMA. Los datos mostrados corresponden a la media ± EE de al menos tres experimentos. ANOVA de dos vías seguida de la prueba post hoc de Dunnett. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Observamos que existe una expresión basal de p21 en células control (tratadas con vehículo), sin embargo, tras el tratamiento con ambas concentraciones de LPS, la expresión de p21 aumentó de manera gradual y se sostuvo en días posteriores. Es interesante observar que la expresión de dicha proteína fue dependiente de la concentración de LPS utilizada. Con 100 ng/ml observamos un incremento desde el segundo día, obteniendo la máxima expresión de p21 al tercer día de estimulación. Estos resultados indican que la exposición prolongada al LPS induce la expresión de p21, uno de los marcadores clásicos de senescencia en células cebadas.

En una serie paralela de experimentos, se observó que el compuesto activador de la PKC (PMA) indujo un incremento en la expresión de p21 desde los primeros días, produciendo una máxima expresión al tercer día. No obstante, a partir del cuarto día, la expresión de p21 comenzó a disminuir hasta regresar a los valores basales, indicando que el PMA actúa como un inductor transitorio de este marcador de senescencia en células cebadas (ver diseño experimental).

II. La exposición prolongada de BMMCs a diferentes concentraciones de LPS induce una redistribución subcelular de p21

Se ha descrito que la proteína p21 ejerce sus funciones uniéndose a las ciclinas desde el núcleo celular, motivo por el cual se decidió evaluar su distribución celular en respuesta a los tratamientos con LPS o PMA. Para ello, se eligieron los días en los que p21 alcanzó su mayor expresión tras los distintos estímulos (mostrados en la figura 15). Así pues, se seleccionó el quinto día para el tratamiento con LPS 50 ng/ml y el tercer día para el tratamiento con LPS 100 ng/ml, así como con PMA 324 nM.

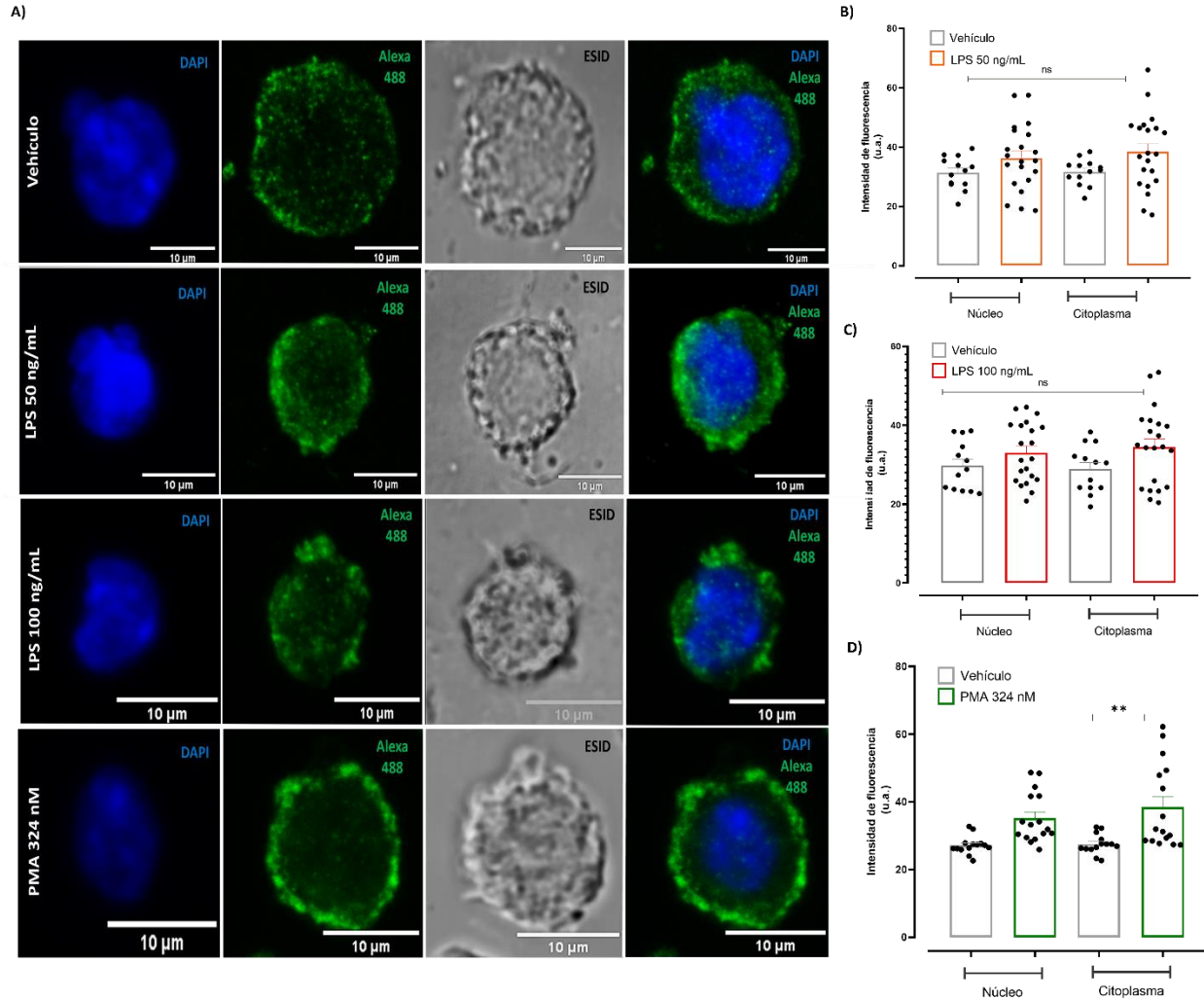


Figura 17. La exposición prolongada al LPS no induce cambios en la redistribución subcelular de p21 en BMMCs.

El panel A, muestra las imágenes representativas de BMMCs tratadas con vehículo o después de los tratamientos previamente descritos en orden descendente (LPS 50 y 100 ng/ml; PMA 324 nM). En azul se observa el núcleo (DAPI), en verde p21 (Alexa 488) y en una escala de grises, se identifica el campo claro (ESID), el cual permite observar las características morfológicas de las células. Los paneles B, C y D, muestran el análisis de la intensidad media de fluorescencia (u.a.) haciendo uso del programa ImageJ. Los datos mostrados corresponden a la media \pm EE de al menos cuatro experimentos de los cuales se seleccionaron 5 células por campo. ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Sidak's. ** $p < 0.01$. NS, no significativo.

En primera instancia, se observó que p21 se encuentra presente tanto en el núcleo como en el citoplasma de células cebadas no tratadas (expuestas al vehículo). Al exponer las

BMMCs a los distintos tratamientos, en algunas células se observó una redistribución subcelular de p21. Aunque el análisis estadístico no mostró diferencias significativas, se observó una expresión ligeramente mayor a nivel del citoplasma al quinto y tercer día de tratamiento con LPS 50 ng/ml y 100 ng/ml respectivamente. A los tres días de exposición a PMA, se observó mayor expresión de p21 a nivel citoplásmico, la cual sí alcanzó significancia estadística.

Es importante mencionar que en las células donde se observó una redistribución de p21 tras los tratamientos mencionados pudo apreciarse la localización de p21 en la membrana plasmática, lo que posiblemente indique que esa proteína se encuentra llevando a cabo funciones del control del citoesqueleto de actina. Sin embargo, existió cierto grado de heterogeneidad en la respuesta celular, dado que no fue posible observar este comportamiento en todas las células analizadas.

En las imágenes del campo claro se observó la morfología característica de las BMMCs, algunas con mayor cantidad de microvellosidades, así como algunos gránulos más electrodensos que otros, pero ninguna mostró un proceso de desgranulación. Esto es consistente con diversos estudios que han mostrado que la estimulación del receptor TLR4 con LPS induce desgranulación picemal en este tipo celular, donde se observa un vaciamiento lento del contenido granular sin que ocurra la desgranulación.

III. La actividad de la enzima β -galactosidasa aumenta tras la estimulación con distintas concentraciones de LPS en BMMCs

La actividad de β -galactosidasa (otro marcador de senescencia) se determinó en los días y condiciones de incubación en los cuales se observó la expresión máxima de p21.

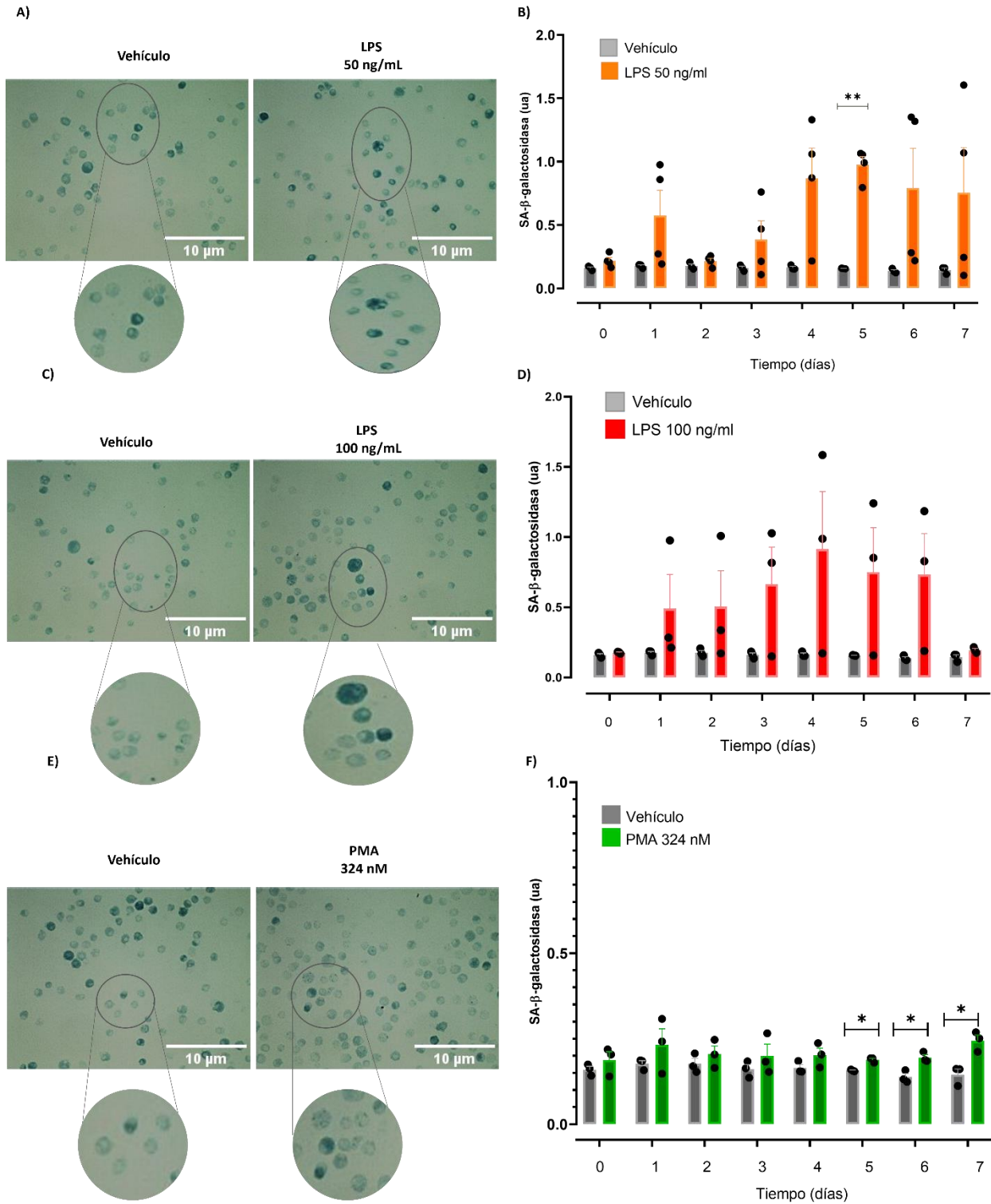


Figura 18. La exposición prolongada al LPS produce un aumento en la actividad enzimática de la β -galactosidasa en BMMCs.

Paneles A, C y E. Imágenes representativas de la tinción SA- β -galactosidasa (células teñidas en azul) en BMMCs tratadas con vehículo (izquierda) o con distintos tratamientos (LPS 50 y 100 ng/ml, PMA 324 nM; derecha). Paneles B, D y F. Análisis cuantitativo de la actividad de β -galactosidasa realizado a través de la medición de absorbancia a una longitud de onda de 405 nm (ver Materiales y Métodos). Los datos mostrados en el panel B y F corresponden a la media \pm EE de al menos 3 experimentos, mientras que en el panel D, los datos mostrados corresponden a 2 experimentos. ANOVA de dos vías seguido de la prueba post hoc de Dunnett. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Se observó una actividad enzimática basal en células tratadas con vehículo mientras que los tratamientos con LPS indujeron cambios en la actividad de la β -galactosidasa. La concentración de 50 ng/ml de LPS indujo un aumento paulatino de la actividad enzimática a partir del cuarto día y se sostuvo el resto de los días. La mayor actividad de β -galactosidasa se obtuvo al quinto día de tratamiento. Con respecto a la concentración de 100 ng/ml, la actividad de la enzima comenzó a incrementar tras 24 horas de tratamiento, alcanzando la máxima actividad al cuarto día. Posteriormente dicha actividad comenzó a disminuir y al séptimo día regresó a los valores basales.

Tras el tratamiento con PMA, la actividad de β -galactosidasa mostró un aumento estadísticamente significativo durante el quinto, sexto y séptimo día de tratamiento, sin embargo, no alcanzó valores similares a las células estimuladas con LPS.

IV. El SASP se induce de manera transitoria tras la exposición de células cebadas a diferentes concentraciones de LPS

Para evaluar la inducción del fenotipo secretor asociado a senescencia en células cebadas, se siguió un diseño experimental en donde, después de una estimulación inicial a tiempos óptimos para observar a p21, se removió el sobrenadante de las células y se añadió medio nuevo por 72 h. Posteriormente, la secreción de citocinas pertenecientes al SASP fue analizada por ELISA (Ver diseño experimental).

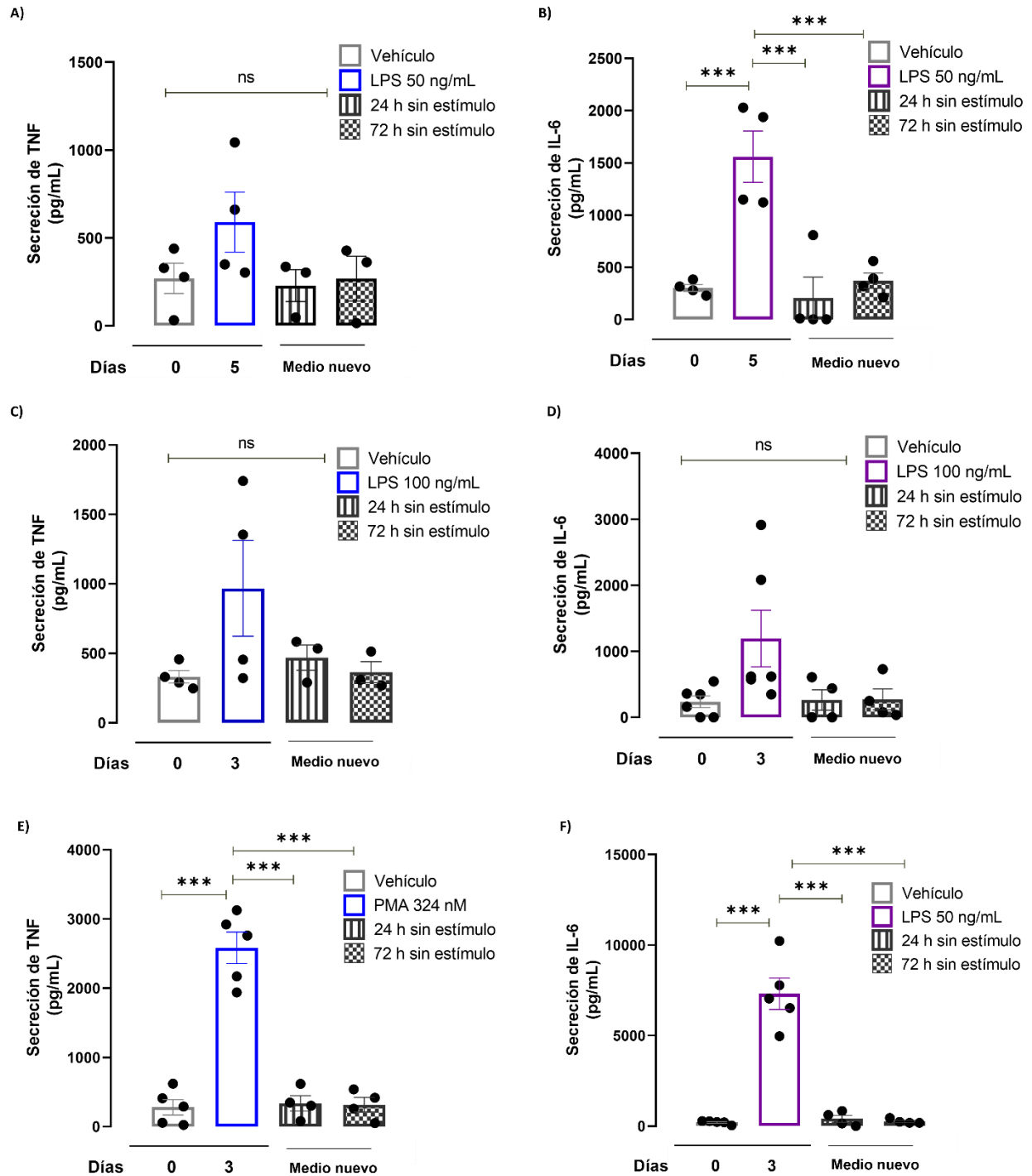


Figura 19. La exposición prolongada al LPS induce un fenotipo secretor asociado a senescencia transitorio en células cebadas murinas.

En los paneles A, C y E, se muestra la secreción de TNF en células tratadas con vehículo (barras de color gris) y tras la exposición a los distintos tratamientos (LPS 50 y 100 ng/mL, PMA 324 nM; barras de color azul). En las siguientes barras, se observa la secreción de TNF a las 24 h (barra con líneas verticales) y

72 h (barra cuadrículada) posterior al cambio de medio a uno libre de estímulo. En los paneles B, D y F se muestra la secreción de IL-6 bajo las mismas condiciones de los paneles previos. El análisis de absorbancia se realizó a una longitud de onda de 405 nm mediante el lector de placas Tecan. Los datos mostrados en el panel B y F corresponden a la media \pm EE de al menos 3 experimentos. ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Sidak's. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Los resultados mostraron una secreción basal tanto de TNF como de IL-6, dos de las principales citocinas que forman parte del SASP, en células sin estimular (vehículo). Al añadir los tratamientos y mantener el medio sin cambio durante los días correspondientes, se observó un aumento en la secreción de ambas citocinas, esta secreción alcanzó alrededor de los 1000 a 1500 pg/ml tras la administración de LPS 50 y 100 ng/mL respectivamente, mientras que el estímulo con PMA indujo dos veces la secreción de TNF comparado con el LPS. Sin embargo, cuando se realizó el cambio de medio a uno libre de LPS en sus dos concentraciones o PMA a las 24 y 72 h, la secreción de la citocina disminuyó, regresando a niveles basales y en algunos casos siendo indetectable por el método utilizado.

Respecto a la IL-6, se observó una tendencia similar en las tres condiciones, sin embargo, su secreción alcanzó niveles mucho más altos en comparación con el TNF, llegando alrededor de los 2000 pg/ml para el tratamiento con LPS 50 y 100 ng/mL y hasta los 10000 pg/ml tras el tratamiento con PMA.

V. La exposición prolongada al LPS induce el arresto del ciclo celular en la fase G1 en BMMCs.

Con el fin de evaluar el efecto de la exposición prolongada al LPS sobre el ciclo celular de cultivos de BMMCs, se analizó el número de células en cada una de las fases del ciclo por medio de citometría de flujo, a los tiempos y condiciones donde se observó la máxima expresión de la proteína p21.

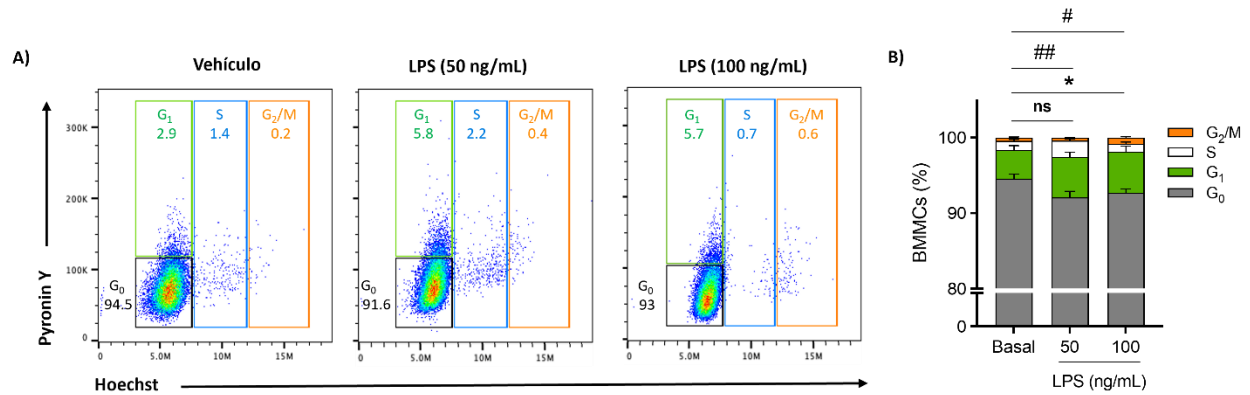


Figura 20. La exposición prolongada al LPS induce un arresto en la fase G1 del ciclo celular en BMBCs.

Panel A. Imágenes representativas del análisis de las fases del ciclo celular en las que las BMBCs se encontraron tras los distintos estímulos, señalando las áreas correspondientes a cada fase del ciclo. Panel B. Representación gráfica (en porcentaje) de las fases del ciclo celular en las que se encontraron las BMBCs sometidas a los diferentes tratamientos. Los datos mostrados corresponden a la media \pm EE de al menos tres experimentos de la comparación con respecto a la fase G₀ (marcado con el símbolo #) y G₁ (marcado con un *) de las células tratadas con vehículo. ANOVA de dos vías seguida de la prueba post hoc de Dunnett. #* $p < 0.05$ p## < 0.01 . NS=no significativo.

Como puede verse en la Figura 20, aquellos cultivos tratados con vehículo presentaron más del 90% de células en la fase G₀ (área gris de las barras), mientras que alrededor de un 4% se encontraron en fase G₁. Tras someter a las BMBCs al tratamiento de 50 y 100 ng/ml de LPS, el porcentaje de células que se encontraban en G₁ aumentó a un 5.31% y 5.45%, respectivamente. Esto es equivalente a un aumento del 32% y 36% respecto del grupo control. Ese incremento fue estadísticamente significativo en las células tratadas con 100 ng/ml de LPS. El cambio en la fase G₁ no se reflejó directamente en algún cambio en el número de células que estaban en fase S y G₂/M, cuyos valores aumentaron solamente un 0.96% en el grupo tratado con LPS 50 ng/ml y un 0.24% con LPS 100 ng/ml.

13. DISCUSIÓN

Las recomendaciones más recientes para estudiar el envejecimiento sugieren que ese fenómeno debe ser abordado a través de procesos moleculares, celulares y sistémicos ⁶⁶. Esta aproximación propone la existencia de diversos componentes que constituyen el envejecimiento y permiten su estudio. A esos componentes les llama marcadores del envejecimiento (en inglés, hallmarks of aging). Dentro de ellos encontramos a la senescencia celular. A su vez, la senescencia celular tiene características mejor conocidas como marcadores de senescencia, las cuales hacen posible su estudio. A pesar del consenso en la definición de marcadores de senescencia, el análisis de esos marcadores es un reto, ya que pueden variar según el tejido y linaje celular en el que se investiguen. Este proyecto pretendió caracterizar la expresión de los marcadores de senescencia en un linaje celular del sistema inmune innato, a través del desarrollo de un modelo de senescencia inducida por estrés (SIPS) tras la exposición prolongada a un PAMP (LPS) en las CCs. El estudio es de gran relevancia porque la función de esas células es la regulación de la inflamación y la función de otras células del sistema inmune a través de la secreción del contenido preformado almacenado en sus gránulos y una diversidad de moléculas proinflamatorias ⁵.

Debido a la heterogeneidad de las características de la senescencia en cada tipo celular, diferentes autores han propuesto que, para considerar a una célula senescente, es importante observar al menos tres marcadores de senescencia *in vitro*. Por ejemplo, según González-Gualda y colaboradores ⁹⁰ es necesario observar:

1. El arresto del ciclo celular mediante la detección de reguladores negativos como p21 y p16.
2. Un cambio relevante a nivel estructural en las células, por ejemplo, un aumento en la masa lisosomal, la formación de SAHFs, la pérdida de lámina B, un cambio en la morfología celular, entre otros.
3. Y un rasgo adicional específico para el subtipo de senescencia que se está evaluando, por ejemplo, la regulación positiva de factores específicos del SASP, marcadores relacionados con daños al DNA, aumento en los niveles de ROS, entre otros.

Así pues, en nuestras células pudimos observar que el tratamiento prolongado con LPS ocasiona el aumento en la expresión de p21, así como una actividad aumentada de la enzima β -galactosidasa, la cual refleja el aumento en la masa lisosomal ⁹¹. También encontramos la inducción de un SASP de forma transitoria.

Es importante mencionar que la mayor parte de los estudios suele evaluar estos parámetros en células proliferativas. Sin embargo, cuando evaluamos el arresto del ciclo celular en las BMMCs, nos encontramos con que un gran porcentaje de las células diferenciadas en cultivo se encontraba en fase G0, como corresponde a una célula post-mitótica y diferenciada. Antecedentes de nuestro laboratorio, ya habían observado este hecho en BMMCs provenientes de ratones envejecidos y cultivadas hasta por 18 semanas, donde, si bien se observó un incremento en el porcentaje de células senescentes con el paso del tiempo, hubo un gran porcentaje de células que se mantuvieron quiescentes (en G0). Esto es, además, congruente con la vida media prolongada de las CCs y posiblemente cierta resistencia al envejecimiento ⁹².

La quiescencia es un estado no proliferativo reversible tras la adición de estímulos mitogénicos adecuados, en el que normalmente encontramos a células postmitóticas como las neuronas, los cardiomiocitos, los adipocitos, entre otras ³¹. Es posible identificar a estas células en la fase G0 del ciclo celular, tal como se observó en nuestros resultados. Tras el reingreso al ciclo celular, las células postmitóticas pueden tener dos alternativas: la apoptosis o la senescencia ⁹³. Diversos estudios en este tipo de células han logrado observar un fenotipo similar a la senescencia tras recibir un daño persistente al DNA. En la tabla 2 se muestran datos recabados del fenotipo senescente en diferentes células postmitóticas.

Tipo celular	Inductor de senescencia	Marcadores de senescencia expresados	Autores
Células troncales mesenquimales de placenta humana	LPS 200 ng/ml durante 24 horas	<i>In vitro</i> Arresto del ciclo celular en G1/G0 ↑ p16	Zhong, Y. et al. (2022)

		<p>↑ p53 ↑ SA-β-gal SASP: ↓ MMP9</p>	
<p>Células endoteliales de la córnea</p>	<p>Irradiación UVA (dosis subletal 14,77 mW/cm²) por 2 horas</p>	<p><i>In vitro</i> Arresto del ciclo celular en fase G2/M Cambios morfológicos: aumento del tamaño celular, alargamiento celular, alteración de las uniones y formación de procesos largos Aumento de la expresión de p21 ↑ SA-β-gal</p>	<p>White, T. et al. (2021)</p>
<p>Tejido adiposo blanco (adipocitos maduros, preadipocitos, progenitores de adipocitos) derivado de ratones C57BL/6J de 5 semanas</p>	<p>Dieta alta en grasas durante 10 semanas</p>	<p><i>In vivo</i> ↑ SA-β-gal ↑ p21 ↑ p16 ↑ γH2AX Hipertrofia de adipocitos Expresión de factores no clásicos del SASP: Mcp1, TGFβ1, Fn1, Timp1</p>	<p>Pini, M. et al. (2021)</p>

Cardiomiocitos derivados de la línea celular H9C2 de embriones de ratas	Doxorrubicina 5 μ mol/L por 24 horas	<i>In vitro</i> \uparrow SA- β -gal \uparrow p21 \uparrow PAI-1 \uparrow SASP: IL-6, IL-17, TNF- α	Zhang, S. et al. (2021)
Neuronas primarias derivadas del hipocampo de ratas	Cultivo a largo plazo (hasta 28 días) tratado con Ara C	<i>In vitro</i> \uparrow SA- β -gal \uparrow p16 Pérdida de lámina B Expresión génica del SASP: <i>Cxcl1</i> , <i>Pai-1</i> , <i>Igfbps</i> \uparrow tamaño nuclear	Ishikawa, S. et Ishikawa F. (2020)
Cardiomiocitos aislados de ratones C57BL/6J	Edad: 3 y 24 meses	<i>In vitro</i> \uparrow SA- β -gal \uparrow p21 Expresión de genes proinflamatorios no canónicos (<i>Edn3</i> , <i>Tgfb2</i> y <i>Gdf15</i>)	Anderson, R. et al. (2019)
Neuronas ganglionares de la retina	Retinopatía inducida por oxígeno	<i>In vitro</i> \uparrow p53 \uparrow p16 \uparrow PAI1 \uparrow γ H2AX \uparrow transcripción de ARNm de las ciclinas <i>Cdkn1a</i> y <i>Cdkn2a</i>	Oubaha, M. et al. (2016)

		<p>↑ SA-β-gal</p> <p>SASP: Pai1, Il6, Il1</p> <p>β, Tgf- β1 y Vegf-a</p>	
--	--	--	--

Tabla 3. Marcadores de senescencia en células postmitóticas.

Como se puede observar, el fenotipo senescente varía acorde al tipo celular y el inductor de senescencia. Si bien los marcadores de senescencia son variables, hay algunos que parecen conservarse como el aumento en la expresión de los reguladores negativos del ciclo celular, la actividad incrementada de la enzima β galactosidasa, así como algunos elementos del SASP, como la secreción de IL-6, una citocina canónica del fenotipo secretor. Nuestros resultados coinciden con estos datos, lo que podría indicar que el LPS induce daño al ADN en las BMMCs, pero es necesario realizar otros experimentos para confirmarlo como la medición de la expresión de la proteína lámina B mediante western blot o microscopía confocal.

Se ha sugerido que la senescencia en células postmitóticas es un mecanismo de resistencia a condiciones de estrés crónico. Por ejemplo, Oubaha y colaboradores analizaron en distintas células de la retina de crías de ratón sometidas a un modelo de retinopatía inducida por oxígeno, el desarrollo de zonas avasculares similares a las que se observan en la retinopatía diabética. En ese modelo, los autores observaron que el porcentaje de células de la retina que adquirieron un fenotipo senescente se encontraban en mayor porcentaje en zonas avasculares que en las zonas vascularizadas. Esto, según Sah y colaboradores sugiere que la senescencia en células postmitóticas les confiere un mecanismo de resistencia a la apoptosis en microambientes estresores ⁹³. Nuestros resultados ciertamente no permiten esa deducción y no podemos afirmar que las BMMCs senescentes sean resistentes a la apoptosis (se necesitaría evaluar específicamente ese parámetro). No obstante, considerando que las CCs tienen una vida media larga y su localización en tejidos de interfase con el medio externo, podría sugerirse que las CCs pudieran resistir periodos más prolongados de exposición a estímulos estresores (como el LPS) arrojando su ciclo celular en la fase G1.

Con respecto a otros marcadores de senescencia, es importante mencionar que no sólo las células senescentes presentan una actividad aumentada de la β-galactosidasa. Se

ha visto que las células quiescentes también tienen esta característica, aunque en menor medida ³¹. Por lo tanto, la actividad de la β -galactosidasa no se considera un marcador específico de las células senescentes, a menos de que se encuentren presentes otros marcadores de senescencia ⁹¹. Nuestros resultados sugieren que el incremento en la actividad de esa enzima pudiera estar relacionado al incremento en el porcentaje de células encontradas en fase G1. Además, nuestros resultados muestran claramente que tras el tratamiento con LPS, las BMMCs muestran una actividad enzimática aumentada comparada con las células tratadas con el vehículo. En las BMMCs, la β -galactosidasa, está presente en condiciones basales probablemente debido al estado postmitótico de las células y al gran número de lisosomas secretores que se encuentran en el citoplasma. El cultivo prolongado de las BMMCs induce un aumento en la actividad de esa enzima y el LPS también, por lo que proponemos que el incremento en la actividad de la β -galactosidasa es un marcador de senescencia en las CCs.

Con respecto al SASP, ya hemos mencionado que se caracteriza por ser un fenotipo complejo y heterogéneo que varía acorde al tipo de inductor de senescencia, el tipo celular y, en este caso, si son células mitóticas o postmitóticas ⁹⁴. Nuestros resultados mostraron la inducción de un fenotipo secretor asociado a senescencia tras varios días de exposición al LPS. Considerando la teoría de que, una vez inducido el daño celular, éste es irreversible y conduce a la instauración del SASP, decidimos medir la secreción de dos de las citocinas canónicas de ese fenotipo secretor: la IL-6, a la cual se le atribuyen efectos pleiotrópicos y el TNF- α , un componente común del fenotipo secretor. Ambas son conocidas por acelerar y reforzar la senescencia celular ^{64,95}. Nuestros resultados mostraron un incremento rápido, pero no sostenido de esas citocinas, sugiriendo que la inducción del SASP fue transitoria. Estudios previos en donde se observó que el LPS es un inductor de senescencia en células distintas a las BMMCs, se midieron los niveles relativos de RNAm de las principales moléculas que conforman el SASP inmediatamente después de la exposición al LPS ^{72,75} tal y como nosotros lo evaluamos. Esos autores encontraron un incremento del RNAm de múltiples citocinas. Es posible que, en nuestro caso, el LPS hubiera aumentado los niveles del RNAm de TNF e IL-6, aunque no se hubiera detectado un incremento importante en su secreción. Es importante mencionar que el SASP es regulado en múltiples niveles incluyendo la

transcripción, la traducción, la estabilidad del RNAm ⁹⁶ y la secreción de proteínas, por lo cual sería interesante evaluar los niveles de RNAm de las células expuestas al LPS y no solo el sobrenadante. Es importante recordar que, al ser células en estado quiescente, es posible que nos encontremos con un SASP distinto al de las células proliferativas, tal como fue reportado en el estudio de Anderson y colaboradores, quienes estudiaron al SASP producido por cardiomiocitos cultivados *in vitro* procedentes de ratones C57BL/6J de 3, 15, 20, 24 y 30 meses de edad. Esos autores encontraron un aumento en tres principales moléculas involucradas en procesos de fibrosis, proliferación e hipertrofia celular: Edn3, Tgfb2 y Gdf15 ⁹⁷. Nosotros observamos un incremento en la secreción de moléculas proinflamatorias comunes del SASP de células mitóticas como TNF e IL-6. Sin embargo, es posible que el fenotipo secretor de las BMMCs esté constituido por otras moléculas como la quimiocina CXCL1, cuya expresión aumentó en células cebadas de tejido inflamado de ratones envejecidos, en un estudio realizado por Barkaway y colaboradores ⁸⁴.

Con respecto a la expresión del regulador negativo del ciclo celular, la proteína p21, es importante mencionar que nuestros resultados mostraron un aumento progresivo en su expresión tras la exposición prolongada a concentraciones consideradas bajas de LPS para las BMMCs. En la literatura, las concentraciones de LPS mayores de 10 ng/ml utilizados en condiciones *in vitro* se consideran bajas y son las que normalmente se usan para inducir tolerancia en otros tipos celulares ⁹⁸. Nosotros pudimos observar que las concentraciones bajas de LPS (50 y 100 ng/ml) añadidas de forma prolongada a las BMMCs indujo la expresión de marcadores de senescencia. Debido a que las exposiciones prolongadas al LPS inducen tolerancia, sería necesario realizar experimentos que nos ayuden a saber concretamente si existe similitud entre el estado de tolerancia y el de senescencia inducido por el LPS en este tipo celular. Se podría estudiar el aumento de proteínas como IRAK-M y SHIP-1, las cuales forman parte de los mecanismos de tolerancia al LPS ⁹⁹. Es importante destacar que la relación entre senescencia celular y tolerancia aún no han sido estudiados, por lo que sería importante considerar su estudio en un futuro. Por otro lado, la redistribución de la proteína p21, conocida por su participación en la regulación de la progresión del ciclo celular cuando se localiza en el núcleo, aumenta en respuesta al LPS y se localiza en el citoplasma y en

la membrana plasmática de algunas de las BMMCs analizadas. A este respecto, se sabe que cuando la proteína se encuentra en el núcleo ejerce su función como regulador negativo del ciclo celular. Cuando se transloca del núcleo al citoplasma pierde dicha función y adquiere roles diferentes, los cuales contribuyen a la inhibición de la apoptosis, así como la reorganización del citoesqueleto de actina y a procesos de migración celular asociados al comportamiento metastásico de algunos tumores ¹⁰⁰. Nuestros resultados coinciden con los de Sánchez-Pérez y colaboradores (2015), quienes observaron que la inducción de senescencia prematura en células epiteliales alveolares A549 expuestas a materia particulada (PM10) con contenido de LPS, durante 24 y 48 h, ocasionó la estabilización de p21 en el citoplasma dependiente del tiempo. Asimismo, observaron un aumento en el número de fibras de estrés de F-actina lo que se relacionó con el aumento en la tasa de polimerización de actina. Estos eventos hicieron que los autores llegaran a sugerir que estaban observando un fenotipo senescente con potencial protumoral ¹⁰¹.

En otro estudio realizado por Kartika y colaboradores, se observó un aumento en la expresión de p21 en citoplasma tras el tratamiento combinado de abemaciclib (inhibidor potente y selectivo de las ciclinas CDK4/6, que induce senescencia en células cancerosas) y navitoclax (inhibidor de la familia de proteínas Bcl-2 antiapoptóticas) en dos líneas celulares de cáncer de mama, MDA-MB-231 y MCF-7. Asimismo, observaron que la localización de p21 en el citoplasma suprimió la apoptosis mediante la inhibición de la caspasa-3. Sugiriendo que la sobreexpresión de p21 en células MDA-MB-231 estaba asociada a un aumento en la resistencia al proceso apoptótico.

Si bien nuestros resultados no mostraron significancia estadística y no todas las células mostraron una redistribución subcelular de p21 a nivel citoplasmático, fue posible observar la acumulación de la proteína en la membrana de las BMMCs analizadas tras sus respectivos tratamientos a través de cortes en Z. No obstante, esto no es suficiente para afirmar que la exposición prolongada al LPS induce la expresión de un fenotipo senescente protumoral. Sin embargo, es probable que se esté llevando a cabo una reorganización del citoesqueleto de actina y posiblemente esté induciendo cierto grado de resistencia a la apoptosis en las BMMCs terminalmente diferenciadas en respuesta al daño inducido por el LPS, lo cual podría explicar el pequeño porcentaje de BMMCs

arrestadas en G1, tras su respectivo tratamiento. Asimismo, en algunas células, el núcleo celular se observaba más grande, lo que podría sugerir la pérdida de la proteína lámina B. Futuros experimentos darán más información al respecto.

14. CONCLUSIONES

El estudio de la senescencia celular es un área de estudio muy interesante con muchas áreas aún inexploradas. Estudiar la senescencia prematura inducida por estrés es muy relevante porque los seres vivos, se encuentran constantemente en contacto con estímulos estresores provenientes del ambiente, lo que influye en el desarrollo prematuro de enfermedades crónico-degenerativas asociadas a la edad. Los datos obtenidos en este proyecto muestran, por primera vez en CCs, que la exposición prolongada al LPS induce marcadores de senescencia en BMMCs terminalmente diferenciadas.

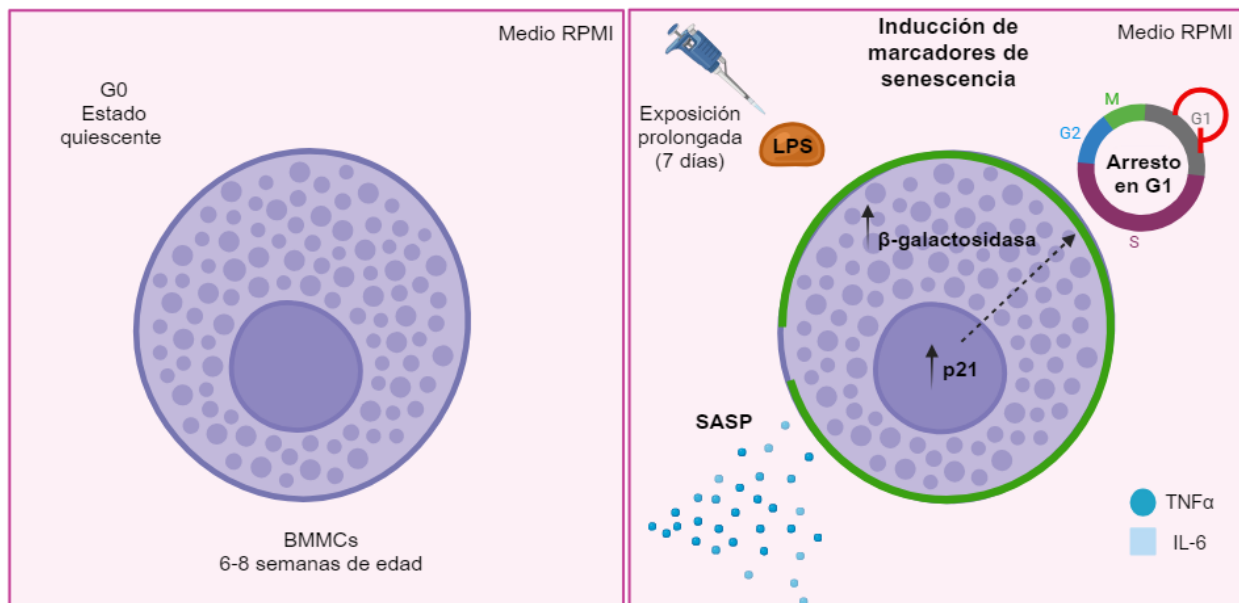


Figura 21. Resumen gráfico de resultados. La exposición prolongada al LPS induce la adquisición de marcadores de senescencia en BMMCs postmitóticas en un modelo de SIPS.

15. PERSPECTIVAS

- Es importante continuar con el estudio del fenómeno de senescencia en las células cebadas con el objetivo de poder definir qué marcadores, además de los que se observaron, caracterizan a células inmunes de vida media prolongada. Las

investigaciones futuras podrían tener como base el modelo de senescencia prematura inducida por estrés bien que se estableció en esta tesis.

-Evaluar la vía de señalización involucrada en la expresión de marcadores de senescencia inducida por el receptor TLR4 en BMMCs.

-Una vez bien estandarizado el modelo de SIPS, se podría generar un modelo *in vivo* que evalúe los efectos de las BMMCs senescentes en ratones jóvenes. De manera particular, sería interesante ver el papel de las células cebadas senescentes en el desarrollo del envejecimiento inflamatorio y enfermedades asociadas a la edad.

-Medir la secreción o niveles de RNAm de CXCL1 mediante PCR o ELISA, debido a que esta es la única quimiocina cuya producción ha sido asociada a las células cebadas senescentes. Si la expresión de esa quimiocina se observa en nuestro modelo, ayudaría a mejorar su validación.

-Medir otros marcadores de senescencia como la pérdida de lámina B y la formación de SAHFs en respuesta a la estimulación prolongada del receptor TLR4 en BMMCs.

-Evaluar la comunicación paracrina provocada por el SASP en este modelo de SIPS y trasladarlo a un modelo *in vivo*, con el objetivo de observar los efectos sobre otras células del sistema inmune y los efectos a nivel local y sistémico que pudiera desembocar en un estado de inflamación crónica.

-Evaluar los efectos de las BMMCs senescentes en un contexto de inflamación crónica, como el crecimiento tumoral.

16. BIBLIOGRAFÍA

1. Gilfillan, A., Austin, S. & Metcalfe, D. Mast Cell Biology: Introduction and Overview. *Adv Exp Med Biol* **716**, 1–11 (2011).
2. Möllerherm, H. *et al.* Differentiation and Functionality of Bone Marrow-Derived Mast Cells Depend on Varying Physiologic Oxygen Conditions. *Front Immunol* **8**, 1–11 (2017).
3. González-de-Olano, D. & Álvarez-Twose I. Mast Cells as Key Players in Allergy and Inflammation. *J Investig Allergol Clin Immunol* **28**, 365–378 (2018).
4. Yong, L. C. J. The mast cell: origin, morphology, distribution, and function . *Experimental and Toxicologic Pathology* **49**, 409–424 (1997).
5. Whittemore, M.-K., Dileepan, K. & Wood, J. G. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Frontiers Immunology* **6**, 1–12 (2016).
6. Wernersson, S. & Pejler, G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol* **14**, 478–494 (2014).
7. Varricchi, G. *et al.* Physiological Roles of Mast Cells: Collegium Internationale Allergologicum Update . *Int Arch Allergy Immunol* **179**, 247–261 (2019).
8. Marshall, J. S. & Jawdat, D. M. Mast cells in innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **114**, 21–27 (2004).
9. Elieh Ali Komi, D., Wöhrl, S. & Bielory, L. Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* vol. 58 342–365 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08769-2> (2020).
10. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* vol. 140 805–820 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022> (2010).
11. Varricchi, G. *et al.* Physiological Roles of Mast Cells: Collegium Internationale Allergologicum Update 2019. *International Archives of Allergy and Immunology* vol. 179 247–261 Preprint at <https://doi.org/10.1159/000500088> (2019).
12. Mencarelli, A. *et al.* A humanized mouse model to study mast cells mediated cutaneous adverse drug reactions. *J Leukoc Biol* **107**, 797–807 (2020).
13. Mendoza, R. P., Fudge, D. H. & Brown, J. M. Cellular Energetics of Mast Cell Development and Activation. *Cells* **10**, 1–17 (2021).
14. Turner, H. & Kinet, JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor FcεRI. *Nature* **402**, B24–B30 (1999).
15. Osorio-Perez, R. M., Rodríguez-Manzo, G., Espinosa-Riquer, Z. P., Cruz, S. L. & González-Espinosa, C. Endocannabinoid modulation of allergic responses: Focus on the control of FcεRI-mediated mast cell activation. *Eur J Cell Biol* **102**, (2023).

16. Kambayashi, T. & Koretzky, G. A. Proximal signaling events in FcεRI-mediated mast cell activation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 119 544–552 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.01.017> (2007).
17. Yu, Y., Blokhuis, B. R., Garssen, J. & Redegeld, F. A. Non-IgE mediated mast cell activation. *Eur J Pharmacol* **778**, 33–43 (2016).
18. Ain, Q., Batool, M. & Choi, S. TLR4-Targeting Therapeutics: Structural Basis and Computer-Aided Drug Discovery Approaches. *Molecules* **25**, 1–17 (2020).
19. Espinosa-Riquer, Z. *et al.* Signal Transduction Pathways Activated by Innate Immunity in Mast Cells: Translating Sensing of Changes into Specific Responses. *Cells* **9**, 1–39 (2020).
20. Bertani, B. & Ruiz, N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *American Society for Microbiology* **8**, 1–19 (2018).
21. Sampath, V. Bacterial endotoxin-lipopolysaccharide; structure, function and its role in immunity in vertebrates and invertebrates. *Agriculture and Natural Resources* **52**, 115–120 (2018).
22. Candelli, M. *et al.* Interaction between lipopolysaccharide and gut microbiota in inflammatory bowel diseases. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms22126242> (2021).
23. Di Pierro, F. Gut microbiota parameters potentially useful in clinical perspective. *Microorganisms* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112402> (2021).
24. Prieto, L., Graves, S. & Baker, D. Insights from In Vivo Studies of Cellular Senescence. *Cells* **9**, 1–13 (2020).
25. Kim, K. A., Jeong, J. J., Yoo, S. Y. & Kim, D. H. Gut microbiota lipopolysaccharide accelerates inflamm-aging in mice. *BMC Microbiol* **16**, (2016).
26. Nafstad, P. *et al.* Lung cancer and air pollution: A 27 year follow up of 16 209 Norwegian men. *Thorax* **58**, 1071–1076 (2003).
27. Zenobia, C. & Darveau, R. P. Does Oral Endotoxin Contribute to Systemic Inflammation? *Frontiers in Oral Health* **3**, (2022).
28. Budamagunta, V. *et al.* Senescence-associated hyper-activation to inflammatory stimuli in vitro. *Aging* **13**, 19088–19107 (2021).
29. Richard McIntosh, J. Mitosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, (2016).
30. Schafer, K. A. The Cell Cycle: A Review. *Veterinary Pathology* vol. 35 461–478 Preprint at <https://doi.org/10.1177/030098589803500601> (1998).

31. Terzi, M. Y., Izmirli, M. & Gogebakan, B. The cell fate: senescence or quiescence. *Molecular Biology Reports* vol. 43 1213–1220 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4065-0> (2016).
32. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. & Berneman, Z. N. *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. *Cell Prolif* vol. 36 (2003).
33. Cheffer, A., Tárnok, A. & Ulrich, H. Cell cycle regulation during neurogenesis in the embryonic and adult brain. *Stem Cell Rev Rep* **9**, 794–805 (2013).
34. Wagner, K. D. & Wagner, N. The Senescence Markers p16INK4A, p14ARF/p19ARF, and p21 in Organ Development and Homeostasis. *Cells* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cells11121966> (2022).
35. Engeland, K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death and Differentiation* vol. 29 946–960 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z> (2022).
36. Johnson, D. G. & Walker, C. L. *CYCLINS AND CELL CYCLE CHECKPOINTS*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* vol. 39 (1999).
37. Denicourt, C. & Dowdy, S. F. Cip/Kip proteins: More than just CDKs inhibitors. *Genes and Development* vol. 18 851–855 Preprint at <https://doi.org/10.1101/gad.1205304> (2004).
38. Ferenbach, D. A. & Bonventre, J. V. The Molecular Response to Renal Injury: How Does Chronic Renal Damage Suppress Normal Repair Processes? in *Kidney Development, Disease, Repair and Regeneration* 367–379 (Elsevier Science Ltd., 2015). doi:10.1016/B978-0-12-800102-8.00027-8.
39. Kasthuber, E. R. & Lowe, S. W. Putting p53 in Context. *Cell* vol. 170 1062–1078 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028> (2017).
40. Romanov, V. S., Pospelov, V. A. & Pospelova, T. V. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21Waf1: Contemporary view on its role in senescence and oncogenesis. *Biochemistry (Moscow)* vol. 77 575–584 Preprint at <https://doi.org/10.1134/S000629791206003X> (2012).
41. Karimian, A., Ahmadi, Y. & Yousefi, B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair* vol. 42 63–71 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.04.008> (2016).
42. Besson, A., Gurian-West, M., Schmidt, A., Hall, A. & Roberts, J. M. p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev* **18**, 862–876 (2004).

43. Besson, A., Assoian, R. K. & Roberts, J. M. Regulation of the cytoskeleton: An oncogenic function for CDK inhibitors? *Nature Reviews Cancer* vol. 4 948–955 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrc1501> (2004).
44. Lee, M. H., Kundu, J. K., Chae, J. Il & Shim, J. H. Targeting ROCK/LIMK/cofilin signaling pathway in cancer. *Archives of Pharmacal Research* vol. 42 481–491 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01153-w> (2019).
45. Petralia, R., Mattson, M. & Yao, P. Aging and longevity in the simplest animals and the quest for immortality. *Ageing Research Review* **16**, 66–82 (2014).
46. Chalise, H. Aging: Basic Concept. *Am J Biomed Sci Res* **1**, 1–4 (2019).
47. Serrano-López, J. & Martín-Antonio, B. Inflammaging, an Imbalanced Immune Response That Needs to Be Restored for Cancer Prevention and Treatment in the Elderly. *Cells* **10**, 1–20 (2021).
48. Shay, J. & Wright, W. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 72–76 (2000).
49. Davan-Wetton, C., Pessolano, E., Perreti, M. & Montero-Melendez, T. Senescence under appraisal: hopes and challenges revisited. *Springer* **78**, 3333–3354 (2021).
50. Sapieha, P. & Mallette, F. A. Cellular Senescence in Postmitotic Cells: Beyond Growth Arrest. *Trends in Cell Biology* vol. 28 595–607 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.03.003> (2018).
51. Wang, Z., Wei, D. & Xiao, H. Methods of Cellular Senescence Induction Using Oxidative Stress. *Springer Link* **1048**, 135–144 (2013).
52. von Kobbe, C. Cellular senescence: a view throughout organismal life. *Cellular and Molecular Life Sciences* **75**, 3553–3567 (2018).
53. Muñoz-Espín, D. & Serrano, M. Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 15 482–496 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrm3823> (2014).
54. Hernandez-Segura, A., Nehme, J. & Demaria, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol* **28**, 436–453 (2018).
55. Lai, W. F. & Wong, W. T. Roles of the actin cytoskeleton in aging and age-associated diseases. *Ageing Research Reviews* vol. 58 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101021> (2020).
56. Moujaber, O. *et al.* Cellular senescence is associated with reorganization of the microtubule cytoskeleton. *Cellular and Molecular Life Sciences* **76**, 1169–1183 (2019).

57. Hamsanathan, S. & Gurkar, A. U. Lipids as Regulators of Cellular Senescence. *Frontiers in Physiology* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.796850> (2022).
58. Aird, K. M. & Zhang, R. Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). *Methods in Molecular Biology* **965**, 185–196 (2013).
59. Kumari, R. & Jat, P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol* **9**, 1–24 (2021).
60. Shtutman, M., Chang, B. D., Schools, G. P. & Broude, E. V. Cellular model of p21-induced senescence. *Methods in Molecular Biology* **1534**, 31–39 (2017).
61. Sikora, E. *et al.* Cellular Senescence in Brain Aging. *Frontiers in Aging Neuroscience* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.646924> (2021).
62. Kirschner, K., Rattanavirotkul, N., Quince, M. F. & Chandra, T. Functional heterogeneity in senescence. *Biochemical Society Transactions* vol. 48 765–773 Preprint at <https://doi.org/10.1042/BST20190109> (2020).
63. Basisty, N. *et al.* A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biol* **18**, (2020).
64. Coppé, J., Deprez, P., Krtolica, A. & Campisi, J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review Of Pathology: Mechanisms Of Disease* **5**, 99–118 (2010).
65. Birch, J. & Gil, J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. (2020) doi:10.1101/gad.343129.
66. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* vol. 186 243–278 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001> (2023).
67. Demaria, M. *et al.* An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* **31**, 722–733 (2014).
68. Nahid, M. A., Satoh, M. & Chan, E. K. L. MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cellular and Molecular Immunology* vol. 8 388–403 Preprint at <https://doi.org/10.1038/cmi.2011.26> (2011).
69. Biswas, S. K. & Lopez-Collazo, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in Immunology* vol. 30 475–487 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.07.009> (2009).
70. Medina-Tamayo, J., Ibarra-Sánchez, A., Padilla-Trejo, A. & González-Espinosa, C. IgE-dependent sensitization increases responsiveness to LPS but does not modify development of endotoxin tolerance in mast cells. *Inflammation Research* **60**, 19–27 (2011).

71. Feng, X., Li, L. & Zhifeng, Gu. Repeated lipopolysaccharide stimulation promotes cellular senescence in human dental pulp stem cells (DPSCs). *Cell and Tissue Research* **356**, 369–380 (2014).
72. Aquino-Martinez, R., Rowsey, J., Fraser, D., Monroe, D. & Farr, J. LPS-induced premature osteocyte senescence: Implications in inflammatory alveolar bone loss and periodontal disease pathogenesis. *Bone* **132**, 1–9 (2020).
73. Chang, O., Ae Jung, H., Sang, H. & June, M. Analysis of cellular senescence induced by lipopolysaccharide in pulmonary alveolar epithelial cells. *Arch Gerontol Geriatr* **54**, (2012).
74. Yu, H., Zhao, Y., Luo, X., Chen, S. & Wang, X. Repeated Lipopolysaccharide Stimulation Induces Cellular Senescence in BV2 Cells. *Neuroimmunomodulation* **19**, 131–136 (2012).
75. Wang, H. *et al.* BRD4 contributes to LPS-induced macrophage senescence and promotes progression of atherosclerosis-associated lipid uptake. *Aging* **12**, 9240–9259 (2020).
76. Mytych, J., Romerowicz-Misielak, M. & Koziorowski, M. Long-term culture with lipopolysaccharide induces dose-dependent cytostatic and cytotoxic effects in THP-1 monocytes. *Toxicology In Vitro* **42**, 1–9 (2017).
77. Lee, K. A., Flores, R. R., Jang, I. H., Saathoff, A. & Robbins, P. D. Immune Senescence, Immunosenescence and Aging. *Frontiers in Aging* vol. 3 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fragi.2022.900028> (2022).
78. Tsuboi, I. *et al.* Age-related decline of mast cell regeneration in senescence-accelerated mice (SAMP1) after chemical myeloablation due to senescent stromal cell impairment. *Exp Biol Med* **237**, 1289–1297 (2012).
79. Yang-lin, H., Wei, G., Hong-ying, L. & Jian, T. The Role of the Mast Cell in Skin Aging. *Journal of Dermatology Research and Therapy* **2**, (2016).
80. Oh, J. H. *et al.* Intrinsic aging- and photoaging-dependent level changes of glycosaminoglycans and their correlation with water content in human skin. *J Dermatol Sci* **62**, 192–201 (2011).
81. Kligman, L. H. & Murphy, G. F. *Ultraviolet B Radiation Increases Hairless Mouse Mast Cells in A Dose-Dependent Manner and Alters Distribution of UV-Induced Mast Cell Growth Factor.* *Photochemistry and Photobiology* vol. 63 (1996).
82. Pilkington, S. M., Barron, M. J., Watson, R. E. B., Griffiths, C. E. M. & Bulfone-Paus, S. Aged human skin accumulates mast cells with altered functionality that localize to macrophages and vasoactive intestinal peptide-positive nerve fibres. *British Journal of Dermatology* **180**, 849–858 (2019).

83. Elbasiony, E. *et al.* Increased activity of lacrimal gland mast cells are associated with corneal epitheliopathy in aged mice. *npj Aging* **9**, (2023).
84. Barkaway, A. *et al.* Age-related changes in the local milieu of inflamed tissues cause aberrant neutrophil trafficking and subsequent remote organ damage. *Immunity* **54**, 1494-1510.e7 (2021).
85. Meurer, S. K. *et al.* Isolation of mature (Peritoneum-Derived) mast cells and immature (Bone Marrow- Derived) mast cell precursors from mice. *PLoS One* **11**, (2016).
86. Valent, P. *et al.* Mast cells as a unique hematopoietic lineage and cell system: From Paul Ehrlich's visions to precision medicine concepts. *Theranostics* vol. 10 10743–10768 Preprint at <https://doi.org/10.7150/thno.46719> (2020).
87. Warnes, G. Separación de fases Quiescence-Senescence - Flow Cytometry Core Facility. *Institute of Cell and Molecular Science* (2019).
88. Camelia Botnar Laboratories. *Mitotic Cells and Cell Cycle Background*. https://www.ucl.ac.uk/child-health/sites/child_health/files/facilities-flowcyt-mitotic_cells_and_cell_cycle.pdf.
89. Cao, D. *et al.* Phorbol myristate acetate induces cellular senescence in rat microglia in vitro. *Int J Mol Med* **46**, 415–426 (2020).
90. González-Gualda, E., Baker, A. G., Fruk, L. & Muñoz-Espín, D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS Journal* **288**, 56–80 (2021).
91. de Mera-Rodríguez, J. A. *et al.* Is Senescence-Associated β -Galactosidase a Reliable in vivo Marker of Cellular Senescence During Embryonic Development? *Frontiers in Cell and Developmental Biology* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.623175> (2021).
92. Tümpel, S. & Rudolph, K. L. Quiescence: Good and Bad of Stem Cell Aging. *Trends in Cell Biology* vol. 29 672–685 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.05.002> (2019).
93. Sah, E. *et al.* The cellular senescence stress response in post-mitotic brain cells: Cell survival at the expense of tissue degeneration. *Life* vol. 11 1–25 Preprint at <https://doi.org/10.3390/life11030229> (2021).
94. Von Zglinicki, T., Wan, T. & Miwa, S. Senescence in Post-Mitotic Cells: A Driver of Aging? *Antioxidants and Redox Signaling* vol. 34 308–323 Preprint at <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8048> (2021).
95. Kandhaya-Pillai, R. *et al.* TNF- α /IFN- γ synergy amplifies senescence-associated inflammation and SARS-CoV-2 receptor expression via hyper-activated JAK/STAT1. *Aging Cell* **21**, (2022).

96. Cuollo, L., Antonangeli, F., Santoni, A. & Soriani, A. The senescence-associated secretory phenotype (Sasp) in the challenging future of cancer therapy and age-related diseases. *Biology* vol. 9 1–16 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biology9120485> (2020).
97. Anderson, R. *et al.* Length-independent telomere damage drives post-mitotic cardiomyocyte senescence. *EMBO J* **38**, (2019).
98. Chen, K. *et al.* Super-low Dose Endotoxin Pre-conditioning Exacerbates Sepsis Mortality. *EBioMedicine* **2**, 324–333 (2015).
99. Xiong, Y. & Medvedev, A. E. Induction of endotoxin tolerance in vivo inhibits activation of IRAK4 and increases negative regulators IRAK-M, SHIP-1, and A20. *J Leukoc Biol* **90**, 1141–1148 (2011).
100. Lee, S. & Helfman, D. M. Cytoplasmic p21Cip1 Is Involved in Ras-induced Inhibition of the ROCK/LIMK/Cofilin Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 1885–1891 (2004).
101. Chirino, Y. I., Sánchez-Pérez, Y., Osornio-Vargas, Á. R., Rosas, I. & García-Cuellar, C. M. Sampling and composition of airborne particulate matter (PM10) from two locations of Mexico City. *Data Brief* **4**, 353–356 (2015).