



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**“Modificaciones en la activación del receptor TLR4 durante
la senescencia de las células cebadas: participación de la
cinasa Lyn”**

T E S I S

Que presenta

Biól. Diana Laura Esparza Reyes

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directoras de tesis: Dra. Claudia González Espinosa
Dra. Iris Karina Madera Salcedo

Ciudad de México

Agosto 2024

Este proyecto se desarrolló en el Laboratorio 4 “Inflamación, Transducción de Señales y Senescencia” del del Centro de Investigación sobre el Envejecimiento y en el Departamento de Farmacobiología de la Sede Sur del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Claudia González Espinosa. Asimismo, diversos experimentos fueron desarrollados en el Laboratorio de Inmunopatología en el Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán, bajo la dirección de la Dra. Iris Karina Madera Salcedo.

El trabajo se realizó con el apoyo del Conahcyt a través de la beca de maestría número 1230115 (DLER), y el proyecto CF-2019-51488 (CGE).

AGRADECIMIENTOS

A La Dra. Claudia González Espinosa, por dejarme ser parte de su equipo de trabajo, por todas las pláticas y consejos para generar una ciencia de calidad además de la motivación para avanzar y aprender con una gran cálides humana.

A la Dra. Iris Karina Madera Salcedo por las enseñanzas en técnicas y análisis de datos de citometría de flujo, por la paciencia y la disposición de entrenamiento. Muchas gracias por las revisiones, las correcciones además enseñarme otras perspectivas y los consejos dentro del mundo de la ciencia.

Al Dr. Emilio Galván, por sus aportaciones, interés en el desarrollo de mi proyecto, los consejos y su guía en todo los procesos de maestría.

A la Dra. Perla Moreno Castilla por sus revisiones, atención y sus preguntas que me hacían abrir y estudiar ms acerca de este hermoso proyecto.

A M. C Alfredo Ibarra Sánchez, por su paciencia y su enseñanza detallada en cada técnica, las pláticas y las anécdotas que hacían disfrutar más aun mi fase experimental.

A Rodolfo Pérez Lagunes, por su apoyo técnico en el laboratorio, así como el cuidado de los ratones y su enorme disposición en ayudarme en todo lo posible.

A la Dra. Tzindilú Molina Muñoz, por su enseñanza en microscopia confocal, su paciencia y su enorme disposición de tener tiempo para analizar mis muestras.

A Shareny Freyffeldt Flores, por siempre estar a la disposición y encontrar la mejor solución ante cualquier situación que se me presento.

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

A el Lic. Víctor Mendoza, por su apoyo en la Biblioteca de Farmacobiología.

A mis compañeros y ahora amigos Alicia, Montse, Jesús, Eva, Frida, Julissa y Juan Pablo por las horas invertidas en pláticas sobre los proyectos, como avanzar y mejorar. Además de las pláticas y risas sobre platicas personales. (Mi team lab).

A mis amigas Fabiola, Sofia, Lorena, Yoseline, Karla y Susana que siempre están presente en cada paso que doy y tengo una parte de ellas. Gracias por decirme que puedo lograr cada meta que me propongo.

A mis hermanas Mónica, Sandra, Mariana y Sofía, a cada una por su apoyo y dejar que su hermanita mayor se alejara un poco de ustedes para cumplir sus objetivos.

A mis padres Adriana Reyes y Antonio Esparza, realmente me han dejado ser yo y apoyado en cada decisión que tomo, enseñarme mis principios y ser parte de lo que soy.

A mis primas que son como hermanas Fabiola, Monse y Mary, por divertirme en los días más oscuros y siempre están ahí a pesar de la distancia, decirme de lo que soy capaz y motivarme a alcanzar mis objetivos.

A mi prometido Fernando Rivas por estar conmigo desde el inicio de este proyecto, por motivarme cada día a no rendirme, ayudarme a que muchas cosas sean más sencillas, la paciencia por la distancia y demostrarme lo que es una admiración verdadera.

1.- ÍNDICE GENERAL

TABLA DE ABREVIATURAS -----	I
RESUMEN -----	II
ABSTRACT -----	III
1.-INTRODUCCIÓN.	
<u>1.1.- Células cebadas</u>	
1.1.1 Origen de las Células Cebadas-----	1
1.1.2 Papel de las CC en la respuesta inflamatoria -----	2
1.1.3 Secreción de mediadores inflamatorios -----	2
1.1.4 Migración de las células cebadas en la inflamación -----	3
<u>1.2 Receptores tipo Toll (TLR4)</u>	
1.2.1 Generalidades de los receptores tipo Toll -----	4
1.2.2 Señalización del TLR4 en CC por LPS -----	4
<u>1.3 Cinasa Lyn</u>	
1.3.1 Papel de la cinasa Lyn en la función de las CC -----	6
<u>1.4 Inflamación y sus cambios en el envejecimiento</u>	
1.4.1 Envejecimiento infamatorio (<i>inflammaging</i>)-----	7
1.4.2 El <i>inflammaging</i> como un marcador general del envejecimiento -----	8
<u>1.5 Senescencia</u>	
1.5.1 Marcadores de senescencia-----	10
1.5.2 Modelos para estudiar la senescencia de las células del sistema inmune innato - -----	13
<u>2. JUSTIFICACIÓN</u> -----	14
<u>3. HIPÓTEISIS</u> -----	14
<u>4. OBJETIVOS</u> -----	14
4.1 Objetivo general -----	14
4.2 Objetivos particulares -----	14
<u>5. DISEÑO EXPERIMENTAL</u> -----	15
<u>6. MATERIALES Y MÉTODOS</u> -----	17
6.1 Cultivos de BMMCs-----	17
6.2 Estímulos con LPS-----	17
6.3 Ensayos en la cámara de Boyden-----	17

6.4 PCR tiempo real	-----18
6.5 Western-Blot	-----19
6.6 LEGENPLEX por citometría de flujo	-----20
6.7 Citometría de flujo	-----21
6.8 Estadística	-----22
<u>7. RESULTADOS</u>	-----22
<u>8. DISCUSIÓN</u>	-----47
<u>9. CONCLUSIONES</u>	-----55
<u>10. PERSPECTIVAS</u>	-----56
<u>11. BIBLOGRAFRÍA</u>	-----56
<u>ANEXOS</u>	-----IV

Anexo I. Descripción de las principales citocinas y quimiocinas reguladoras de la inflamación y su participación en el envejecimiento inflamatorio.

Anexo II. Tablas de citocinas y quimiocinas proinflamatorias detectadas con el kit LEGENDPLEX

TABLA DE ABREVIATURAS

LPS: lipopolisacárido bacteriano

SRIt: Senescencia replicativa in vitro

SRlv: Senescencia replicativa in vivo

WT E: Cultivos de BMMCs de 5 semanas provenientes de médula ósea de ratones envejecidos

Lyn KO E: Cultivos de BMMCs de 5 semanas provenientes de médula ósea de ratones envejecidos Lyn KO

CC: Células cebadas.

BMMCs: Células cebadas derivadas de la médula ósea.

Ig: Inmunoglobulina

IgE: Inmunoglobulina E

PRRs; Receptores de reconocimiento de patrones. SASP: Fenotipo secretor asociado a senescencia.

CTMC: Células Cebadas de Tejido Convectivo

TLR: Receptores Tipo Toll

TA.: Temperatura Ambiente

ND: No detectable

IL-23: Interleucina 23

IL-1 α : Interleucina 1 α

IFN- γ : Interferon gamma

TNF- α : Factor de necrosis tumoral

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-10: Interleucina 10

IL-6: Interleucina 6

IL-27: Interleucina 27

IFN- β : Interferón beta

CXCL-1: Quimiocina de ligando 1

II RESUMEN

Las células cebadas (CC) son componentes clave del sistema inmune innato, ubicadas estratégicamente en la interfaz entre el huésped y el medio ambiente, y pueden perdurar durante períodos prolongados. Son responsables de regular la inflamación mediante la liberación de diversos mediadores, preformados o sintetizados de novo, a través de múltiples mecanismos celulares moleculares. Estas células reconocen patógenos por medio de los receptores de reconocimiento de patrones, como el receptor Toll like (TLR) 4, que identifica patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y a daño (DAMPs). El mecanismo más conocido de activación de este tipo celular es el entrecruzamiento del receptor de alta afinidad para la IgE (FcεRI), otro receptor que activa la secreción de mediadores es el receptor Toll-like (TLR4), siendo el lipopolisacárido bacteriano (LPS) un ligando ampliamente estudiado. Ambos mecanismos de activación desencadenan una vía de señalización que dependen o no de la fosforilación de proteínas mediada por quinasas de tirosina, como la cinasa Lyn, para la producción y secreción de citocinas inflamatorias. Sin embargo, el papel de las CC en condiciones de inflamación crónica, como el envejecimiento, aún no ha sido descrito. El envejecimiento se caracteriza por una inflamación crónica sistémica acompañada principalmente de senescencia celular, siendo ésta un estado celular que involucra el arresto del ciclo celular y un fenotipo secretor proinflamatorio asociado a la senescencia (SASP). Estudios recientes han sugerido al TLR4 como un factor importante en la regulación del proceso de senescencia. Con base en esto, el presente trabajo se centró en estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la senescencia de las CC y la relevancia de la vía de señalización del TLR4 dependiente de la cinasa Lyn en este proceso. Para ello, se implementaron dos modelos de senescencia celular, in vitro e in vivo, y se evaluaron los marcadores de senescencia (p21 y el SASP), así como la migración celular y la activación de NF-κB tras la activación del TLR4 (crucial en la señalización celular y la respuesta inmune). Esta investigación se centró en los mecanismos y moléculas que regulan la senescencia de las CC, analizando cambios en la respuesta del receptor TLR4 en CC senescentes y evaluando la participación de la cinasa Lyn en la aparición de marcadores de senescencia en modelos in vitro e in vivo. Para el modelo in vitro, se cultivaron células cebadas a partir de progenitores de la médula ósea (BMMCs) de ratones utilizaron cultivos de médula ósea de animales jóvenes (5-8 semanas de edad) durante 13 y 5 semanas, senescentes y no

senescentes respetivamente. Para el modelo in vivo, se emplearon cultivos de BMMCs de ratones envejecidos (35-60 semanas de edad) cultivados por 5 semanas. Para ambos modelos, se utilizaron ratones tipo silvestres (WT, C57BL/6J) y ratones carentes de la cinasa Lyn (Lyn KO) y para el modelo in vivo envejecidos (40-60 semanas) de las cepas C57BL/6J (WT) y Lyn KO (carentes de Lyn), clasificándolos como no senescentes o senescentes. Las CC fueron sensibilizadas con IgE monomérica y luego incubadas con H₂O MQ o LPS. Se analizaron la acumulación de RNAm para citocinas, la expresión de p21, la activación de NFκB, la expresión de TLR4 en superficie y la migración hacia el LPS. Los resultados mostraron que las BMMCs senescentes tanto in vitro como in vivo expresan los marcadores de senescencia, p21 y un SASP alterado (tanto a nivel de ARNm como de proteína) que los marcadores de senescencia se expresaron tanto in vitro como in vivo en células senescentes. La activación del TLR4 por el LPS en las células senescentes indujo un aumento en la producción de citocinas inflamatorias (ARNm y proteína), sin embargo, este no fue mayor al presentado por las células no senescentes. Al evaluar la función de Lyn se observó que regula negativamente la expresión de marcadores de senescencia como p21 y la producción de ARNm para de citocinas proinflamatorias involucradas en el SASP en las CC senescentes en CC en modelos de senescencia replicativa. Además, Lyn regula negativamente la señalización del receptor TLR4, incrementando la fosforilación de NFκB en CC senescentes. En conjunto, se concluyó que las CC senescentes presentan una respuesta alterada ante la activación del TLR4 y modifica las respuestas inducidas por TLR4. La cinasa Lyn promovió la expresión de marcadores de senescencia tanto *in vitro* como *in vivo*.

II ABSTRACT

Mast cells (MCs) are key components of the innate immune system, strategically located at the interface between the host and the environment, and they can persist for prolonged periods. They are responsible for regulating inflammation through the release of various mediators, preformed or synthesized *de novo*, via multiple molecular cellular mechanisms. These cells recognize pathogens through pattern recognition receptors such as Toll-like receptor 4 (TLR4), which identifies pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs). The activation of MCs by TLR4 is well known. The most recognized mechanism of activation for this cell type is the cross-linking of the high-affinity receptor for IgE (Fc ϵ RI). Another receptor that activates the secretion of mediators is TLR4, which responds to different PAMPs and DAMPs, with bacterial lipopolysaccharide (LPS) being a widely studied ligand. Both activation mechanisms trigger signaling pathways that depend on or are independent of protein phosphorylation mediated by tyrosine kinases, such as Lyn kinase, for the production and secretion of inflammatory cytokines. However, the role of MCs in chronic inflammation conditions, such as aging, has not yet been described. Aging is characterized by systemic chronic inflammation, mainly accompanied by cellular senescence, a cellular state that involves cell cycle arrest and a senescence-associated secretory phenotype (SASP). Recent studies have suggested TLR4 as an important factor in regulating the senescence process. Based on this, the present work focused on studying the molecular mechanisms involved in MC senescence and the relevance of the TLR4 signaling pathway dependent on Lyn kinase in this process. To this end, two cellular senescence models, *in vitro* and *in vivo*, were implemented, and senescence markers (p21 and SASP), as well as cell migration and NF- κ B activation after TLR4 activation (crucial in cellular signaling and immune response), were evaluated.

In the context of aging, cellular senescence is a process that involves permanent cell cycle arrest, characterized by the expression of markers such as the protein p21 and the lysosomal enzyme SA- β -galactosidase, as well as an altered secretory phenotype (SASP). For the *in vitro* model, mast cells were cultured from bone marrow progenitors (BMMCs) of mice, using bone marrow cultures from young animals (5-8 weeks of age) for 13 and 5 weeks, senescent and non-senescent respectively. For the *in vivo* model, BMMCs from aged mice (35-60 weeks of age) were cultured for 5 weeks. For both models, wild-type (WT, C57BL/6J) and Lyn kinase-deficient (Lyn KO) mice were used, and for the *in vivo* model, aged mice (40-60 weeks) from the C57BL/6J (WT) and Lyn KO (Lyn-deficient) strains were used, classifying them as non-senescent or senescent. MCs were sensitized with monomeric IgE and then incubated with MQ H₂O or LPS. The accumulation of mRNA for cytokines, the expression of p21, NF- κ B activation, surface TLR4 expression, and migration towards LPS were analyzed. The results showed that senescent BMMCs both *in vitro* and *in vivo* express senescence markers, p21, and an altered SASP (at both mRNA and protein levels). Senescence markers were expressed both *in vitro* and *in vivo* in senescent cells. TLR4 activation by LPS in senescent cells induced an increase in the production of inflammatory cytokines (mRNA and protein), although this was not higher than that presented by non-senescent cells. When evaluating the function of Lyn, it was observed that this kinase negatively regulates the expression of senescence markers such as p21 and the production of mRNA for pro-inflammatory cytokines involved in the SASP in senescent MCs in replicative senescence models. Additionally, Lyn negatively regulates TLR4 receptor signaling, increasing NF- κ B phosphorylation in senescent MCs. In summary, it was concluded that senescent MCs present an altered response to TLR4 activation and modify the responses induced by TLR4. Lyn kinase promoted the expression of senescence markers both *in vitro* and *in vivo*.

1.- MARCO TEÓRICO

1.1.- Células cebadas

1.1.1 Origen de las Células Cebadas

El origen de las células cebadas (CC) se remonta a momentos iniciales en la evolución del sistema inmunológico. Estas células se han conservado a lo largo de la escala filogenética, desde invertebrados hasta vertebrados, lo que sugiere una función fundamental en la defensa contra patógenos (Galli et al. 2010).

En los mamíferos, las CC aparecen temprano en el desarrollo embrionario, generándose en el saco vitelino. En el adulto, las CC se generan a partir de precursores de la médula ósea que salen a la circulación como precursores inmaduros que migran hacia los tejidos donde terminan su diferenciación bajo la influencia de mediadores producidos localmente (St John, 2023). Una vez en los tejidos residentes y de manera dependiente de algunos factores (como el SCF y la IL-3, así como la presencia de inmunoglobulina E (IgE) monomérica), desarrollan un citoplasma que puede contener hasta 1000 gránulos secretores que ocupan entre el 50 y el 70% del volumen citoplasmático (Blank, et al., 2014). Una vez maduras, las CCs tienen una vida media larga que puede variar desde varias semanas hasta un año en los roedores y puede ser de varios años en los humanos (hasta 24 años) (Chia, et al., 2023). En el ratón, de acuerdo con sus características histológicas, contenido granular y perfil transcripcional, las CC pueden dividirse en dos grandes clases: las de tejido conectivo (Connective Tissue Mast Cells, CTMC) y las de tejido mucosal (Mucosal Mast Cells, MMC). Las CTMC se localizan preferencialmente en la piel y el peritoneo, expresando algunos marcadores moleculares, como el receptor (Mas-Related G-protein Receptor B2, MRGPRB2), mientras que las MMCs están presentes en las mucosas respiratorias e intestinales y no expresan el MRGPRB2 (Tauber et al., 2023). Esta conexión directa entre el sitio anatómico donde residen y el fenotipo final que presentan, indica una gran especificidad en proceso de diferenciación y a su vez la gran plasticidad de estas células (Kitamura et al., 2007)

Las CC se distinguen de otros linajes de células inmunes por contener en su citoplasma gránulos secretores similares a lisosomas, que contienen numerosos mediadores proinflamatorios pre-sintetizados, como β -hexosaminidasa histamina, proteasas, heparina y algunas citocinas, como el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α). Las CC se encuentran ubicadas principalmente cerca de los vasos sanguíneos y son particularmente abundantes en regiones en contacto con el

ambiente externo, como las mucosas del tracto respiratorio y gástrico. Las CC realizan funciones de centinelas inmunológicas, debido a la gran variedad de receptores expresados en su membrana plasmática y su gran capacidad de producir mediadores. Entre los principales receptores que expresan las CC se encuentran aquellos que detectan distintos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) o a daño (DAMPs, damage-associated molecular patterns), así como complejos de IgE con antígenos (Ag) (Frossi, et al., 2017). Cuando ocurre un daño en los tejidos, las CC son reclutadas al sitio afectado y liberan mediadores que contribuyen a las distintas fases de la inflamación, incluyendo la angiogénesis y la fibrosis. Tras su activación, las CC regresan a su estado inactivo y re-sintetizan el contenido de sus gránulos (Iskarpatyoti, et al., 2022)

1.1.2 Papel de las CC en la respuesta inflamatoria

Las CC tienen como función principal controlar la inflamación en los tejidos, dado que la activación de distintos receptores lleva a la secreción de mediadores pre-formados y sintetizados *de novo* dependiendo del estímulo que se presente. Así, los PAMPs y DAMPs son reconocidos por receptores tipo Toll (TLR), mientras que los complejos IgE/Ag activan al receptor de alta afinidad para la IgE (Fc ϵ RI) (Frossi, et al., 2017). De manera particular, la activación del TLR4 lleva a la migración de las CC y a la secreción paulatina y prolongada de los mediadores inflamatorios por un mecanismo que requiere de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación del factor de transcripción NF κ B, mientras que la activación del Fc ϵ RI lleva a la exocitosis brusca del contenido granular mediante un proceso llamado desgranulación que ocurre gracias un incremento brusco en la concentración de calcio intracelular (revisado en Espinosa-Riquer, et al., 2020).

1.1.3 Secreción de mediadores inflamatorios

Las CC pueden liberar una amplia gama de mediadores, incluidos histamina, proteasas, factores de crecimiento y una variedad de citocinas. La liberación de estos mediadores puede ser rápida (desgranulación) o más lenta, dependiendo de si los mediadores son preformados o recién sintetizados (Galli et al., 2005).

1. Citocinas Proinflamatorias:

TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa): Una de las citocinas clave liberadas por los mastocitos, importante en la inflamación aguda y crónica. (Lobb, 1991.)

IL-1 (Interleucina 1): Promueve la inflamación y regula la respuesta inmunitaria.

IL-6 (Interleucina 6): Involucrada en la inflamación y la respuesta a infecciones (Burd et al., 1984.)

2. Citocinas Anti-Inflamatorias:

IL-10 (Interleucina 10): Contribuye a la resolución de la inflamación y tiene efectos inmunosupresores.(Nagata & Nishiyama, 2021).

3. Citocinas de Tipo 2:

IL-4 e IL-13 (Interleucinas 4 y 13): Implicadas en las respuestas alérgicas y en la regulación de la producción de inmunoglobulina E (IgE) (Lobb, 1991)

Además, se produce la secreción de mediadores lipídicos sintetizados de *novo*, incluidos los leucotrienos cisteinílicos (LT) y las prostaglandinas (PG), y la producción de una amplia variedad de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento con una cinética más prolongada (Krystal-Whittemore et al., 2016)

1.1.4 Migración de las células cebadas en la inflamación

La migración de las CC es un proceso fundamental en la coordinación de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas en tejidos específicos. Estas células exhiben una notable capacidad para percibir señales quimiotácticas y responder con migración dirigida, crucial para su reclutamiento en sitios de inflamación.

Las CC utilizan múltiples receptores de superficie que reconocen ligandos con potentes propiedades quimiotácticas. Entre estos, c-Kit, el receptor del factor de crecimiento de células madre (SCF), desempeña un papel clave (Chen et al., 2005). Además, el receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E (IgE) el Fc ϵ RI, se une a la IgE, son fundamentales en la quimiotaxis de las CC (Suzuki et al., 2014).El mediador lipídico esfingosina-1-fosfato (S1P) y su interacción con receptores acoplados a proteínas G (GPCR) es otro quimioatrayente de las CC (Hálová et al., 2013).

Los eicosanoides, incluyendo prostaglandinas y leucotrienos, surgen como quimioatrayentes que interactúan con varios GPCR. La extensa familia de quimiocinas, categorizada en CC, CXC, XC y CX3C, aumentan la migración de las CC mediante la activación de GPCR (Berenbaum et al., 2003). Las isoformas del factor de crecimiento transformante (TGF- β), son reconocidas por receptores específicos y sirven como amplificador en conjunto de quimioatrayentes que han sido detectados por las CC (Haque & Frischmeyer-Guerrero, 2022).

Las CC también contribuyen a su propia migración al producir quimioatrayentes tras la activación, estableciendo un bucle de retroalimentación positiva. Este mecanismo resulta en la acumulación de CC y otras células hematopoyéticas en sitios inflamatorios. El reconocimiento de quimioatrayentes inicia intrincados caminos de señalización dentro de las CC (Halova et al., 2012).

1.2 Receptores tipo TOLL (TLR4)

1.2.1 Generalidades del receptor TOLL

Los TLR son proteínas transmembranales de tipo I con ectodominios que contienen repeticiones ricas en leucina que median el reconocimiento de PAMP; dominios transmembranales; y dominios intracelulares del receptor de interleucina 1 (IL-1) (TIR) necesarios para la transducción de señales posteriores. Hasta ahora, se han identificado 10 y 12 TLR's funcionales en humanos y ratones, respectivamente, y TLR1-TLR9 se conservan en ambas especies (Kawai & Akira, 2010). Estudios en ratones deficientes en cada TLR han demostrado su función única en términos de reconocimiento de PAMPs y respuestas inmunes. Los PAMP reconocidos por los TLR incluyen lípidos, lipoproteínas, proteínas y ácidos nucleicos derivados de una amplia gama de microbios como bacterias, virus, parásitos y hongos (Abbas et al 2004.). El reconocimiento de los PAMPs por los TLRs se da en diferentes organelos celulares, dependiendo de la localización de cada TLR y de sus posibles ligandos. Así, los receptores TLR 3, 7, 8 y 9 son intracelulares y reconocen ácidos nucleicos, mientras que los receptores TLR 1, 2, 4, 5 y 6 se expresan en la membrana plasmática. La única excepción parece ser la del TLR4, que puede encontrarse en lisosomas o en la membrana celular. El TLR4 fue el primer receptor identificado, de la familia de TLR se identificó como el receptor que responde al lipopolisacárido bacteriano (LPS). La activación del TLR4 en las CC conecta diferentes vías en la transducción de señales de estas células, lo que permite la liberación de mediadores inflamatorios (Kawai et al., 2024)

1.2.2 Señalización del receptor TLR4 en CC por LPS

El LPS, un componente esencial de la membrana externa de las bacterias gram negativas ha sido objeto de extensas investigaciones debido a su impacto significativo en la interacción entre el huésped y los microorganismos. Esta molécula compleja consta de tres partes principales: el lípido A, el núcleo oligosacárido y el antígeno O. El lípido A, anclado en la membrana bacteriana, es la región responsable de la toxicidad del LPS. El núcleo oligosacárido, altamente variable

entre diferentes especies bacterianas, proporciona diversidad estructural. El antígeno O, expuesto en la superficie, contribuye a la variabilidad antigénica observada entre cepas bacterianas (Rietschel et al., 1971). Comprender esta estructura es crucial para analizar las interacciones del LPS con el sistema inmunológico del huésped. El LPS, también conocido como endotoxina, es un determinante clave de la patogenicidad bacteriana, la capacidad del LPS para desencadenar respuestas inflamatorias intensas en el huésped, contribuyendo a la virulencia bacteriana. La liberación del lípido A durante la lisis bacteriana puede activar la cascada de la coagulación y desencadenar respuestas proinflamatorias, lo que lleva a la sepsis y otros trastornos graves. La comprensión de estos mecanismos es esencial para abordar las implicaciones clínicas de la presencia del LPS en infecciones bacterianas.

La interacción del LPS con el receptor TLR4 desencadena respuestas proinflamatorias, como la producción de citocinas y la expresión de moléculas de adhesión. Estas respuestas son fundamentales para la eliminación eficiente de la infección bacteriana, pero la sobreestimulación del sistema puede llevar a respuestas patológicas. El estudio detallado de estas respuestas inmunitarias ha llevado al desarrollo de terapias dirigidas para modular la respuesta inflamatoria en condiciones patológicas asociadas con el LPS (Beutler et al., 2003).

La vía de señalización de TLR4 comprende la activación de la vía canónica dependiente de una molécula adaptadora llamada MyD88, así como vías independientes de ese adaptador (Kawai, et al., 2024). Cuando el TLR4 reconoce al LPS, sufre un cambio conformacional que ocasiona el reclutamiento de MyD88. Este complejo incorpora también a la cinasa IRAK 1/2, que activa a la cinasa TAK-1 a través de la ligasa de ubiquitinas TRAF-6. TAK-1 bifurca la señal del TLR4 hacia las MAPK (como p38 y JNK) o hacia la cinasa IKK. Las MAPK activan a factores de transcripción como AP-1, mientras que la cinasa IKK fosforila al inhibidor de NFκB permitiendo que ese factor se transloque al núcleo e inicie la síntesis de RNAm de distintas citocinas como el TNF-α (Kawai, et al., 2024). A tiempos largos, el TLR4 se internaliza y se acopla a otros adaptadores, como TRIF y TRAM, quienes, a través de algunos eventos intermedios, terminan por activar a los factores de transcripción de respuesta al interferón IRF, llevando a la síntesis de los RNAm de los interferones tipo β (IFN-β).

Aunque las principales cinasas descritas en los sistemas de señalización de los receptores Toll son cinasas de serina-treonina, también se han encontrado cinasas de tirosinas. La cinasa Lyn es una fosfotransferasa de la familia de Src que es activada de manera temprana tras la activación de los receptores TLR4 y FcεRI en las CC. De manera particular, una vez activado el

receptor TLR4, Lyn controla la activación de TRAF-6 y los eventos río abajo, como la fosforilación de TAK-1 y la translocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo (Ávila-Hernández, 2012).

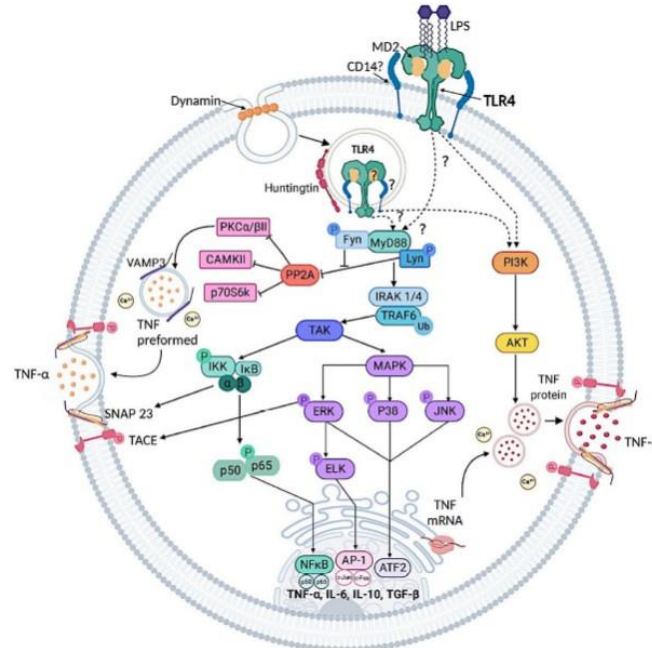


Figura 1. Vía de señalización del receptor TLR4 en respuesta al ligando LPS en la liberación de TNF α . La vía dependiente de MyD88 requiere de la participación de las cinasas Src, Fyn y Lyn. La cinasa Lyn participa en la activación de IRAK 1/4 esta activará la proteína TAK. TAK activará la vía de IKK llegando a la activación de NF κ B que se traslada al núcleo para contribuir a reacciones inflamatorias. Por otro lado, la activación TAK puede llevar a la activación de la vía de las MAPK cinasas llevando a diferentes vías de MAPKK (ERK, P38 y JNK), estas activarán a AP-1 Y ATF2 y contribuirán a reacciones inflamatorias. (Espinosa-Riquer, et al., 2020).

1.3 Cinasa Lyn

1.3.1 Papel de la cinasa Lyn en la función de las CC

La cinasa Lyn ha sido de particular interés desde hace mucho tiempo no solo debido a que es un controlador fundamental de la producción de mediadores inflamatorios por estímulos de la inmunidad innata y adaptativa en las CC, sino porque, además, controla negativamente la proliferación de las CC. La ausencia de Lyn en las CC ocasiona un incremento en la secreción de citocinas y la proliferación celular *in vitro*, ya que promueve las fases S y G2 del ciclo celular

en cultivos de CC derivadas de la médula ósea de ratones silvestres (Hernández-Hansen et al., 2004).

Se sabe que una de las características más distintivas (hallmarks) del envejecimiento es el incremento en la inflamación sistémica que se caracteriza por una hiperactividad (en ausencia aparente de estímulos inmunológicos) de las células que controlan la inflamación (revisado en Aiello et al., 2019). A este fenómeno se le conoce como “inflammaging” o envejecimiento inflamatorio. Estudios recientes han propuesto que ese proceso ocurre debido a la senescencia de las células inmunes y, en particular, a las células de la inmunidad innata.

Lyn modula la intensidad de la respuesta inflamatoria mediante diversos mecanismos. Por ejemplo, modula la actividad de la fosfatasa SHP-1, que inhibe la señalización de varios inmunoreceptores (Mkaddem et al., 2017). La cinasa Lyn es un elemento importante en el control de la intensidad de las reacciones inflamatorias en los tejidos y su papel en el desarrollo de patologías crónicas asociadas a la inflamación está siendo dilucidado (Brian, B.F. and Freedman 2021).

El papel la cinasa Lyn en el control de la inflamación, así como la gran capacidad de las CC para secretar mediadores inflamatorios en los tejidos donde residen por mucho tiempo, sugiere que esa cinasa podría tener un papel relevante en la fisiología de las CC durante el envejecimiento. Se ha descrito que en el proceso de envejecimiento se presenta un incremento en la inflamación sistémica que se caracteriza por una hiperactividad (en ausencia aparente de estímulos inmunológicos) de las células que controlan la inflamación (Aiello et al., 2019).

1.4 Inflamación y sus cambios en el envejecimiento

1.4.1 Envejecimiento infamatorio (*inflammaging*)

El envejecimiento es un estado fisiológico de los seres vivos caracterizado por el declive en las funciones biológicas. El envejecimiento del sistema inmunológico (inmunosenescencia) se caracteriza por una serie de cambios que van desde la baja producción de anticuerpos hasta el reconocimiento atípico de antígenos, pasando por un aumento en la inflamación (Franceschi et al., 2007).

Se ha acuñado el término de envejecimiento inflamatorio o “*inflammaging*” para definir un estado inflamatorio característico del envejecimiento asociado, probablemente a la exposición prolongada a diversos antígenos y condiciones ambientales (Franceschi, C., et al 2023). El sistema inmune en el estado de *inflammaging* produce cantidades elevadas de citocinas y

quimiocinas proinflamatorias, tales como IL-6, IL-8 e IL-15. Esto genera un estado inflamatorio prolongado y asintomático de bajo grado, lo que se relaciona directamente con el envejecimiento (Li,X., et al. 2023)

Durante el envejecimiento, se activan vías de señalización que estimulan al factor de transcripción NF-kB. Los efectos de NF-kB, en este contexto, están asociados con una disminución en la longevidad celular, la promoción de diferentes citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-6, e IL-1 β), la apoptosis y la proliferación celular. Por ello, la activación de NF-kB y sus efectos durante la inmunosenescencia se han considerado marcadores importantes en la identificación de células senescentes (Salminen et al., 2008).

1.4.2 El *inflammaging* como un marcador general del envejecimiento

Se han propuesto nueve características del envejecimiento biológico denominadas: primarias, antagonistas e integradoras, que involucran vías genéticas y bioquímicas que influyen colectivamente en las trayectorias de envejecimiento y la susceptibilidad a la patología (López-Otín et al., 2023). Los marcadores de éstas se han descrito como daños extrínsecos o intrínsecos durante el envejecimiento. Los daños intrínsecos son aquellos que suceden de diferentes mecanismos moleculares dentro de las células: inestabilidad genómica, acortamiento de telómeros, pérdida de proteostasis y alteraciones epigenéticas (Figura 2). La inestabilidad genómica, es la acumulación de daño genético durante la vida. La estabilidad del ADN se ve desafiada por agentes físicos y químicos, así como amenazas endógenas que incluyen errores de replicación del ADN. Los defectos en la inestabilidad del genoma pueden provocar síndromes de envejecimiento prematuro (Hoeijmakers, 2009). El daño mitocondrial es otro de los daños intrínsecos que pueden contribuir al envejecimiento debido al estrés oxidativo y la eficiencia limitada de los mecanismos de reparación (Worman, 2012).

El estrés intrínseco provoca pérdida de proteostasis (el plegamiento y síntesis adecuado de proteínas), la estabilidad de las proteínas correctamente plegadas y la degradación de las proteínas por el proteasoma o el lisosoma son fundamentales para un correcto funcionamiento celular (Powers et al., 2009).

Otro marcador del envejecimiento es la senescencia celular y el agotamiento de células troncales. El primero se ha propuesto como una respuesta compensatoria “beneficiosa” al daño que se vuelve perjudicial y acelera el envejecimiento; esto cuando algunos tejidos agotan su capacidad regenerativa y se incrementa la capacidad de respuesta inflamatoria que puede acelerar el envejecimiento. El agotamiento de las células troncales durante el envejecimiento se

debe a la reducción de hematopoyesis con la edad, lo que resulta en una disminución de células inmunológicas (Shaw et al., 2010). Además, éste emerge como un resultado combinado de diversos tipos de daños vinculados al envejecimiento. Investigaciones recientes indican que la revitalización mediante células madre tiene un potencial de revertir el fenotipo del envejecimiento a nivel del organismo (López-Otín et al., 2013).

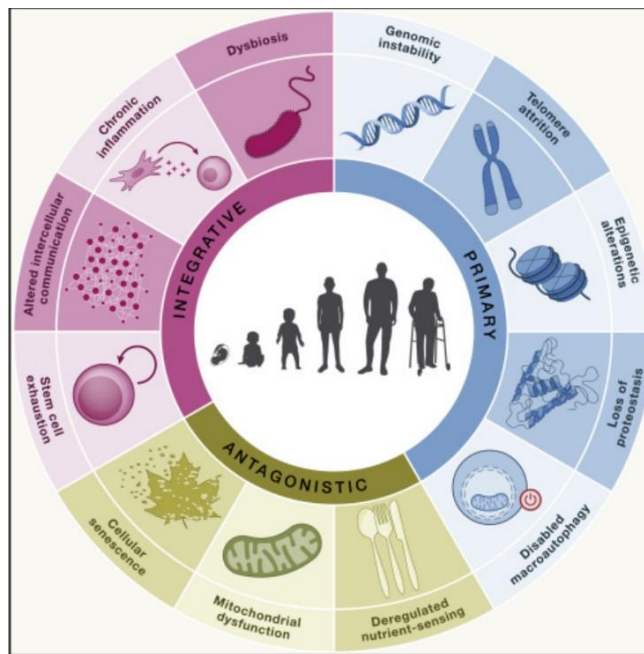


Figura 2.- Marcadores del envejecimiento, describe las características que determinan al envejecimiento, uno de ellos es la senescencia celular. (López-Otín et al., 2023)

1.5 Senescencia

La senescencia celular se define como el arresto del ciclo celular ante una respuesta al daño provocado por mutaciones en el DNA, disfunción mitocondrial, proteínas mal plegadas y otras alteraciones ocasionadas por errores en distintos procesos importantes para la fisiología de las células (Sati et al., 2020). La senescencia celular está caracterizada por la expresión de los llamados “marcadores de senescencia”, como las proteínas p21^{Cip/kip} y p16^{Ink4}, que son inhibidores de las ciclinas y ocasionan que el ciclo celular se detenga en la fase G1 sin pasar a las fases S, G2, y M (Hellmich et al., 2023). El desencadenamiento de la senescencia se considera un mecanismo protector que previene la proliferación de células dañadas y el potencial desarrollo de cáncer (Campisi, 2001). No obstante, este papel protector, a veces denominado el "lado bueno" de la senescencia, parece equilibrarse con un papel perjudicial en el envejecimiento, el "lado oscuro". Se ha observado que las células senescentes se acumulan con la edad (Campisi et al., 2007; van Deursen, 2014), y esto se ha asociado al deterioro de la función inmunológica, limitando la eliminación de estas células (Xue et al., 2007). A medida que el organismo envejece, se observa una acumulación de células senescentes en los tejidos (Tuttle et al., 2020). La eliminación de células senescentes en ratones envejecidos naturalmente ha demostrado prevenir el deterioro de órganos clave, lo que prolonga la duración de la vida de los animales (Baker et al., 2016).

1.5.1 Marcadores de senescencia

La senescencia celular está caracterizada por la expresión de los llamados “marcadores de senescencia” (Figura 3), tales como (López-Otín et al., 2023):

- Expresión de las proteínas p21^{Cip/kip} y p16^{Ink4}, que son inhibidores de las ciclinas y ocasionan que el ciclo se detenga en la fase G1 sin pasar a las fases S, G2, y M (Kreiss et al., 2016)
- Aumento en la síntesis de la β-galactosidasa (β-Gal) (Lee et al., 2006)
- Desarrollo de un fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) (Coppé et al., 2010)

El fenotipo SASP consiste en la secreción basal de citocinas pro-inflamatorias (como IL-6, IL-1 β , CXCL-1) y una desregulación en ese parámetro en respuesta a distintos estímulos inmunes (Cianflone et al., 2020). En esta definición se incluyen también aquellos mediadores que son secretados de manera excesiva en respuesta a estímulos inmunes de baja intensidad. Las citocinas más asociadas al SASP son IL-6, IL-1 β , CXCL-1, IL-1 α , IL-1 β y el TNF- α , aunque pueden variar dependiendo del tipo celular.

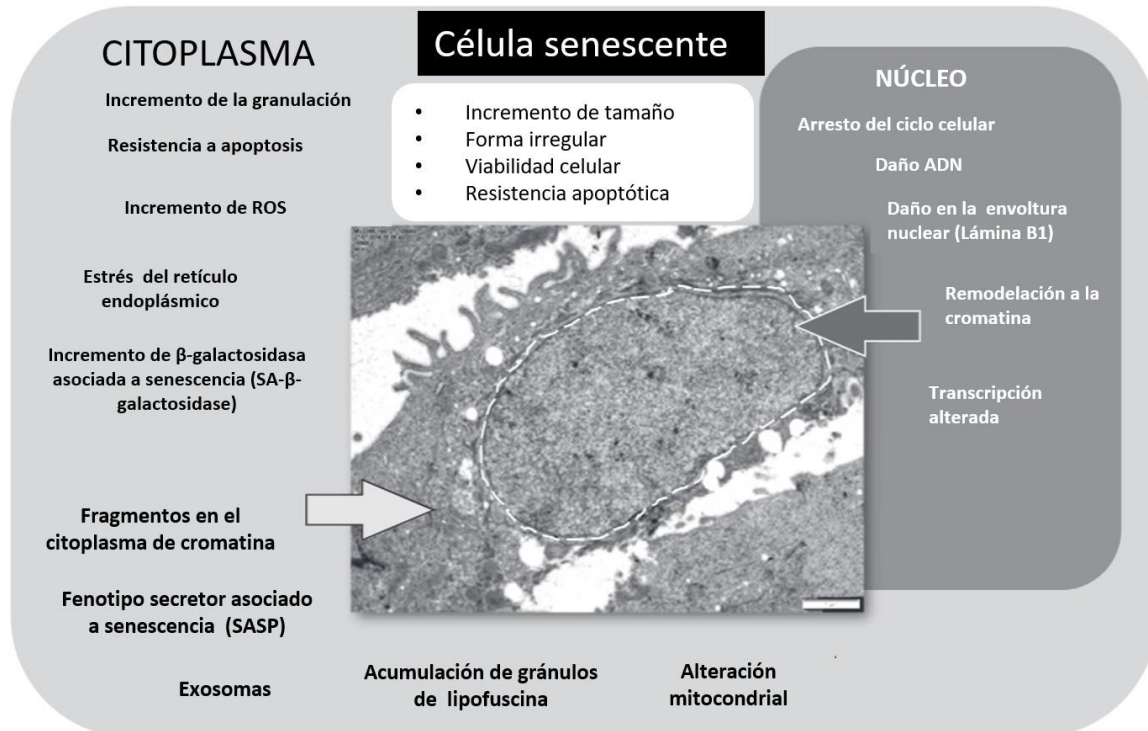


Figura 3.- Marcadores de una célula senescente, en ellos se diferencia los marcadores citoplasmáticos de los nucleares que llevan a determinar una célula senescente. El SASP es un marcador citoplasmático, este es el marcador más usado para determinar el fenotipo senescente Imagen modificada de (Myriantopoulos et al., 2019).

Para su estudio, la senescencia celular se clasifica dependiendo de su causa primaria. Se han descrito tres diferentes tipos de senescencia sin importar el tipo de células, pero sí el contexto en el que se estudia el proceso celular. La senescencia puede producirse 1) por estrés; 2) por replicación celular; y embriogénesis y 3) por expresión de oncogenes (Figura 4). Todos estos tipos de senescencia comparten el principio de la detención del ciclo celular y la expresión de diferentes marcadores nucleares y citoplasmáticos (López-Otín et al., 2023).

La senescencia replicativa (SR, *replicative senescence*) se define como aquella que ocurre conforme transcurren los ciclos de división celular. Este tipo de senescencia puede estudiarse en modelos *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, se sabe que los cultivos celulares que se mantienen en proliferación por tiempos prolongados expresan marcadores de senescencia después de cierto número de ciclos de división, dependiendo del tipo celular (valor llamado límite de Hayflick) (Hayflick 1965). Por otro lado, cuando diversas células son aisladas de individuos envejecidos, también presentan los marcadores de senescencia. Si bien los marcadores específicos (como los componentes del SASP) varían dependiendo de las células analizadas, es posible establecer la aparición de marcadores de senescencia en cultivos celulares jóvenes provenientes de individuos envejecidos (Ogrodnik, 2021).

La senescencia inducida por estrés (SIS) responde a diferentes daños causados por PAMPS, DAMPS, agentes que causen mutaciones al ADN (exposición de rayos UV) y estrés mitocondrial (peróxido de hidrógeno). Esta respuesta puede ser utilizada para desarrollar un fenotipo senescente de un tipo celular de interés, sirven como modelos de senescencia *in vitro* para el estudio de alguna patología relacionada con la edad, o el estudio de tumores malignos (Regulski MJ 2017). La senescencia celular embrionaria sucede en el momento que las células proliferan durante el desarrollo embrionario para dar a diferentes tejidos y órganos. La senescencia embrionaria es importante para detener la proliferación celular y que el desarrollo del embrión sea de acuerdo con su fisiología y anatomía correcta. En este caso la senescencia funciona como un proceso vital homeostático (Regulski MJ 2017).

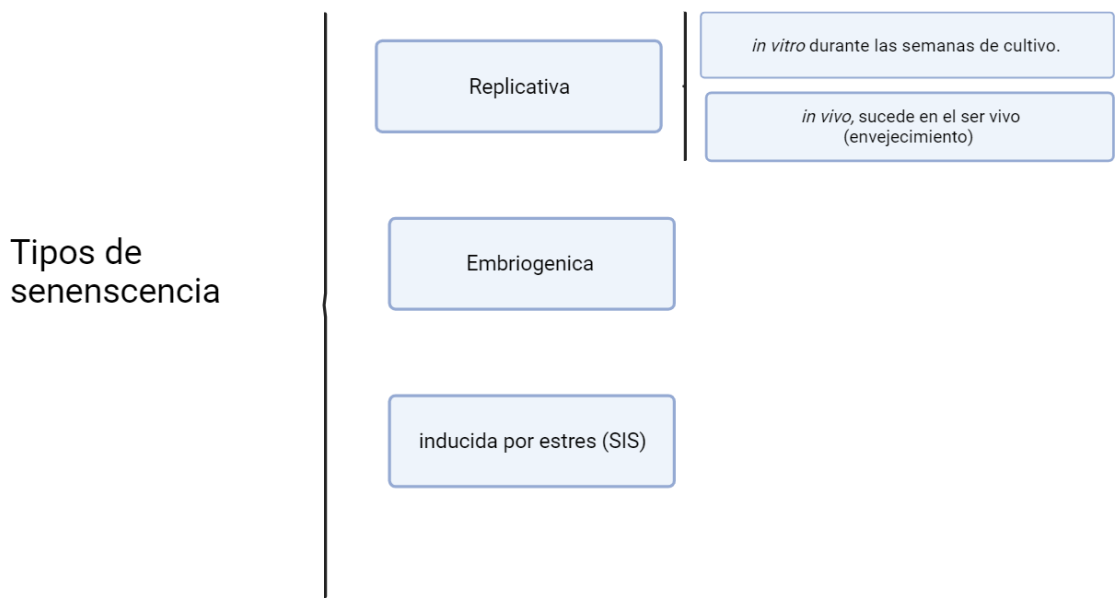


Figura 4.- Clasificación de acuerdo con el origen de la senescencia. La senescencia celular de acuerdo con el estímulo que provoca la senescencia, siendo la replicativa dividida en dos: *in vitro* son aquellas replications que suceden con las semanas de cultivos, *in vivo* aquellas replications que suceden de manera natural conforme van envejeciendo el ser vivo.

1.5.2 Modelos para estudiar la senescencia de las células del sistema inmune innato

Para el estudio de la senescencia de las células inmunes se han seguido dos aproximaciones principales: la primera consiste en obtener células de animales sanos y cultivarlas, estudiando cómo se alteran diferentes parámetros en su funcionamiento en respuesta al paso del tiempo o a la adición de mutágenos, la aplicación de radiación, etc. A este paradigma se le conoce como “modelo de senescencia *in vitro*”. Los cultivos celulares brindan un entorno controlado para investigar las características fenotípicas y genéticas asociadas con las células senescentes.

Por otro lado, se han explorado modelos de envejecimiento celular *in vivo*, en el cual se permite el envejecimiento de los individuos experimentales (en el ratón suele ser de 35 a 80 semanas) antes de extraer las células (naturalmente senescentes) y cultivarlas tiempos cortos, para llevar a cabo análisis exhaustivos (Prieto et al., 2020). Este enfoque proporciona una perspectiva más integral, al considerar el proceso de envejecimiento en el contexto fisiológico completo del organismo (Hellmich et al., 2023).

Debido a la importancia del envejecimiento inflamatorio en la aparición de múltiples padecimientos crónico-degenerativos asociados con la edad, los estudios sobre la senescencia de células del sistema inmune innato son necesarios para entender aquellos mecanismos y moléculas involucradas en la pérdida paulatina del control de la síntesis de citocinas y otros mediadores inflamatorios. De manera particular, no se sabe si la senescencia replicativa (*in vitro* o *in vivo*) altera la respuesta de las CC hacia los estímulos de la inmunidad innata que actúan a través del receptor TLR4. Asimismo, se desconoce el papel que la cinasa Lyn pudiera tener en la expresión de los marcadores de senescencia y en el desarrollo del SASP en ese tipo celular.

2. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que se sabe que las CC tienen una vida media larga dentro de los tejidos donde residen, y de su importancia en el control de la inflamación desencadenada por PAMPs y DAMPs, se desconocen los mecanismos y moléculas que controlan la senescencia de este tipo celular. En el presente estudio se pretende caracterizar los cambios que la senescencia celular ocasiona en respuesta del receptor TLR4 en las CC y evaluar la posible participación de la cinasa Lyn en la aparición de marcadores de senescencia en modelos de senescencia *in vitro* e *in vivo*.

3. HIPÓTESIS

El proceso de senescencia de las células cebadas ocasiona modificaciones en las respuestas inducidas por la activación del receptor TLR4.

La cinasa Lyn contribuye a la expresión de marcadores de senescencia en células cebadas en modelos de senescencia *in vivo* e *in vitro*.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios de la respuesta a la estimulación del receptor TLR4 durante la senescencia de las CC y determinar la participación de la cinasa Lyn en la expresión de marcadores de senescencia en las CC en modelos *in vivo* e *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar las diferencias en la expresión de marcadores de senescencia, en modelos de senescencia replicativa *in vitro* e *in vivo* de células cebadas.
2. Analizar los cambios que la senescencia replicativa (*in vitro* e *in vivo*) provoca en el sistema de señalización del receptor TLR4 en células cebadas.
3. Definir el papel de la cinasa Lyn en la expresión de marcadores de senescencia en las CC en modelos de senescencia replicativa *in vitro* e *in vivo*.

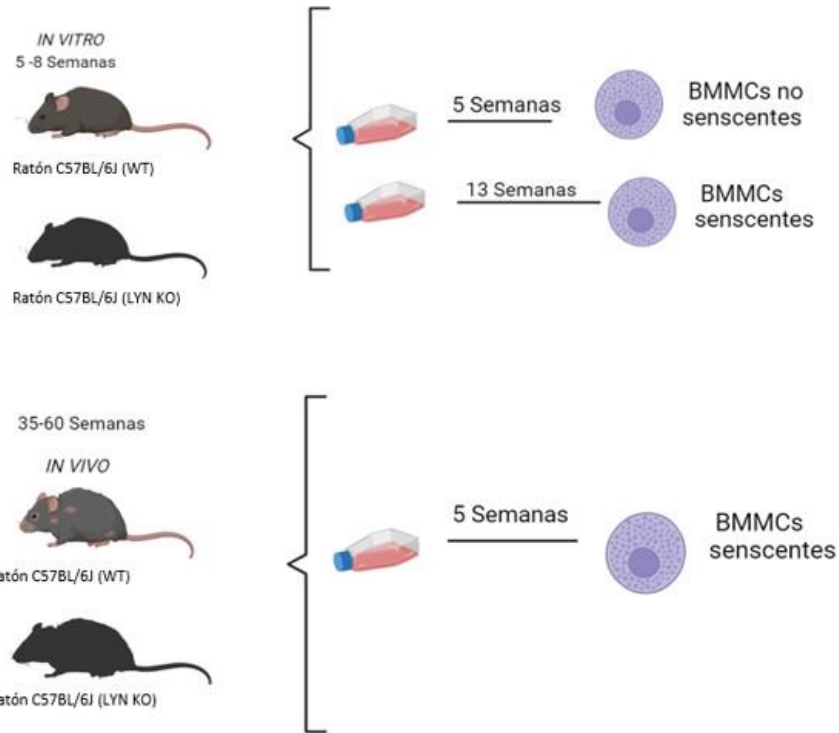
4. Analizar el papel de la cinasa Lyn en los cambios que la senescencia induce en el sistema de señalización del receptor TLR4 en las células cebadas con senescencia replicativa *in vitro* e *in vivo*.

5. Analizar el papel de la cinasa Lyn en la migración hacia al LPS en las células cebadas con senescencia replicativa *in vitro* e *in vivo*.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para alcanzar los objetivos, se utilizaron dos modelos de senescencia (*in vitro* e *in vivo*). Para el modelo de senescencia *in vitro*, se generaron CC maduras en cultivos de médula ósea de animales jóvenes (6-8 semanas de edad) de las cepas C57BL/6J (WT) y de una cepa carente de la cinasa Lyn (Lyn KO). Los cultivos se cultivaron durante 5-8 semanas (cultivos no senescentes) y durante 11-13 semanas (cultivos senescentes) (Figura 5). Para el modelo de senescencia *in vivo*, se generaron cultivos de médula ósea proveniente de animales envejecidos (40-60 semanas de edad) y se cultivaron durante 5-8 semanas.

Cuando los cultivos alcanzaron las edades mencionadas, se tomaron células y se sensibilizaron con IgE monomérica durante 18-24 horas. Posteriormente, se incubaron en presencia de H₂O MQ (vehículo) o LPS (a distintas concentraciones) a tiempos óptimos para medir varios parámetros de su activación, a saber: 1) la migración hacia el LPS; 2) la acumulación de los RNAm para distintas citocinas; 3) a secreción de algunas citocinas que constituyen el SASP; 4) la expresión de la proteína p21; 5) la activación del factor de transcripción NFκB; y 6) la expresión del receptor TLR4.



DETERMINACIONES

Sensibilización IgE monomérica
100ng/ml

Tratamiento con LPS



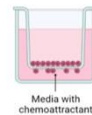
SASP RT-PCR
mRNA IL-6, IL-1 β y CXCL-1



Western Blot
P21 y p-p65



Quimiotaxis



SASP KIT
LEGENDplex.
IL-6, IL-1 β y
CXCL-1



Citometría para LTR4

Figura 5. Diseño experimental. Se muestra los dos modelos de senescencia *in vitro*, cada uno con sus respectivos grupos de cepas C51BL/6J J y Lyn $-/-$ KO. Modelo *in vitro* BMMC provenientes de cepas jóvenes de (6-8 semanas), modelo *in vivo* proveniente de cepas envejecidas (40 – 60 semanas). Sensibilización con IgE 100ng/ml, tratamiento con LPS diferentes concentraciones, se muestra las determinaciones a realizar RT-qPCR, quimiotaxis (migración) Western Blot y ELISA.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivos de BMMCs

Se obtuvo la medula ósea de la tibia y fémur de ratones C57BL/6J (WT) y *Lyn*^{-/-} (Lyn KO) de 4 a 8 semanas de edad (ratones jóvenes) y de 35- 60 semanas (animales envejecidos). Se cultivó en medio RPMI suplementado con 2 mM de L-glutamina, 0.1mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato de sodio, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 55 µM de 2-mercaptoetanol, 1 mM de HEPES, 10% suero fetal bovino (SFB) y 20 ng/ml de IL-3 murina. El medio de cultivo se cambió cada semana y los cultivos se consideraron maduros después de la quinta semana, cuando más del 90% de las células expresaban el receptor FcεRI (determinado por citometría de flujo). El medio se cambió cada semana mientras las células eran utilizadas.

6.2 Estimulación con LPS

Dos millones de BMMCs se incubaron con LPS (100 ng/mL, LPS+) para las técnicas de Western Blot, qRT-PCR, citometría de flujo y LEGENDplex, ó con vehículo (control, LPS-). De manera particular, para la técnica de migración se utilizaron 10 ng/mL de LPS. Las estimulaciones celulares se llevaron a cabo en tubos de 1.5 mL para cada grupo experimental: WT y Lyn KO senescentes de ambos modelos, el de senescencia *in vitro* y el de senescencia *in vivo*.

6.3 Ensayo en la cámara de Boyden

Para cada condición en donde se evaluó la migración se utilizaron 2x10⁶ de BMMCs, las cuales fueron sensibilizadas con IgE 100 ng/mL 24 horas antes. Se utilizó una cámara de Boyden de 48 pozos (Neuro Probe, Gaithersburg, MD), con filtros de policarbonato de 25x80 mm con poros de 8µm. Los filtros se cubrieron con gelatina bovina (Sigma-Aldrich) al 2% (0.2 g de gelatina en 10 mL de agua MilliQ incubada a 37°C) durante 2 horas y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las células se lavaron del medio RPMI con PBS 1X en dos ocasiones con centrifugaciones de 1200 RPM por cinco minutos, posteriormente se trataron con calceína-AM (1 ng/mL) por 1 hora a 37°C en condiciones de oscuridad. Transcurrido ese tiempo se lavaron tres veces más con PBS 1X. Posteriormente, las células fueron re-suspendidas en 1 mL de medio de migración (1.64 g de medio RPMI sin suplementar para 100 mL finales, 80 mL de agua bidestilada y desionizada, 0.2% de NaHCO₃). Los pozos de la cámara inferior fueron llenados con un volumen de 28 µL de diferentes soluciones (quimioatrayentes o no, según fue el caso). Para el control positivo se colocó esfingosina 1-fosfato (S1P). Como control negativo de la migración con LPS, se utilizó el

vehículo donde éste fue disuelto (H₂O mQ). Para los pozos problema se colocó LPS 100 ng/mL. Como segundo control negativo se colocó medio de migración. Una vez cargados los pozos inferiores, se colocó la membrana gelatinizada, evitando generar burbujas de aire y se procedió a cargar los pozos superiores, colocando 50 µL de la suspensión de las BMMCs en cada pozo de BMMCs. La cámara se incubó durante 3 horas a 37°C y 5% CO₂. Concluido ese tiempo la membrana se fijó con metanol durante 15 minutos y, una vez seca, se colocó en un portaobjetos electrocargado y fue analizada en el microscopio confocal con el objetivo 20X. La cuantificación de células por campo se realizó en cuatro campos diferentes tomados al azar con ayuda del software ImageJ (Java, 2019) y se realizó un promedio de las células observadas.

6.4 PCR tiempo real

Para estudiar los efectos de la senescencia sobre la acumulación del RNAm de citocinas que son parte de SASP, se aisló RNA total de células tratadas o no con LPS (100 ng/mL) por una hora. Posteriormente, se sintetizó el cDNA y se analizó la síntesis de diferentes citocinas: IL-6, IL-1β y CXCL1.

Para sintetizar el cDNA se utilizó un kit comercial (Thermo Fisher Scientific). Se preparó una reacción inicial que contenía 1 µL de oligo(dT), 1 µg de RNA y se aforó con agua estéril tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) hasta obtener 12 µL. La mezcla se centrifugó brevemente y se incubó a 65°C por 5 minutos. Terminada la incubación se preparó otra reacción que contenía 4 µL de 5X Buffer de reacción, 1 µL de RiboLock RNase inhibitor (20 u/µL), 2 µL del mix de dNTP 10 nM, 1µL de RevetAid Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µL) para un volumen total de 20 µL, el cual se añadió a la reacción previa. Esta reacción fue incubada a 42°C durante 60 minutos. Posterior a esta incubación se detuvo la reacción mediante una incubación a 70°C durante 10 minutos. Finalmente, se añadieron 130 µL de H₂O tratada con DEPC para obtener un volumen final de 150 µL del templado.

Para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Thermo Fisher Scientific), cada reacción de PCR se realizó por triplicado, (*IL-6*, *IL-1β* y *CXCL-1*, *GAPDH*) utilizando 300 ng de cDNA purificado (3 µL), 0.5 µM de cada oligonucleótido (sentido y anti-sentido) y 5 µL de Máxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific), en un volumen final de 10 µL. Las muestras se colocaron en Rotor-Gene Q en una amplificación de 60 ciclos, los datos se analizaron con el valor de C_q, se utilizó para calcular la expresión relativa de cada gen con la fórmula de la 2^{-ΔΔC_q} usando como gen control expresión de la GAPDH.

6.5 Western Blot

En todos los experimentos, 4×10^6 BMMCs por condición fueron sensibilizadas con IgE 100ng/mL por 24 horas. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a temperatura ambiente a 1200 RPM por 5 minutos, el medio fue decantado y las células re-suspendidas en 2 mL de Buffer Tyrodes BSA (20mM HEPES pH7.4, 135mM NaCl, 5mM KCl, 1.8 mM de CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5.6 mM glucosa, 0.05% albúmina bovina BSA).

Para determinar el marcador de senescencia se midió la expresión de proteína total de P21 y para ver la vía de señalización del TLR4 se midió la fosforilación de p65. Las BMMCs tuvieron incubaciones a 37°C de una hora con LPS. Se utilizaron diferentes condiciones que abarcaron: LPS 0 ng/mL con vehículo H_2O mQ y LPS (100ng/mL).

El *Western-Blot* se realizó utilizando un gel de acrilamida- SDS al 10%, 12% o 16%. Por lo general, el gel revolvedor fue preparado mezclando 6.14 mL de agua desionizada, 5 mL de 30% de acrilamida/Bis, 3.76 mL de 1.5M Tris-HCl pH 8.8, 150 μL de 10% SDS y 50 μL de persulfato de amonio, APS, al 10%). La concentración de la mezcla de acrilamida/bisacrilamida varió dependiendo de la concentración final del gel resolvidor. El gel concentrador fue preparado mezclando 1.425 mL de agua bidestilada, 425 μL de 30% de acrilamida/Bis, 625 μL de 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 25 μL de 10% SDS y 12.5 μL de 10% de APS).

Los tubos con los extractos fueron puestos en baño María a punto de ebullición por 2 minutos, se centrifugaron las muestras y se cargaron en el gel. De todas las muestras se cargó un total de 35 μL . El gel corrió a 110V por un total de 3:00 horas. Posteriormente el gel se transfirió a una membrana de PVDF (PerkinElmer, Polyscreen NEF1002001PK) utilizando una cámara de transferencia semi-húmeda a 20V por 50 minutos por gel. Al finalizar la transferencia, la membrana se bloqueó durante 1 hora BSA al 4% en Tris adicionado con 0.1% de Tween (TBS-T). La membrana fue lavada e incubada con el anticuerpo específico de cada experimento (p-P65 1:5,000 y P21 1:3000) toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados a la membrana con TBS-Tween 1X de 10 minutos para p-P65 y cuatro lavados de 15 min para P21. Se incubó con el anticuerpo secundario anti-Rabbit HRP para p-P65 (1:10000) ó anti-Mouse HRP para p21 (1:15,000) por una hora. Después de ese tiempo, nuevamente se realizaron cinco lavados de 10 minutos para p-P65 y cuatro lavados de 30 minutos para P21 y se continuó con la detección de la proteína utilizando soluciones para la reacción de quimioluminiscencia (BM Chemiluminiscense Western Blotting Mouse/Rabbit de Roche #1152070901). Las membranas

fueron expuestas al chemidoc. La cuantificación de las bandas (blots), se realizó por el software de ImgeJ.

6.6 LEGENPLEX por citometría de flujo

Para estudiar las citocinas y quimiocinas que forman parte del SASP, se colectaron sobrenadantes de cada grupo experimental y se utilizó un kit LEGENplex para citocinas y quimiocinas. No de catálogo (B340961) (B354629) respectivamente detectadas por medio de citometría de flujo.

Para la obtención de sobrenadantes. Se sensibilizaron 2×10^6 BMDCs con IgE 100ng/mL por condición 24 horas. Posteriormente, las células se lavaron, se re suspendieron en 0.5 mL de medio de cultivo RPMI suplementado y se estimularon con LPS (100 ng/mL) o con vehículo durante 2 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugaron las muestras en frío a 4°C a 15.000 RPM, y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante se guardó a -80 °C hasta su uso.

Para reconstituir el coctel de citocinas y quimiocinas proinflamatorias de ratón liofilizadas, se agregó 250 µl de buffer de ensayo, posteriormente se mezcló a temperatura ambiente por 10 minutos, este vial fue el stock de la curva estándar. Se realizó en tubos de microcentrífuga 1.5 mL de C7-C0, en el tubo C7 colocó 12.5 µl del stock de la curva estándar, a cada uno de los tubos subsecuentes con diluciones seriadas (C6, C5, C4, C3, C2, C1 y C0), luego se añadió 16 µl de buffer de ensayo. Se preparó una dilución 1:5 a partir del tubo C7. Del tubo C7 se transfirió 4 µl al tubo C6 y mezcló, así consecutivamente hasta llegar a C1.

Los reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente (20°C – 25°C) antes de usar. En la placa se añadió 12.5 µl buffer de ensayo en todos los pozos de la placa que fueron utilizados. El primer pozo (C0) fue el inicio de la curva estándar (en este pozo solo se colocó 12.5 µl buffer de ensayo) se continuó con C1, se colocó 12.5 µl del tubo de microcentrífuga C1 previamente preparado (curva estándar), y se continuó así de forma seriada para C2, C3, C4, C5, C6, colocando de cada tubo 12.5 µl hasta llegar a C7. En los siguientes pozos se añadió 25 µl de muestra y 12.5 µl del mix de perlas en cada pozo de la placa (curva estándar y muestras) el volumen final de los pozos fue 37.5 para los pozos de la curva estándar y 50 µl para los pozos donde se agregó muestra. Nota: durante la adición de las perlas, se mezcló el bote de las perlas intermitentemente para evitar que se precipitaran. Se centrifugaron a temperatura ambiente 1050 rpm o 250g por 5

minutos. La placa se selló y cubrió con papel de aluminio y dejó en agitación a 200 rpm en un agitador de placas durante 2 horas a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó la placa a 1050 rpm durante 5 minutos y luego se desechó el sobrenadante. Se lavó la placa con 200 μ l Wash buffer 1x temperatura ambiente, se centrifugó la placa a 1050 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Se agregó 12 μ l de anticuerpo de detección a cada pozo y se mantuvo, la placa en constante agitación 200 rpm en un agitador de placas durante 1 hora a temperatura ambiente protegida de la luz. Sin lavar la placa, se agregó SA-PE a cada pocillo, se selló la placa y se envolvió en papel de aluminio y se dejó en agitación durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó la placa y se retiró el sobrenadante. Se re suspendió con 150 μ l de Wash buffer cada pozo. En un citómetro de flujo NovoCyte Quanteon se leyeron las muestras en aproximadamente 4000 eventos en 100 μ l de muestras. Los datos se analizaron el Software LEGENplex.

6.7 Citometría de flujo

Se centrifugaron 2×10^6 de BMBCs durante 5 minutos a 1200 rpm a 4°C, se lavaron con 1 mL de FACS buffer (PBS suplementado con 2% de suero bovino fetal (FBS) y 0.1% de azida sódica), y se re suspendieron en 250 μ l de FACS buffer para cada condición (sin LPS y con 100 ng/mL de LPS previamente incubadas durante 1 hora). Para determinar la viabilidad celular, se añadieron 100 μ l de Ghost -R780 a cada muestra y se dejaron incubar durante 10 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con 100 μ l de FACS buffer y se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm a 4°C. Posteriormente, las BMBCs se incubaron con 50 μ l de buffer de bloqueo (PBS con 1% de BSA) durante 10 minutos a 4°C para reducir la unión inespecífica de anticuerpos, con la adición de 0.5 μ l de Fcblock (1:100). Se agregaron anticuerpos Anti-mouse (eBioscience) acoplados a fluorocromos específicos para los receptores a detectar: TLR4-PE (1:100) y FcRI-APC (1:1000), y se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. Se utilizaron controles de compensación para cada fluorocromo: PE-, APC- y APC_Cy7- además controles experimentales FMO para cada condición y fluorocromo a evaluar. Todas las tinciones e inmunotinciones se realizaron a temperatura ambiente. La lectura se realizó en el NovoCyte Quanteon Flow Cytometer Systems (4 Lasers, marca Agilent). Los datos fueron analizados con el software FlowJo.

6.8 Estadística

Se utilizó el paquete GraphPad Prism v9, considerando una $p \leq 0.05$ estadísticamente significativa. Los datos se representan con la media \pm error estándar (SEM). Para el análisis comparativo entre 2 grupos se empleó ANOVA de dos vías, para ver diferencias significativas entre los grupos se realizó una prueba post hoc TUKEY y SIDAK

7.- RESULTADOS

Los marcadores de senescencia en las células cebadas están presentes en modelos *in vitro* e *in vivo* de senescencia replicativa

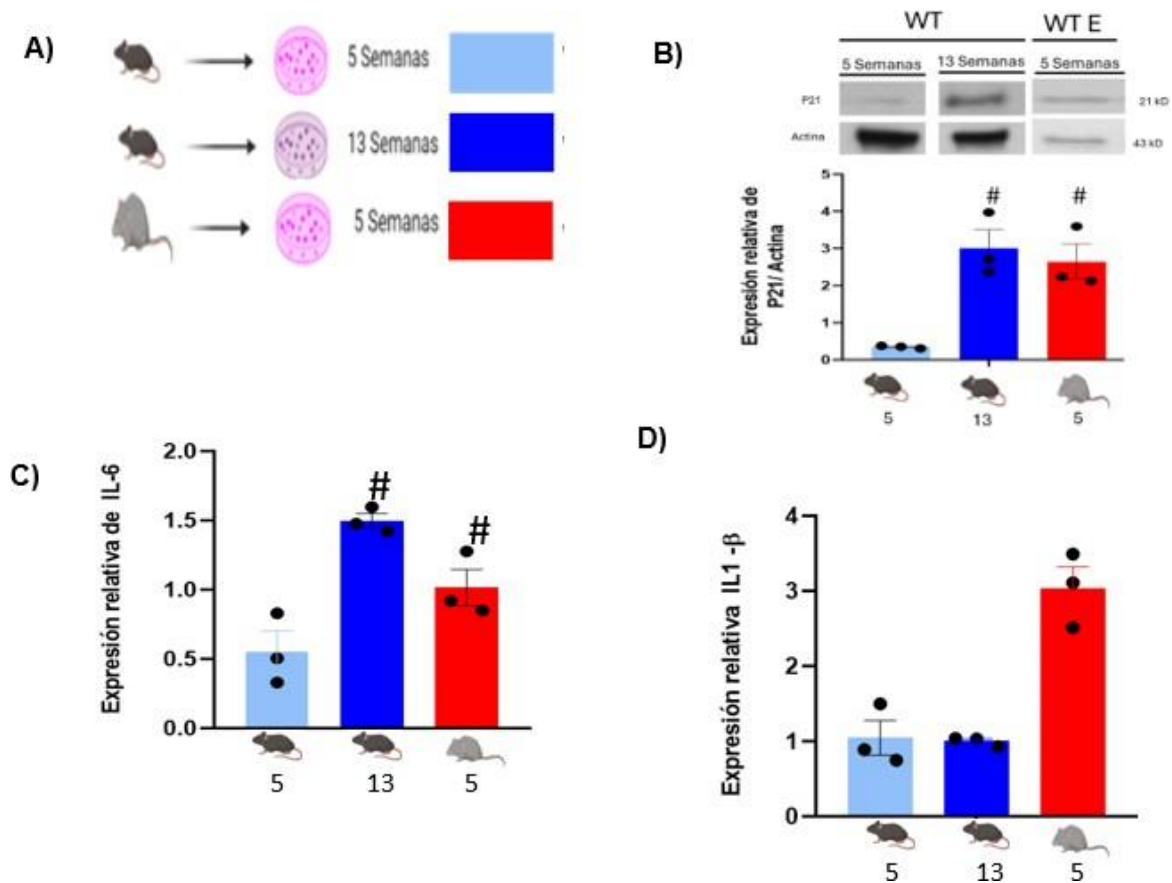
Para analizar la expresión de marcadores de senescencia en las CC, se utilizaron dos modelos de senescencia replicativa. En el primero de ellos (senescencia replicativa *in vitro*), se obtuvieron progenitores de médula ósea de ratones jóvenes (5 semanas de edad) y se mantuvieron en cultivo durante 13 semanas en presencia de IL-3, para obtener células cebadas derivadas de la médula ósea (BMMCs) envejecidas debido a múltiples divisiones *in vitro*. En el segundo (senescencia replicativa *in vivo*), las BMMCs fueron obtenidas a partir de médula ósea de ratones envejecidos (35-65 semanas) y cultivados solamente por 5 semanas, tiempo en el cual las BMMCs alcanzan su punto máximo de maduración. En ambos modelos se determinó la expresión de dos marcadores característicos de la senescencia, a saber, la proteína reguladora del ciclo celular p21 y el perfil de citocinas asociadas al (SASP). Como control negativo interno, se utilizaron cultivos de 5 semanas generados a partir de ratones jóvenes (Figura 6 A). Como se observa en la Figura 6 B, los niveles de proteína de p21 aumentan en cultivos de 13 semanas, en comparación con los cultivos de 5 semanas, indicando que este marcador de senescencia puede observarse en el modelo de senescencia replicativa *in vitro*. Al evaluar el cultivo del modelo de senescencia *in vivo*, se encontró que las células presentaban altos niveles de p21, a niveles semejantes a los observados en el modelo *in vitro* (Figura 6 B). Estos datos indican que ambos modelos de senescencia permiten observar la aparición del marcador p21.

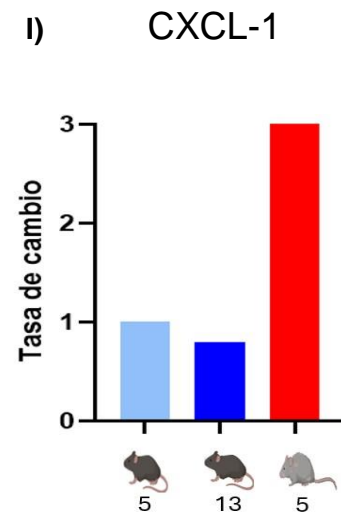
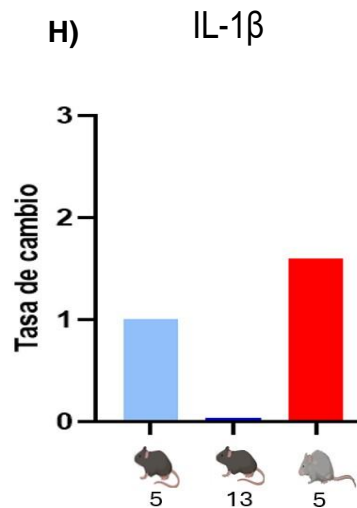
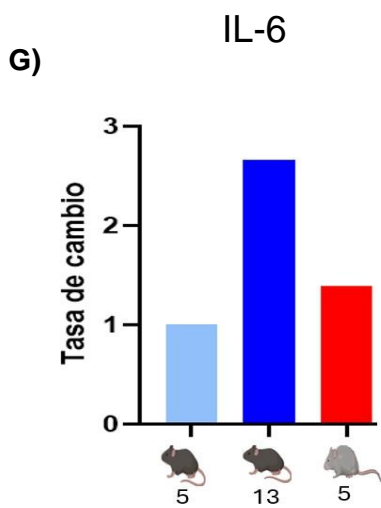
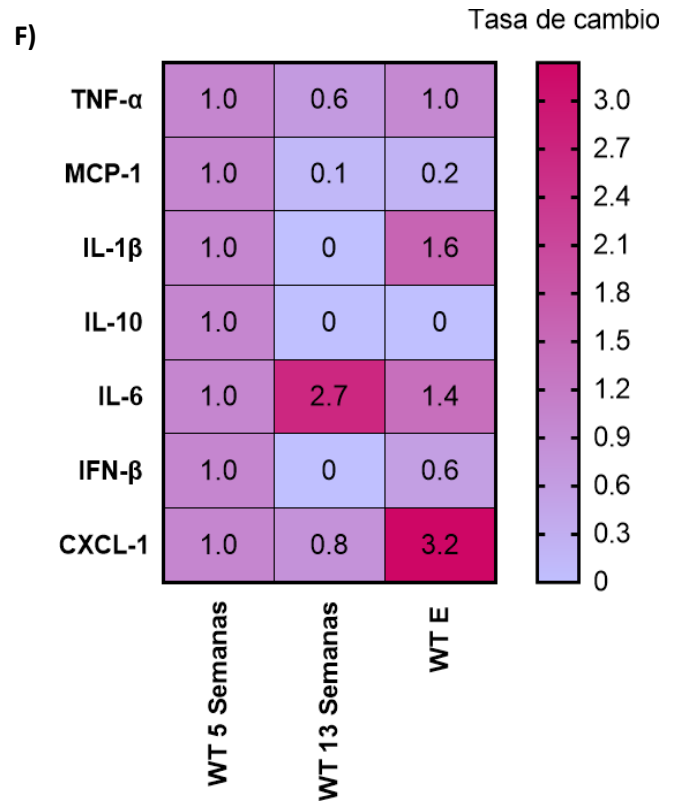
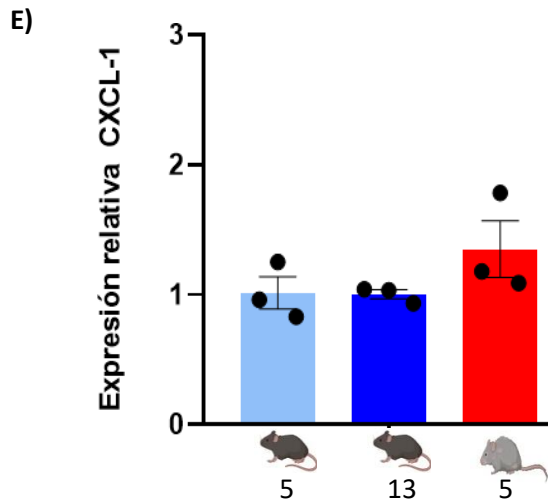
Para caracterizar a las citocinas que conforman el SASP en ambos modelos, se evaluó la expresión de RNAm y la secreción de diferentes citocinas proinflamatorias. En la Figura 6 C-D se muestra la expresión relativa del RNAm de IL-6, IL-1 β y CXCL1. El modelo de senescencia *in vitro* promovió la síntesis del RNAm de IL-6, pero no de IL-1 β y CXCL1. En el caso del modelo de senescencia *in vivo*, se observó la expresión de IL-6 e IL-1 β , pero no de CXCL1 (Figura 6 C-

D). Para tener una visión más amplia del SASP, también se evaluó la secreción de estas citocinas de manera simultánea con el TNF- α , MCP-1 (CCL2), IL-10 e IFN- β , a partir de sobrenadantes de BMMCs en condiciones basales de ambos modelos de senescencia. El modelo de senescencia *in vivo* favoreció la producción constitutiva de citocinas inflamatorias de una manera más intensa que el modelo de senescencia *in vitro* (Figura 6 F). Los datos se normalizaron tomando de acuerdo a los niveles del grupo control negativo (cultivos de 5 semanas de ratones jóvenes) y se muestran como tasa de cambio. Como puede observarse, los niveles de secreción de IL-6 fueron son mayores en el modelo de senescencia *in vitro* que aquellos observados en el modelo *in vivo*. Utilizando la técnica de multiplex se analizó la secreción de 7 citocinas proinflamatorias en sobrenadantes de BMMCs en los diferentes modelos. Los resultados mostraron que en el modelo de senescencia *in vivo* se incremento la secreción de citocinas respecto al modelo de senescencia *in vitro*, los datos fueron analizados en razón de cambio respecto al grupo WT de 5 semanas (Figura 6 F). Los datos se normalizaron de acuerdo a los niveles del grupo control negativo (cultivos de 5 semanas de ratones jóvenes) y se muestran como tasa de cambio. Como puede observarse, los niveles de secreción de IL-6 son mayores en el modelo de senescencia *in vitro* que aquellos observados en el modelo de senescencia *in vivo*, siendo siempre más altos que los de las células no senescentes (Figura 6 G). Este efecto es semejante al mostrado en la síntesis del RNAm de IL-6 (Figura 6 C). Con respecto a IL-1 β , ésta pudo observarse en el modelo de senescencia *in vivo* con mucho más intensidad que en el modelo de senescencia *in vitro* (Figura 1H). En el caso de la producción del RNAm y la secreción de la quimiocina CXCL-1, no se vio modificada en ninguno de los modelos de senescencia replicativa (Figura 6 E y I). Estos datos muestran que la IL-6 se sintetiza más en el modelo de senescencia *in vitro*, mientras que la IL-1 β es la más expresada en el modelo *in vivo*, lo que sugiere que ambos modelos, aunque inducen los mismos niveles de expresión de p21, no son equivalentes y presentan un SASP distintivo.

Con el propósito de entender mejor aquellas diferencias en el SASP inducido por los dos modelos de senescencia replicativa, se construyeron gráficas donde la suma total de las citocinas más significativas fue considerada como el 100% de secreción. En esas gráficas, se asignaron colores arbitrarios a la proporción que representaba cada citocina particular. Por ejemplo, la Figura 6 J muestra que las células no senescentes obtenidas de animales jóvenes tienen un perfil secretor donde el IFN- β ocupa un poco más del 50% del total de citocinas detectadas en su medio condicionado (región verde). En las Figuras 6 K -L podemos observar que el proceso de la senescencia *in vitro* disminuyó la secreción de IFN- β , MCP-1 e IL-1 β , pero indujo un aumento de IL-6, IL-10 y CXCL-1 (Figura 6 J y K). Esto sugiere que las células senescentes *in vitro* se

encuentran en un ambiente inflamatorio caracterizado por altas concentraciones de IL-6. Al comparar la secreción de citocinas proinflamatorias el el modelo de senescencia replicativa *in vitro* (13 semanas, Figura 6 J) con el de senescencia replicativa *in vivo* (Figura 6 L) se observó que la secreción de citocinas como IL1- β , IFN- β CXCL-1 aumentó significativamente. Esto sugiere que las células del modelo de senescencia replicativa *in vivo* presentan características inflamatorias relacionadas con una respuesta antiviral y quimiotaxis celular. En resumen, ambos modelos de senescencia replicativa muestran que las BMNCs senescentes generan un ambiente proinflamatorio en condiciones basales (en homeostasis), lo que sugiere que el proceso de senescencia activa un mecanismo de sensibilización en las células cebadas preparándolas para una respuesta efectora más robusta.





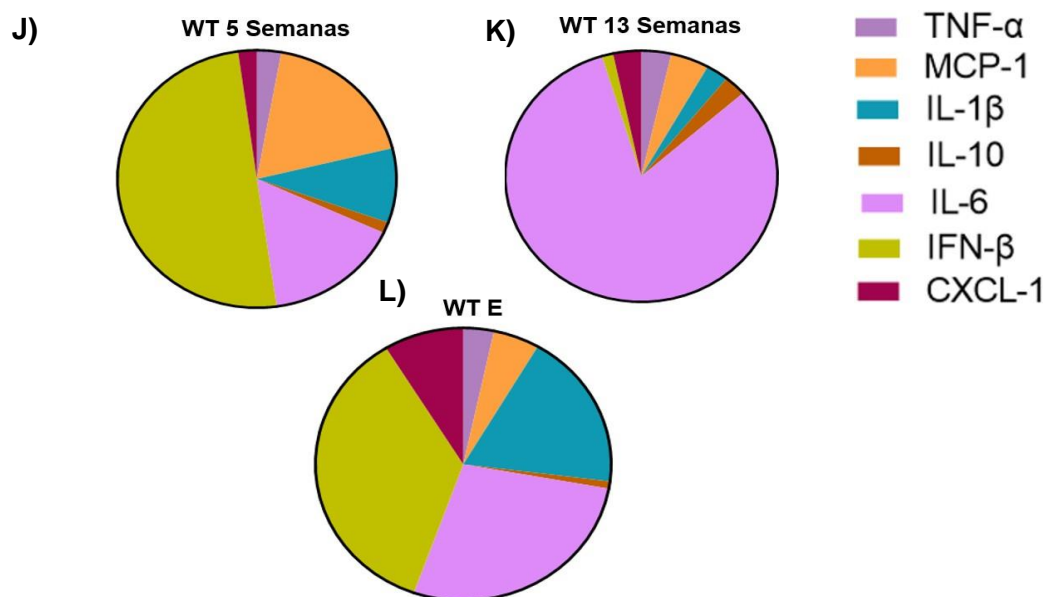


Figura 6.- Caracterización de marcadores de senescencia a partir de dos modelos de senescencia de BMMCs. **A)** Modelos de senescencia. Modelo *in vitro*, obtención de BMMCs a partir de ratones jóvenes (ratón color café) y 13 de semanas del cultivo. Modelo *in vivo*, obtención de BMMCs de ratones envejecidos (E, ratón color gris) y 5 semanas de cultivo. Control interno experimental, ratón joven y 5 semanas de cultivo. **B)** Expresión relativa de la proteína p21 normalizado con la abundancia de β -actina (n=3). **C, D y E)** Niveles de expresión relativa de RNAm de citocinas implicadas en el SASP. Las gráficas representan la expresión de cada citocina normalizada con los niveles de GAPDH, los valores presentan el cambio $2^{-\Delta\Delta Ct}$. ANOVA de una vía, prueba post hoc SIDAK, (n=3). #p \leq 0.05 respecto al basal. **F)** Mapa de calor de los niveles del SASP. Los datos representan los cambios en los niveles de las citocinas evaluadas de acuerdo con el modelo de senescencia estudiado. Los datos representan el cociente de los niveles de citocinas con respecto a la concentración presentada por el cultivo de 5 semanas (n=3). **G, H e I)** Representación de los cambios en la secreción de IL-6, IL-1 β y CXCL-1 con base a los datos del panel F. **J, K y L)** Perfil del SASP representado en gráficas de pastel. Los datos señalan la proporción de secreción de las 7 citocinas seleccionadas a partir del ensayo de LEGNDplex. La condición experimental se consideró el 100% y la proporción de cada citocina corresponde el tamaño de cada fracción, promedio (n=3).

Las células senescentes producidas en ambos modelos de senescencia replicativa muestran alteraciones en la vía de señalización del TLR4.

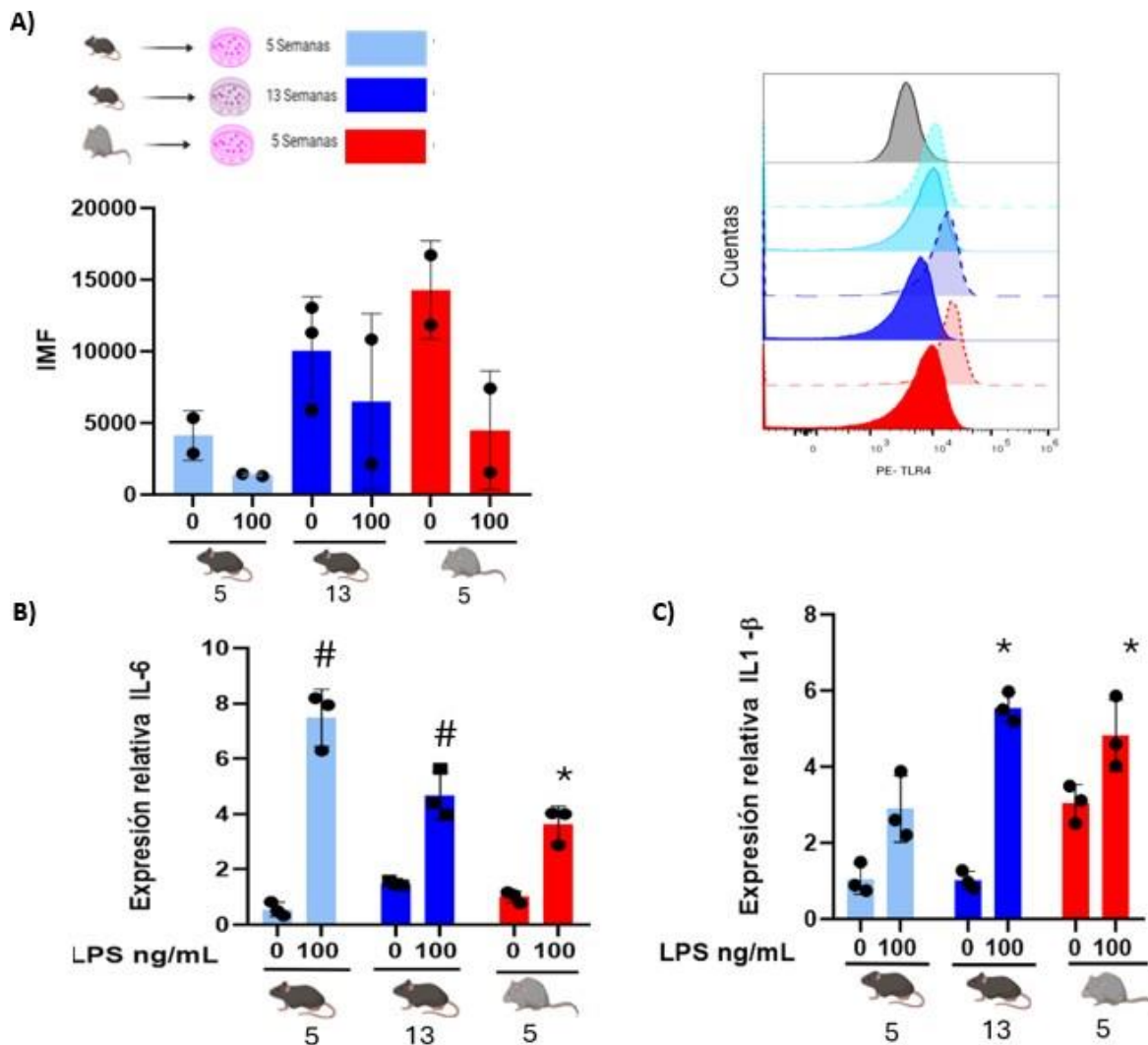
Para analizar si la senescencia replicativa *in vitro* e *in vivo* provoca cambios en el sistema de señalización del receptor TLR4 en BMMCs se evaluaron varios puntos clave del sistema de

transducción de señales del TLR4 en condiciones basales y tras la activación del receptor con LPS (100 ng/mL) por una hora. La Figura 7 A muestra la expresión del TLR4 en la membrana celular, evaluada por citometría de flujo. Ambos modelos de senescencia mostraron un aumento en la expresión basal del receptor TLR4 en la membrana con respecto a las BMMCs no senescentes. La activación del receptor por el LPS disminuyó la expresión del receptor en la membrana (Figura 7 A), indicando la activación e internalización del receptor. Posteriormente se evaluó el efecto en la expresión de RNAm de tres citocinas proinflamatorias. Las BMMCs senescentes de ambos modelos de senescencia replicativa mostraron tener una menor respuesta en las síntesis de RNAm de IL-6 tras la activación del TLR4, en comparación de las BMMCs no senescentes (Figura 7 B). Sin embargo, en la síntesis de RNAm de IL-1 β y CXCL-1, fue posible observar que la senescencia ocasionaba un aumento de la síntesis de ambas citocinas en ambos modelos (Figura 7 C y D).

Siguiendo la vía de señalización río abajo, analizamos la activación del factor de transcripción NF- κ B. Para ello, evaluamos la fosforilación de p65 (p-p65), una subunidad de ese factor de transcripción que transloca al núcleo y que es esencial para la síntesis de citocinas proinflamatorias. Las Figuras 7 E y F muestran un aumento en la activación del TLR4, como era de esperarse. La fosforilación de p65 en células no senescentes no aumento con la activación del TLR4. Al evaluar las células del modelo de senescencia replicativa in vitro, se observó un aumento en la fosforilación de p65 en condiciones basales y después de la activación del TLR4 (Figura 7 E). Sin embargo, los niveles de p-p65 en las células senescentes in vitro no fue mayor a los mostrados por las células no senescentes e, incluso, se observó una tendencia a disminuir (Figura 7 E). Cuando analizamos a p-p65 en el modelo de senescencia replicativa in vivo, la fosforilación basal de p65 fue semejante a la presentada por las células no senescentes y tras la activación del TLR4 esta fosforilación aumentó, pero en menor proporción que en las células del grupo control (no senescentes) (Figura 7 D y E). Estos datos sugieren que la senescencia de las células cebadas, observada en ambos modelos experimentales, regula la fosforilación de p65 al provocar un fenotipo menos sensible a la activación del TLR4.

Posteriormente se caracterizó el perfil de citocinas presente en sobrenadantes de BMMCs senescentes y en sobrenadantes de células estimuladas a través del TLR4. Las BMMCs se estimularon con 100 ng/mL de LPS durante dos horas. En los sobrenadantes obtenidos se analizaron 7 citocinas proinflamatorias y en la Figura 7 G pueden observarse los valores de secreción expresados como la razón de cambio de cada grupo experimental con respecto al basal de las células no senescentes. El análisis mostró que la secreción de algunas citocinas se

incrementó tras la activación del TLR4, siendo mayor la secreción en células generadas en el modelo de senescencia replicativa *in vivo* en comparación al modelo *in vitro* (Figura 7 G). Particularmente, la secreción IL-6 correlacionó con los niveles de expresión de RNAm de esta citocina en el modelo *in vitro*, así como su disminución tras la activación del TLR4. No obstante, en el modelo *in vivo*, la activación del TLR4 si promovió la secreción de IL-6 (Figura 7 H). Con respecto a la IL-1 β , la secreción basal de esta citocina en las BMMCs senescentes *in vivo* fue mayor sin mostrar cambios tras la activación del TLR4, lo que coincide con la producción del RNAm (Figura 7 I). Por otra parte, la secreción de CXCL-1, en ambos modelos de senescencia, aumentó en respuesta a la activación del TLR4, en comparación con las células no senescentes (Figura 7 J).



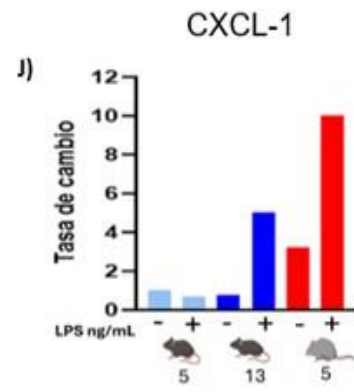
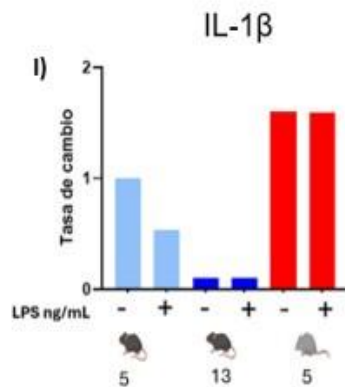
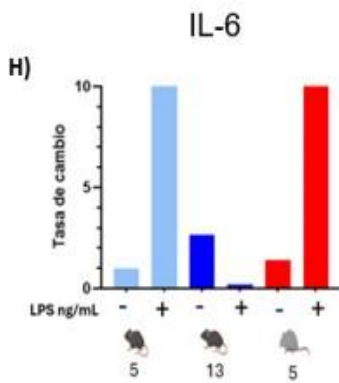
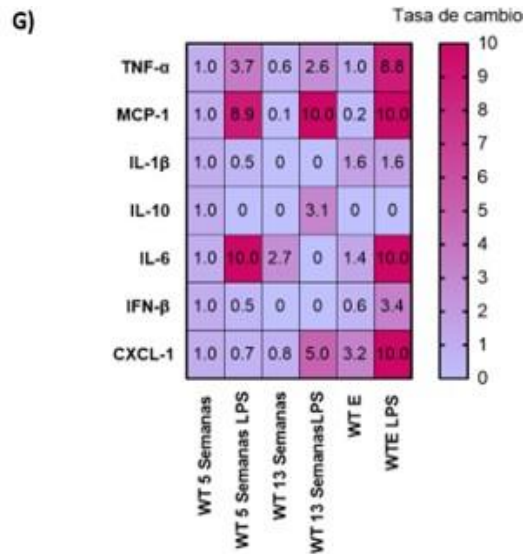
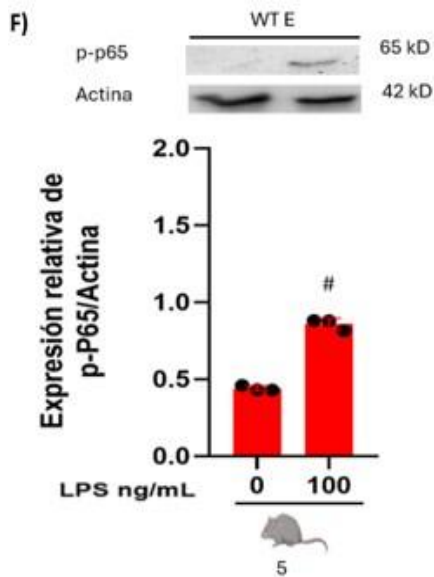
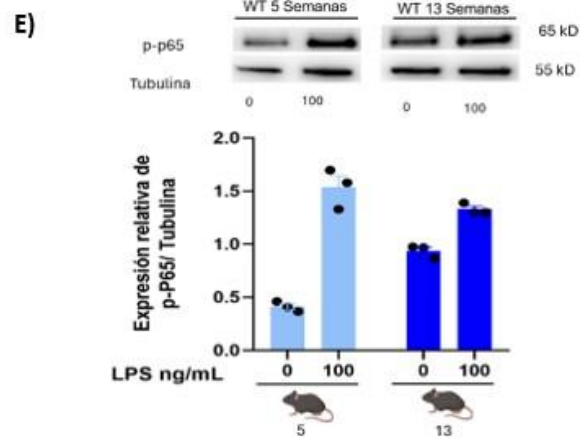
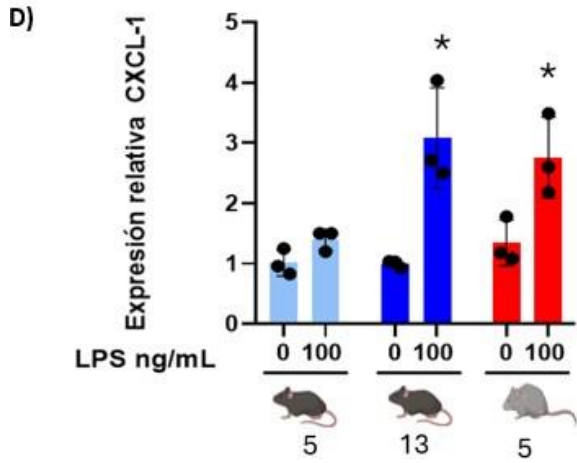


Figura 7.- Efecto de la senescencia sobre la vía de señalización del TLR4. A) Expresión del receptor TLR4 en la membrana celular evaluado por citometría de flujo. Panel izquierdo, datos acumulados de la intensidad media de fluorescencia del TLR4. Panel derecho, histogramas representativos. La línea punteada representa la expresión basal del receptor, sin tratamiento con LPS. La línea continua, BMMCs tratadas con 100 ng/mL de LPS por una hora, n=2. **B, C y D)** Niveles de expresión de RNAm de citocinas implicadas en el SASP. La expresión de cada citocina evaluada se normalizó con respecto a los niveles de GAPDH, los valores presentan los niveles de cambio $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (n=3). ANOVA de una vía, prueba post hoc SIDAK #p≤ 0.05 respecto al basal, *p≤ 0.05 respecto al tratamiento con LPS. **E y F)** Western Blot de la fosforilación de p65 en BMMCs estimuladas con LPS. Los valores de p-p65 se normalizaron con respecto a los niveles de tubulina o β -actina, respectivamente (n=3). Se realizó ANOVA de una vía. Prueba post hoc Tukey P≤ 0.05 (#) respecto al basal, (*) respecto los tratamientos con LPS **D)** Mapa de calor que representa los cambios en los niveles del SASP de acuerdo con el modelo de senescencia estudiado. **H, I y J)** Representación gráfica de la razón de cambio para las citocinas IL-6, IL-1 β y CXCL-1. Los datos representan el cociente de los niveles de citocinas respecto a la concentración presentada por el cultivo de 5 semanas no senescente (n=3).

La senescencia incrementa la secreción de citocinas proinflamatorias en BMMCs estimuladas a través del TLR4.

Para realizar un análisis más profundo del efecto de la senescencia sobre la secreción de las citocinas proinflamatorias tras la activación del TLR4, se evaluó el perfil de secreción de cada citocina en los modelos de senescencia estudiados, así como en las células no senescentes, en respuesta a la activación del TLR4 con LPS (Figura 8). La Figuras 8 A y B, muestran que la activación del TLR4 en las células no senescentes indujo una disminución de las citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-10, MCP-1, IFN- β y un aumento de IL-6. En las BMMCs del modelo de senescencia replicativa *in vitro* se observó una mayor secreción de IL-6, pero menor producción de IFN- β en comparación de las BMMCs no senescentes (Figura 8 A y C). Tras a activación del TLR4, las BMMCs senescentes *in vitro* aumentaron la liberación de MCP-1 e IFN- β , pero disminuyeron la secreción de IL-6, TNF- α y CXCL-1 (Figura 8 C y D). En el modelo de senescencia in vivo, las BMMCs de forma basal produjeron más IL-1 β y CXCL-1, pero menos IL-6 en comparación con las células senescentes in vitro (Figura 8 E y C). En respuesta a la activación del TLR4 las BMMCs senescentes in vivo aumentan la secreción de IL-6 y MCP-1 y disminuyen IFN- β y CXCL-1 (Figura 8 F). En conjunto, las BMMCs senescentes de ambos modelos experimentales presentaron un aumento en la secreción basal de IL-6 y tras la activación del TLR4 la quimiocina MCP-1 se incrementó.

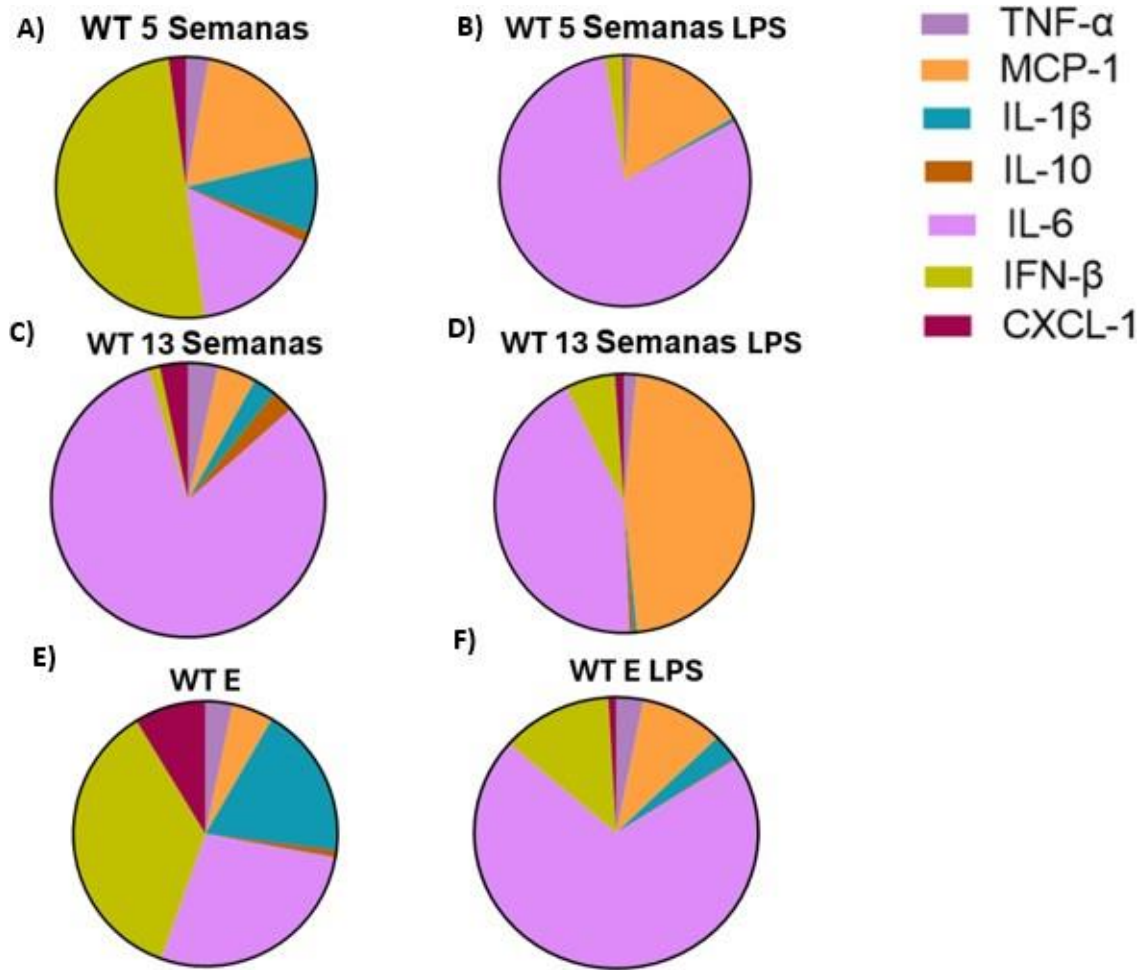
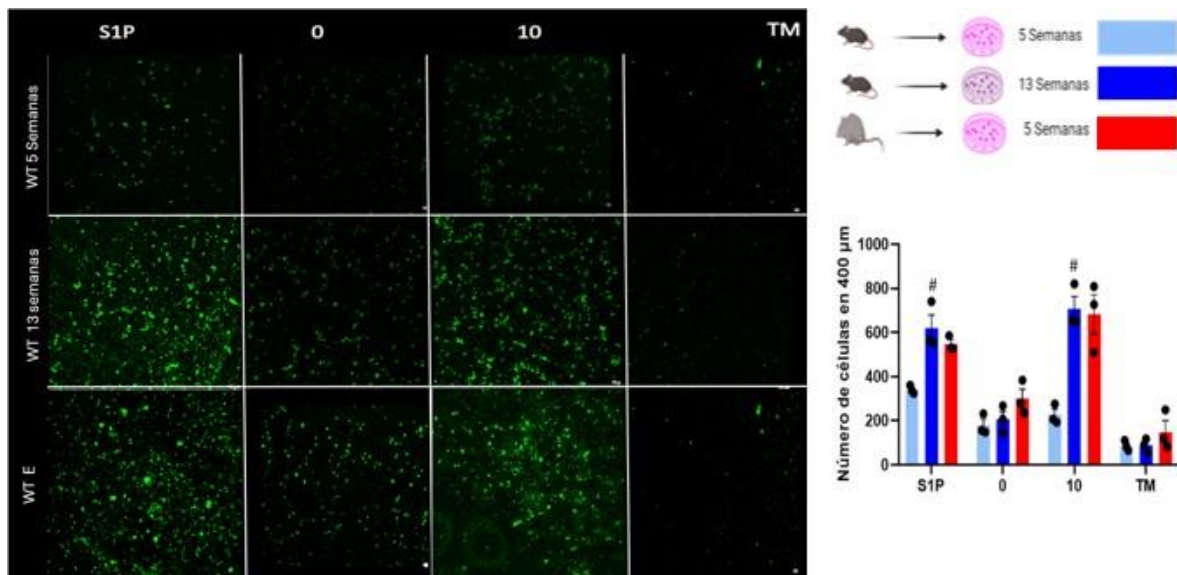


Figura 8.- Secreción de citocinas en ambos modelos de senescencia en condiciones basales y tras la activación del TLR4. Las gráficas de pastel representan la proporción de cada citocina evaluada con respecto al grupo experimental antes y después de la estimulación con LPS. **A)** Células no senescentes. **B)** Células no senescentes estimuladas con LPS. **C)** Células senescentes in vitro. **D)** Células senescentes in vitro estimuladas con LPS. **E)** Células senescentes in vivo. **F)** Células senescentes in vivo activadas con LPS. Datos obtenidos del ensayo de LEGNDplex. Las siete citocinas se tomaron como el 100% para cada grupo y a partir del promedio se dio la proporción de secreción para cada grupo (n=3).

Las BMMCs senescentes migran más hacia el LPS.

Uno de los fenómenos que se presentan en la inflamación prologada es un incremento en la migración de células del sistema inmune o infiltración celular hacia el sitio de inflamación. Por ello, se analizó la migración de BMMCs senescentes hacia un estímulo nocivo que induce una

respuesta inflamatoria, (como lo es el LPS). La Figura 9 muestra que las células senescentes, generadas en los modelos de senescencia replicativa *in vivo* e *in vitro*, migraron más hacia la esfingosina-1-fostato (control positivo de migración), en comparación con las no senescentes. Al evaluar la respuesta ante el LPS, de igual manera las células senescentes migraron más, en comparación con las células no tratadas y las células no senescentes. Esto sugiere que la



senescencia producida en los modelos *in vivo* e *in vitro* provoca cambios en la capacidad migratoria de las células cebadas.

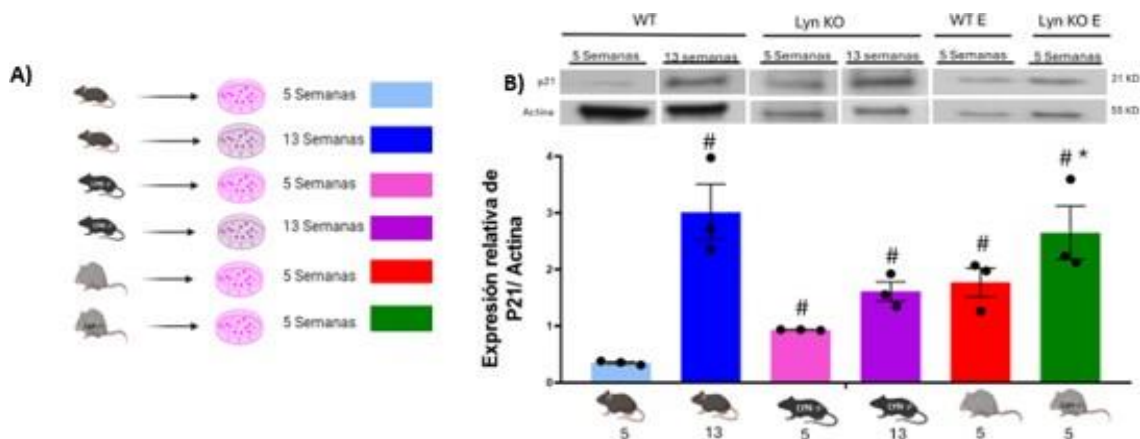
Figura 9: Migración de BMMCs tras la estimulación del TLR4. A) Se muestran imágenes representativas de migración de un experimento independiente (n=3). Microscopia confocal 10x, filtro Alexa 480. En el primer recuadro esfingosina 1-fostato (S1P) control positivo, segundo concentración 0 ng/mL LPS, tercero concentración 10 ng/mL LPS, cuarto recuadro medio de migración (TM) control negativo. Replicación grupo WT 5 semanas en comparación con WT 13 semanas y WT E. Datos analizados con ANOVA de dos vías y prueba post hoc TUKEY. #p≤ 0.05 respecto al basal.

La cinasa Lyn regula negativamente la expresión de los marcadores de senescencia en BMMCs.

Lyn es una cinasa que participa en la vía de señalización del receptor TLR4 y entre sus funciones sobre las células cebadas se ha reportado que regula negativamente la proliferación y modula positivamente la secreción de mediadores inflamatorios. Con base en esto se decidió analizar el papel de la cinasa Lyn sobre los marcadores de senescencia previamente descritos. Para ello,

se desarrollaron los dos modelos de senescencia replicativa (*in vitro* e *in vivo*), a partir de ratones carentes de Lyn (Lyn KO) jóvenes y envejecidos, siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito (Figura 10 A). Para la descripción de los resultados obtenidos en esta sección, principalmente se detallarán los resultados obtenidos de células Lyn KO dado que los resultados de las células provenientes de los ratones tipo silvestres (WT) ya se mencionaron previamente.

Al evaluar la expresión de la proteína p21, se observó que las células no senescentes Lyn KO expresaban niveles altos de esta proteína en comparación con las células WT, sin embargo, esos niveles eran todavía más altos en células Lyn KO sometidas al modelo de senescencia *in vitro* (Figura 10 B). En el caso de las células del modelo de senescencia replicativa *in vivo*, los niveles de p21 en las células Lyn KO fueron más altos en comparación con los observados en células WT del modelo de senescencia *in vivo*, así como con respecto las células WT senescentes del modelo *in vitro* (Figura 10 B). Cuando se evaluó la expresión del RNAm de IL-6, IL-1b y CXCL-1, se observó que las BMMCs Lyn KO no senescentes expresaban altos niveles de RNAm de IL-6 e IL-1b, al grado de ser equiparables con los presentados por las células senescentes *in vitro* Lyn KO (Figura 10 C y D). En el caso de CXCL-1, no se observó cambio entre los grupos en el modelo de senescencia *in vitro* (Figura 10 E). El evaluar el modelo de senescencia *in vivo* se observó que las BMMCs Lyn KO tuvieron niveles de expresión de RNAm de IL-6 y CXCL-1 semejantes a los mostrados por las células WT (Figura 10 F y H). Para IL-1 β , las células Lyn KO senescentes *in vivo* presentaron bajos niveles del RNAm de esta citocina en comparación con las células WT senescentes *in vivo* (Figura 10 G). Estos hallazgos indican que la cinasa Lyn modula negativamente la presencia de marcadores de senescencia, así como la transcripción de algunas citocinas ya que en condiciones de no senescencia ya se encuentran expresados.



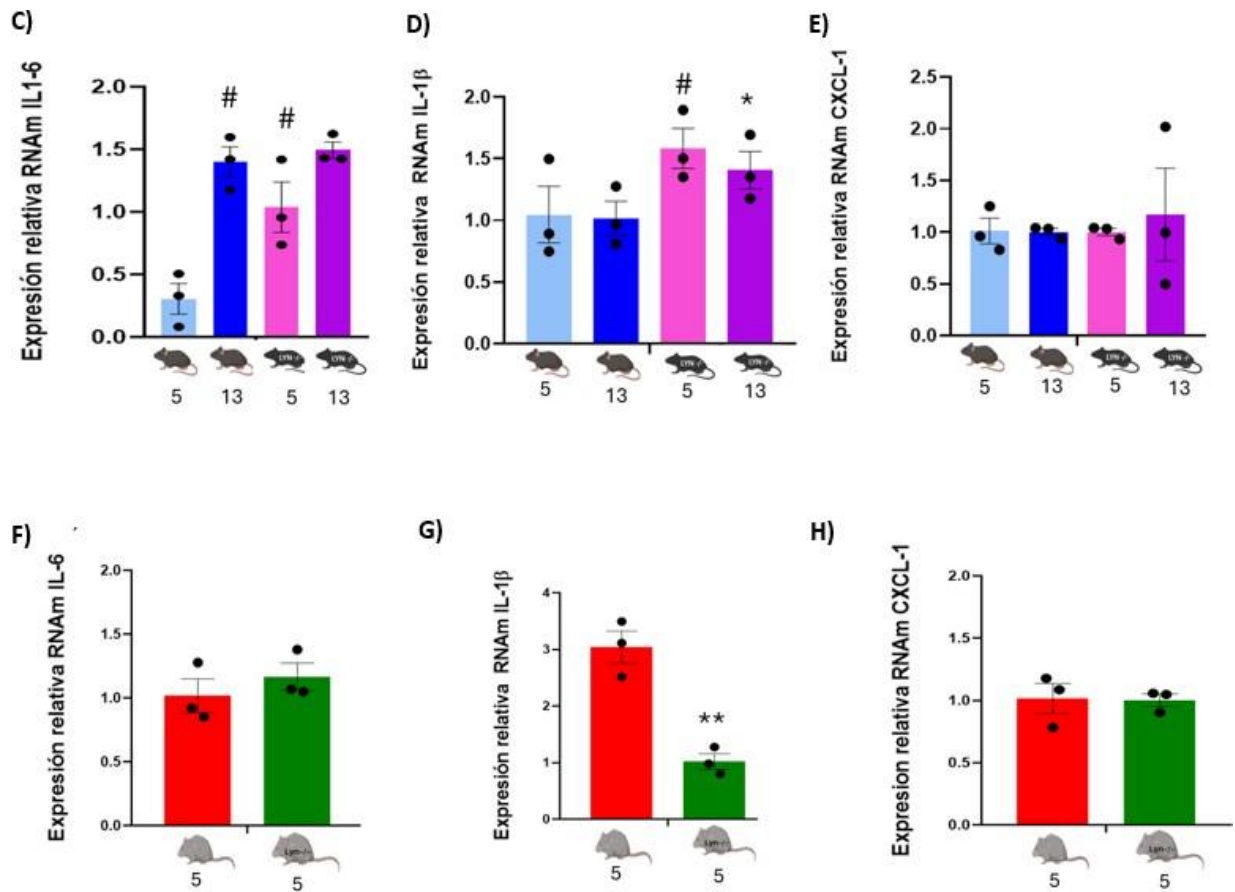


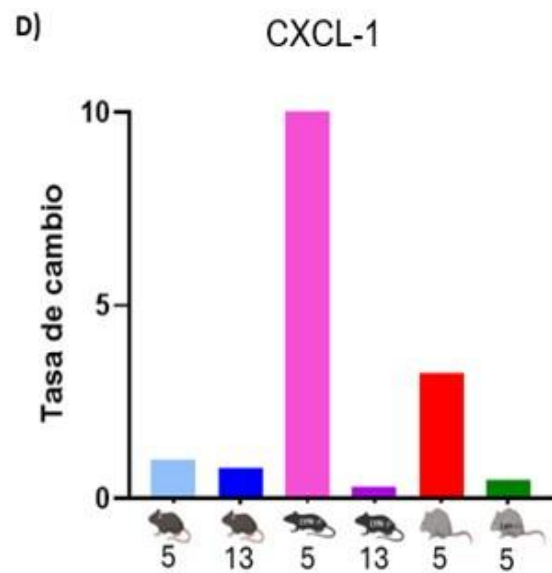
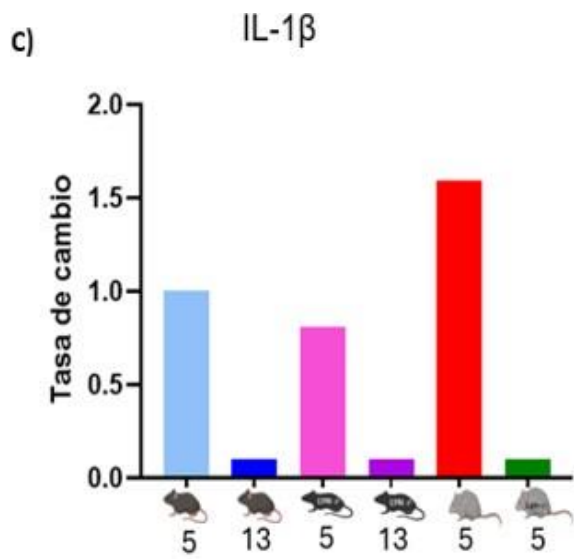
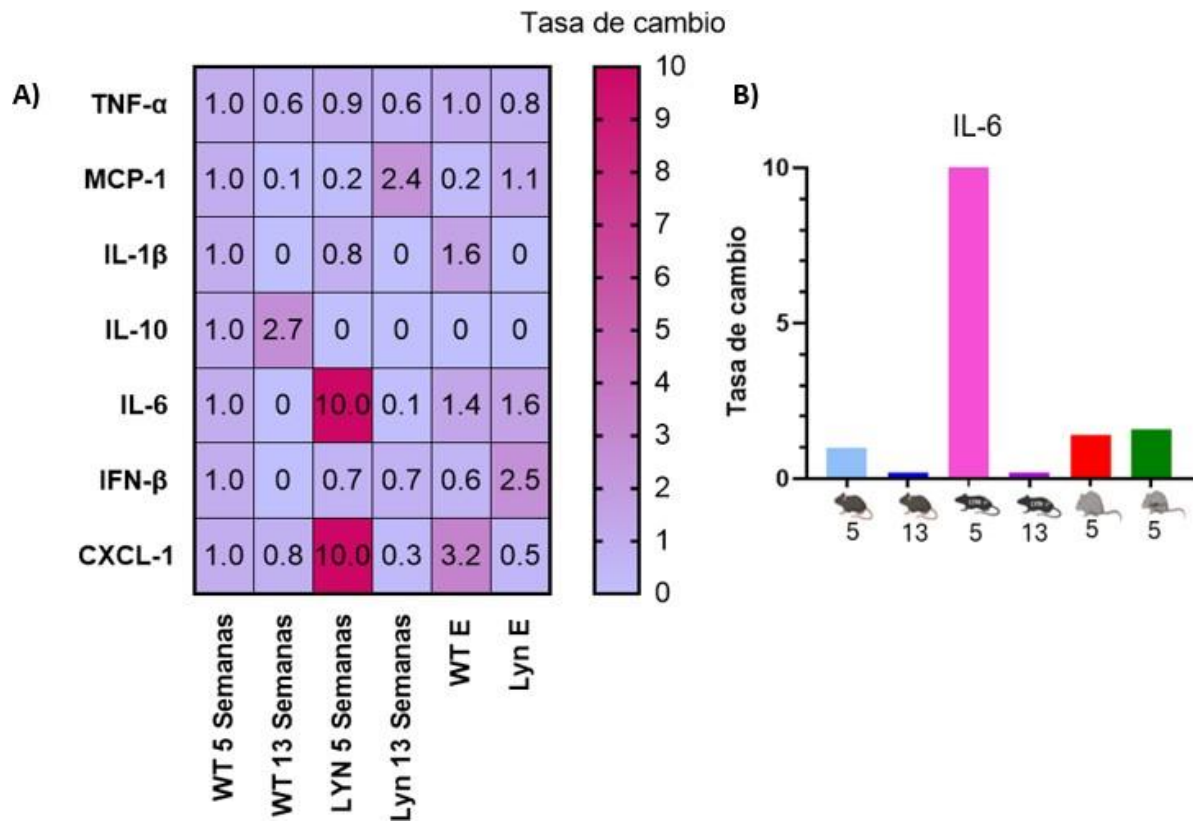
Figura 10: Papel de la cinasa Lyn en la senescencia de células cebadas. **A)** Modelos de senescencia. Obtención de BMMCs a partir de ratones WT jóvenes (5 semanas) y envejecidos (E, 35-60 semanas) para ambos genotipos WT y Lyn KO. **B)** Expresión relativa de la proteína p21 con respecto a β -actina (n=3). **C-E)** Niveles de expresión de RNAm de citocinas implicadas en el SASP en el modelo *in vitro* de senescencia. **F-H)** Expresión relativa de RNAm en células senescentes *in vivo*. La expresión de cada citocina se normalizó con respecto a los niveles de GAPDH, los valores presentan el cambio $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (n=3). ANOVA de una vía. Prueba post hoc Tukey #p \leq 0.05 respecto WT no senescente, *p \leq 0.05 respecto a su basal.

La cinasa Lyn regula negativamente el secretoma de las BMMCs no senescentes y senescentes en cultivo

Con el objetivo de evaluar el papel de la cinasa Lyn en la función efectora de las células cebadas senescentes, se determinó el perfil de secreción de 7 citocinas inflamatorias en células Lyn KO generadas en los modelos de senescencia replicativa *in vitro* e *in vivo*, por medio del ensayo

LEGNDplex. Se escogieron las citocinas con mayor cambio con base en las diferentes condiciones estudiadas, y los datos fueron expresados dependiendo de su tasa de cambio respecto al basal (Figura 11). Se hizo énfasis en las citocinas IL-6, IL-1 β y CXCL-1, de las cuales también se evaluó el RNAm (Figura 11 C-H). Se observó que las células no senescentes Lyn KO secretan de manera constitutiva altos niveles de IL-6 y CXCL-1 a diferencia de las WT en las mismas condiciones (Figura 11 A, B y D). La citocina IL-1 β se secreta en cantidades similares en las células Lyn KO y WT no senescentes (Figura 11 A y C). Las células Lun KO senescentes generadas en los modelos de senescencia replicativa *in vitro* e *in vivo* no secretan IL-1 β , CXCL-1 ni IL-6 de manera basal, inclusive, se observa una disminución de IL-1 β y CXCL-1 en comparación con sus controles respectivos (Figura B-D), en tanto que IL-6 se mantiene solo en los cultivos de ratones envejecidos (Figura B).

Para un análisis más detallado y claro del perfil de secreción con base al modelo de senescencia y su genotipo, se representó la proporción de secreción de cada citocinas por grupo en estudio (Figura 11 E-J). De manera interesante, encontramos que las células Lyn KO no senescentes liberan altas cantidades de CXCL-1, IL-6 y menos IFN- β , TNF-a y MCP-1, en comparación con las células WT (Figura 11 E y F). En el modelo de senescencia *in vitro*, las células Lyn KO secretan más IFN- β , CXCL-1, MCP-1 en comparación con las WT (Figura 11 G y H). En el modelo de senescencia *in vivo*, las BMMCs Lyn KO producen más IL-10, pero menos IL-6, MCP-1, TNF-a, IL-1b y CXCL-1 con respecto a las WT (Figura 11 I y J). Podemos observar que la mayor diferencia se observa en los niveles de IL-6, IL-10, MCP-1 y CXCL-1, donde las células Lyn KO generadas en el modelo de senescencia *in vivo* secretan más IL-10 y CXCL-1, pero menos MCP-1 e IL-6 con respecto a las células generadas en el modelo de senescencia *in vitro* (Figura 11 H y J). Este tipo de análisis nos permitió observar que las células Lyn KO del modelo de senescencia *in vitro* presentan un fenotipo secretor similar al mostrado por las células WT del modelo de senescencia *in vivo* (Figura 11 H y 11 I). Esto apoya la idea de que la cinasa Lyn regula negativamente la expresión de los marcadores de senescencia, en particular, la aparición del SASP.



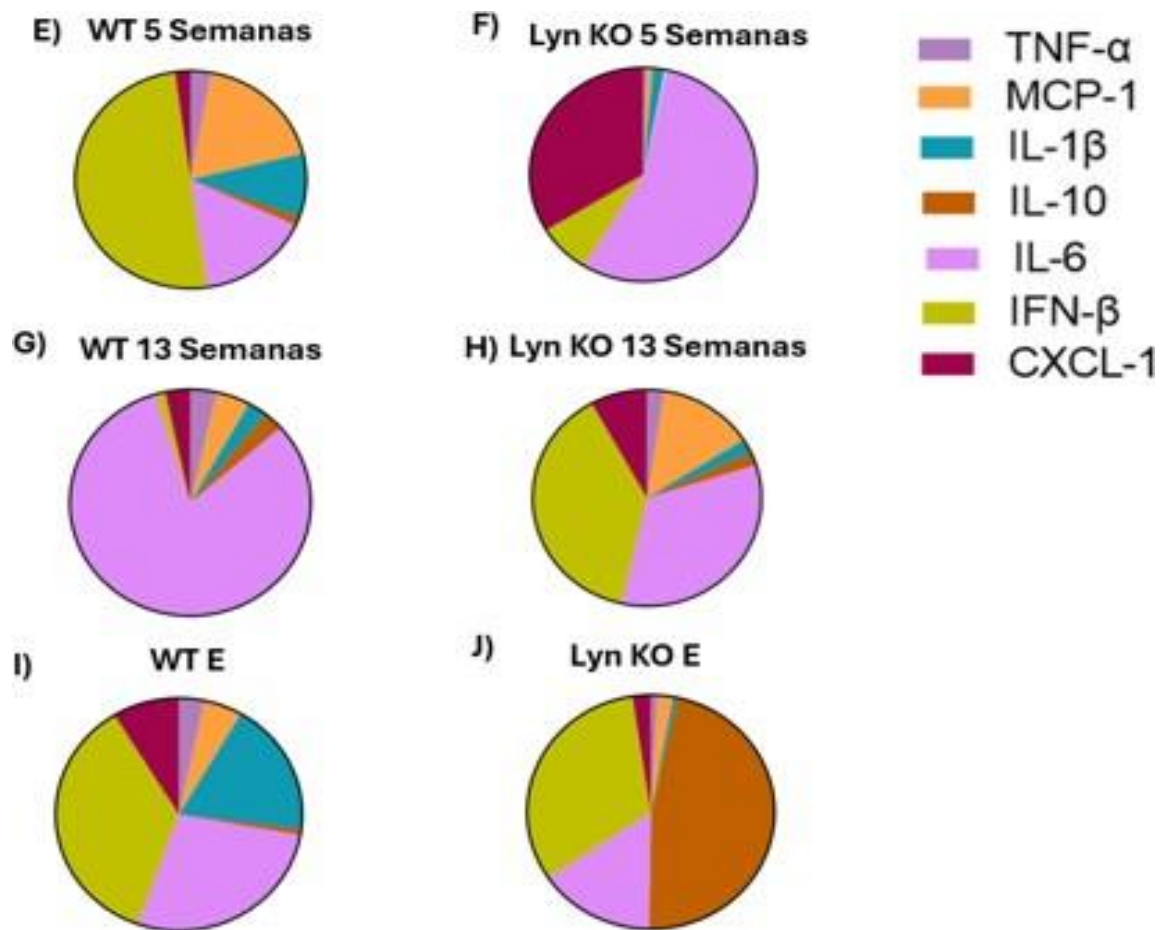
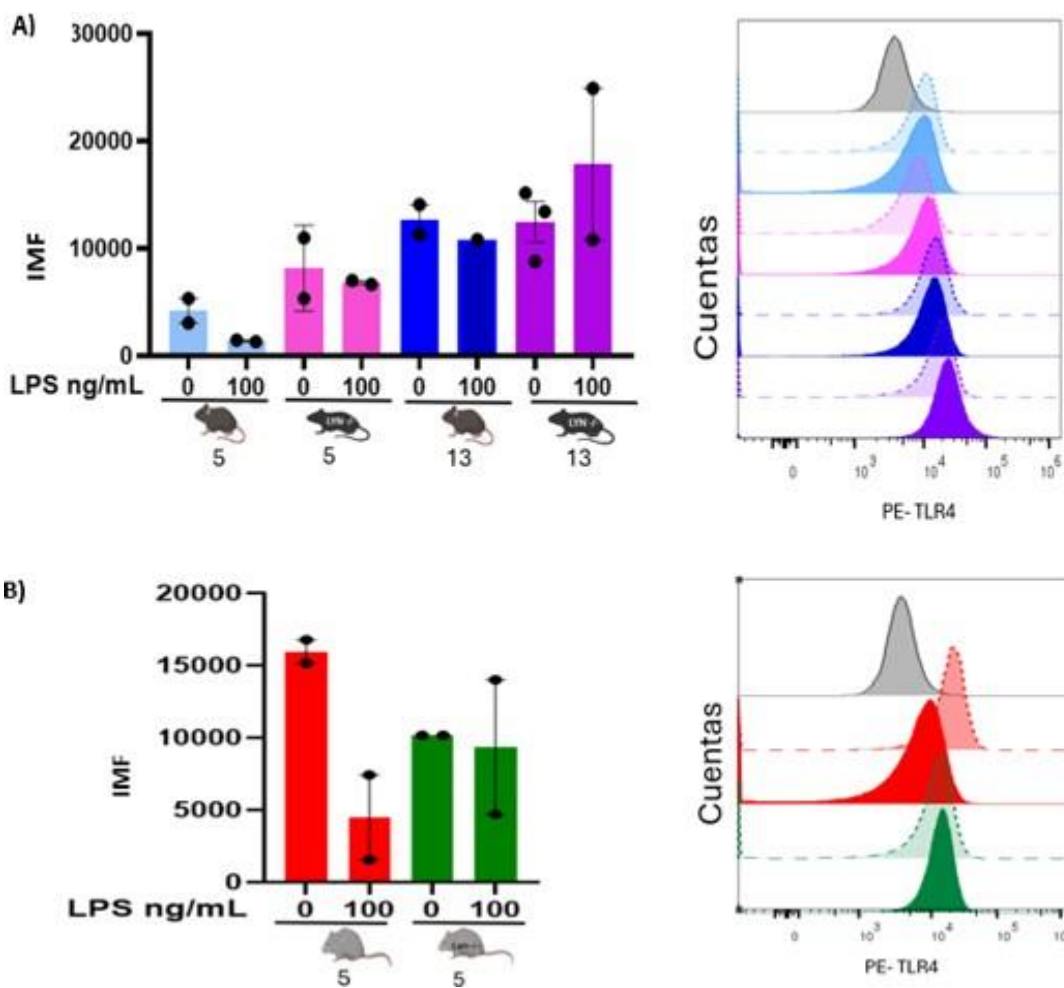


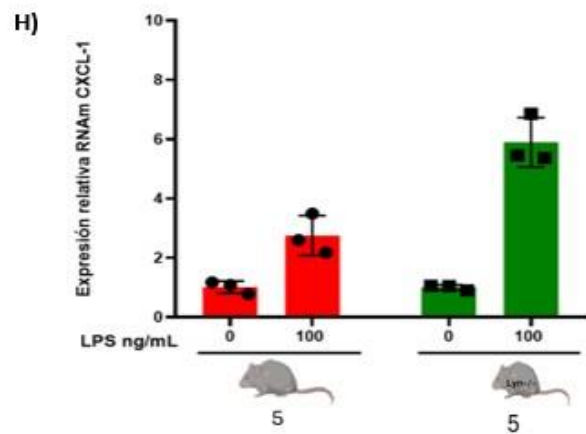
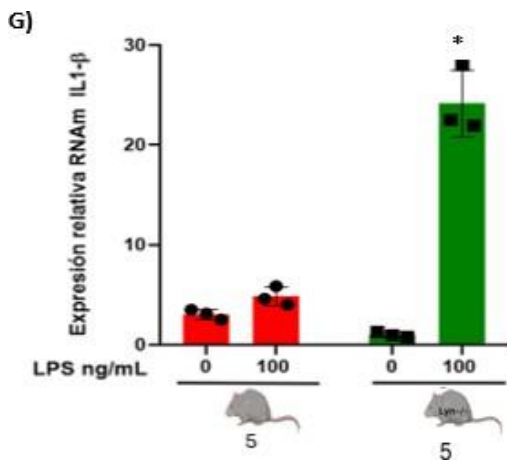
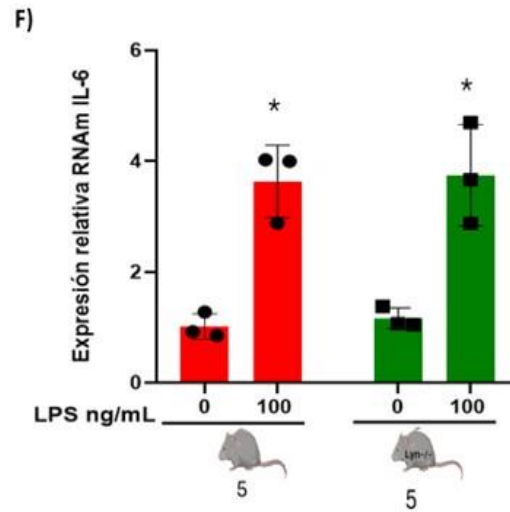
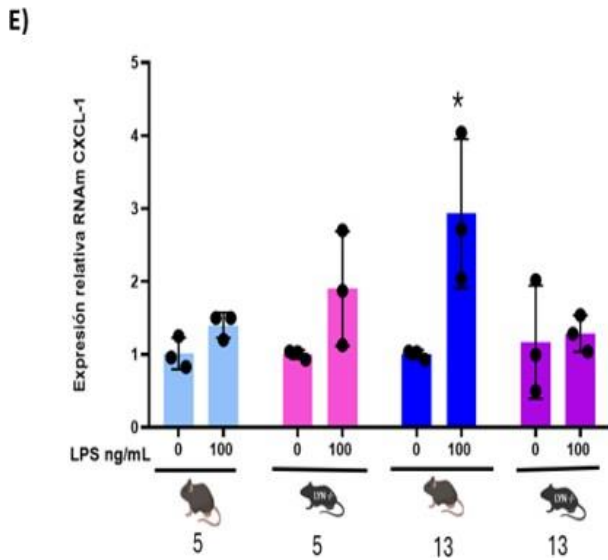
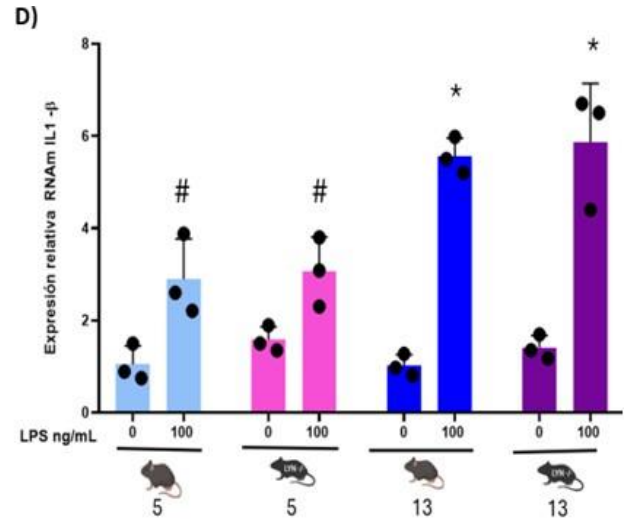
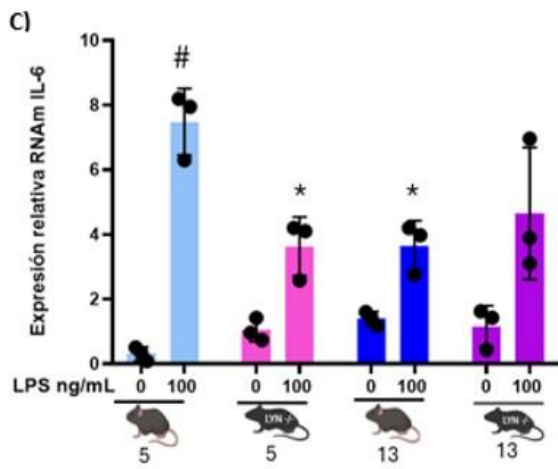
Figura 11: Lyn regula negativamente la secreción de citocinas implicadas en el SASP. A) Mapa de calor representando los cambios en los niveles del SASP de acuerdo con el modelo de senescencia estudiado y genotipo. B-D) Representación gráfica de la tasa de cambio en las citocinas B) IL-6, C) IL-1 β y D) CXCL-1. Los datos representan el cociente de los niveles de citocinas respecto a la concentración presentada por el cultivo no senescente de 5 semanas (n=3). E-J) Fenotipo secretor en ambos modelos de senescencia con respecto a su genotipo. E) Células no senescentes WT. D) Células no senescentes Lyn KO. F) Células senescentes in vitro WT. G) Células senescentes in vitro Lyn KO. H) Células senescentes in vivo WT. I) Células senescentes in vivo Lyn KO. Las gráficas de pastel representan la proporción que corresponde a la secreción de 7 citocinas seleccionadas a partir del ensayo de LEGNDplex. Las siete citocinas se tomaron como el 100% para cada grupo y a partir del promedio, se dio el valor de proporción de secreción para cada grupo (n=3).

Papel de la cinasa Lyn en la activación del TLR4 en BMMCs senescentes.

Para analizar el papel de Lyn en los cambios que la senescencia induce en el sistema de señalización del receptor TLR4, se midieron los parámetros ya mencionados en células Lyn KO generadas en ambos modelos de senescencia replicativa (*in vitro* e *in vivo*) tras la activación del TLR4 con LPS. La Figura 12 A muestra que la carencia de Lyn en las células no senescentes no induce cambios en la expresión del TLR4 en la membrana celular, ni en condiciones basales ni después de la estimulación con LPS. En células Lyn KO producidas en el modelo de senescencia *in vitro*, estimuladas con LPS, la expresión del TLR4 tiende a aumentar (Figura 12 A). En el caso del modelo *in vivo* de senescencia, las células Lyn KO estimuladas con LPS expresaron niveles semejantes del TLR4 en su membrana comparadas con las no estimuladas (Figura 12 B). Posteriormente se analizó la expresión del RNAm de IL-6, IL-1 β , CXCL-1 en el modelo de senescencia *in vitro* (Figura 12 C-E). Al evaluar la expresión de estas citocinas tras la activación del TLR4, se observó un aumento en los niveles del RNAm de IL-6 en las células senescentes y no senescentes Lyn KO, sin embargo, los niveles fueron menores a los producidos por las células no senescentes WT y equiparables a las células senescentes WT (Figura 12 C). Los niveles de RNAm de IL-1 β en las células Lyn KO (senescentes y no senescentes) aumentaron tras la activación del TLR4, pero no fueron diferentes a los de sus respectivos controles WT (Figura 12 D). En la expresión de CXCL-1 no existieron cambios entre las células Lyn KO senescentes y no senescentes estimuladas con LPS (Figura 12 E). En el modelo de senescencia *in vivo*, los niveles de RNAm de IL-6 en células Lyn KO fueron semejantes a los mostrados por las células WT senescentes *in vivo* después de la activación del TLR4 (Figura 12 F). Para el RNAm de IL-1 β y CXCL-1, la estimulación de las células Lyn KO senescentes *in vivo* con LPS indujo un aumento de aproximadamente 6 y 2 veces más, respectivamente, con respecto a las senescentes *in vivo*

WT (Figura 12 G y 12 H). Al estudiar la fosforilación de p65 en respuesta de la activación del TLR4 en células Lyn KO obtenidas en ambos modelos de senescencia, se observó que la fosforilación de p65 aumenta en las células Lyn KO no senescentes, pero no en las producidas en el modelo de senescencia *in vitro*, con respecto a las células no estimuladas (Figura 12 I). Sin embargo, al comparar con sus controles WT, las células no senescentes Lyn KO estimuladas con LPS inducen menor fosforilación de p65 que las células WT, mientras que las células senescentes *in vitro* Lyn KO activadas con LPS promueven una mayor fosforilación de p65 con respecto a las células senescentes *in vitro* WT (Figura 12 I). En el caso del modelo de senescencia *in vivo*, las células Lyn KO estimuladas con LPS no inducen p-p65 (Figura 12 J).





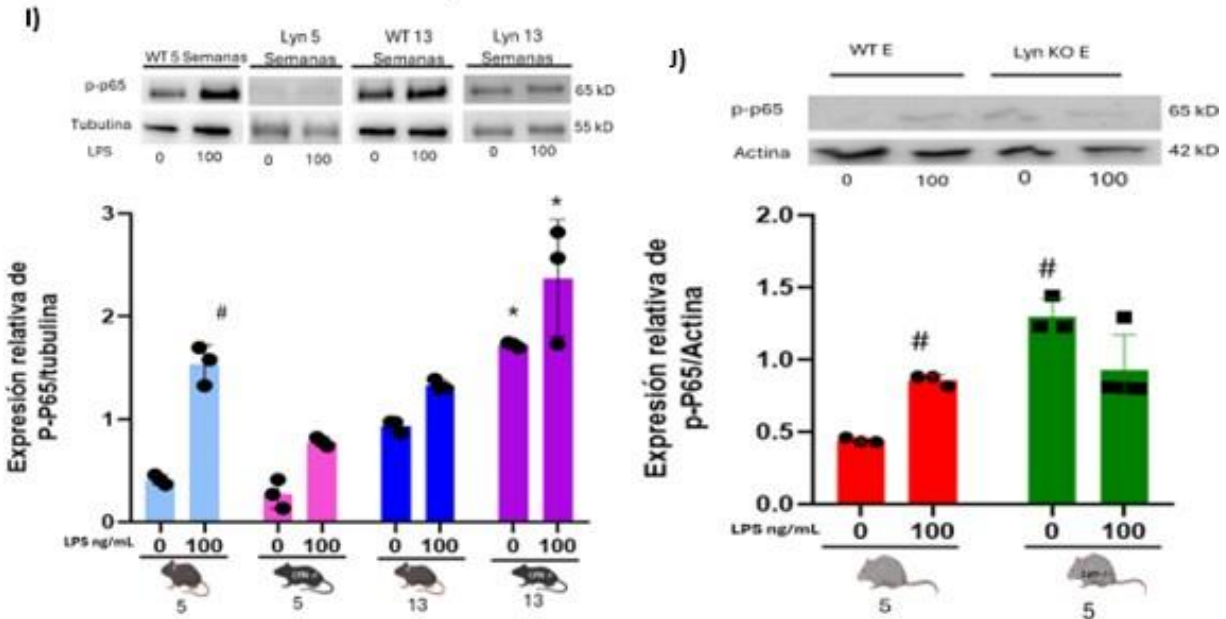


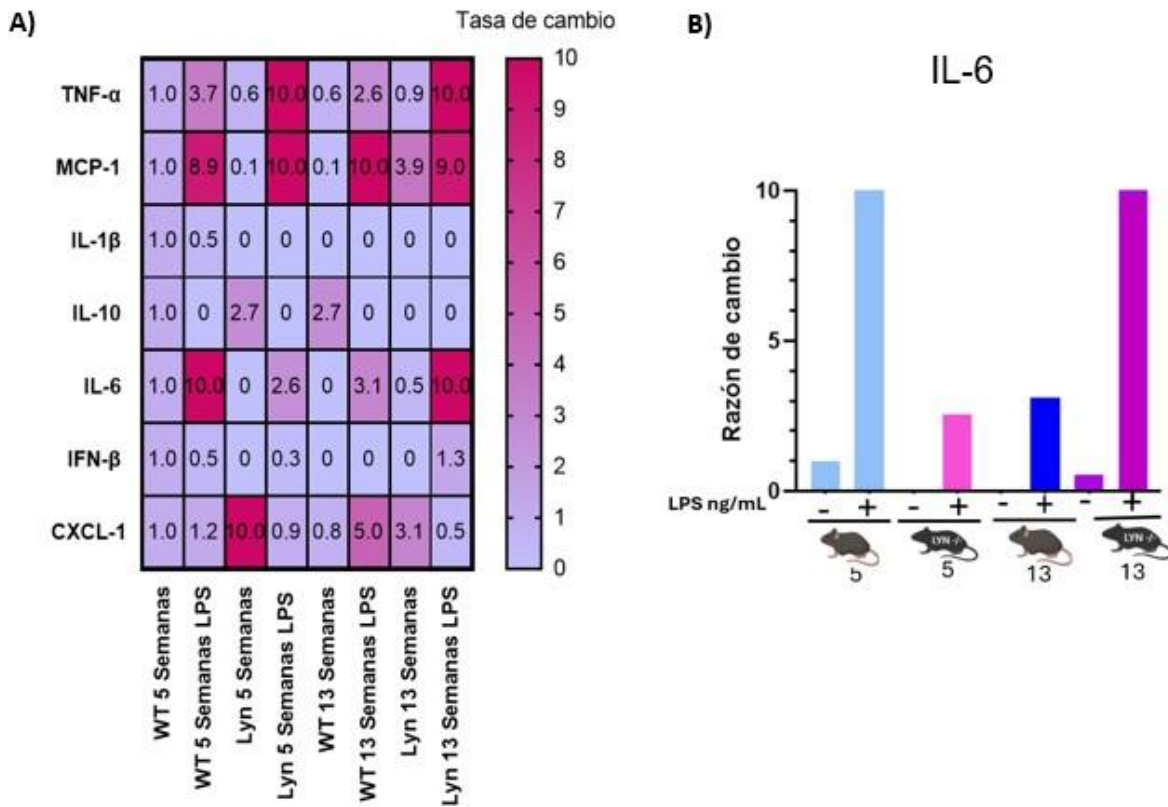
Figura 12: Papel de la cinasa Lyn senescencia celular en la vía de señalización del TLR4.

A y B) Intensidad media de fluorescencia (IMF) del receptor TLR4. Panel izquierdo, datos acumulados de la IMF TLR4. Panel derecho, histogramas representativos. Línea punteada representa sin LPS, líneas continuas representan BMMCs con 100 ng/mL de LPS por una hora. n=2. **B - E y F - H)** Niveles de expresión de RNAm de citocinas implicadas en el SASP. La expresión de cada citocina evaluada se normalizó con respecto a los niveles de GAPDH, los valores presentan los niveles de cambio $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (n=3). ANOVA de dos vías, prueba post hoc SIDAK #p < 0.05 respecto al basal, *p < 0.05 respecto al tratamiento con LPS. **I e J)** Western Blot de la fosforilación de p65 en BMMCs estimuladas con LPS. Los valores de p-p65 se normalizaron con respecto a los niveles de tubulina o β -actina, respectivamente (n=3). ANOVA de dos vías. Prueba post hoc Tukey P < 0.05 (#) respecto al basal, (*) respecto los tratamientos con LPS.

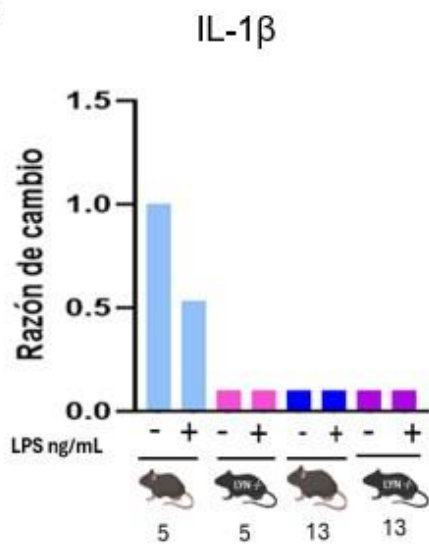
La cinasa Lyn regula negativamente la secreción de citocinas proinflamatorias en ambos modelos de senescencia.

Con objetivo de conocer el papel de Lyn en la secreción mediada por la activación del TLR4 en células generadas en ambos modelos de senescencia, se evaluó las citocinas asociadas con el fenotipo secretor senescente en sobrenadantes de células activadas con LPS (100ng/mL durante dos horas) y sus respectivos controles. La secreción se representó como la razón de cambio con respecto a la secreción constitutiva (sin estimulación) de las células no senescentes. La Figuras 13 A y 13 E muestran el perfil general de la tasa de cambio de secreción de todas las citocinas evaluadas. Solamente se describirán los resultados que corresponden a las citocinas

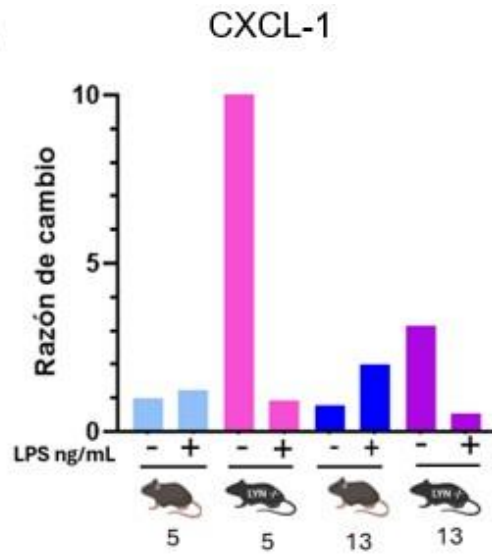
IL-6, IL-1 β y CXCL-1. La citocina IL-6 mostró un aumento tras la estimulación del TLR4 en las BMMCs Lyn KO obtenidas en el modelo de senescencia *in vitro* respecto a las WT senescentes (Figura 13 B). La secreción de IL-1 β no mostró cambios en las BMMCs Lyn KO senescentes *in vitro* tras la activación del TLR4 (Figura 13 C). La secreción de CXCL-1 fue mayor en el grupo de Lyn KO no senescente, mientras que en el grupo senescente la liberación de esta citocina fue mínima (Figura 13 D). En modelo de senescencia *in vivo* (Figura 13 E) la razón de cambio de secreción de IL-6 e IL-1 β tras la activación del TLR4 fue menor en las células Lyn KO al presentado por las células WT (Figura 13 F y G). Las células senescentes *in vivo* Lyn KO estimuladas con LPS secretaron altos niveles de CXCL-1 con respecto a las células senescentes *in vivo* WT estimuladas (Figura 13 H)



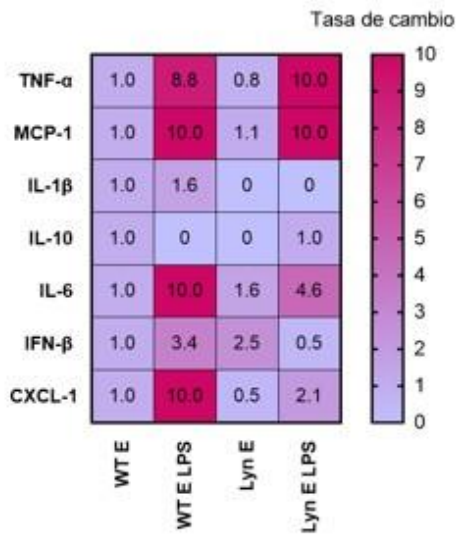
c)



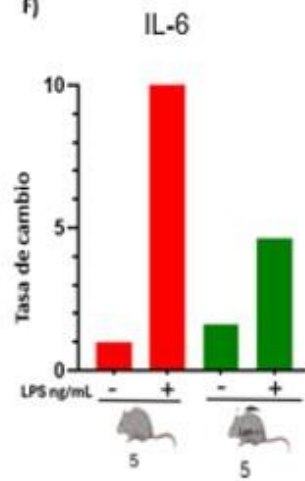
d)



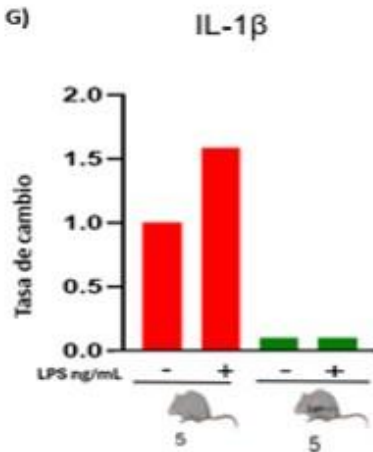
e)



f)



g)



h)

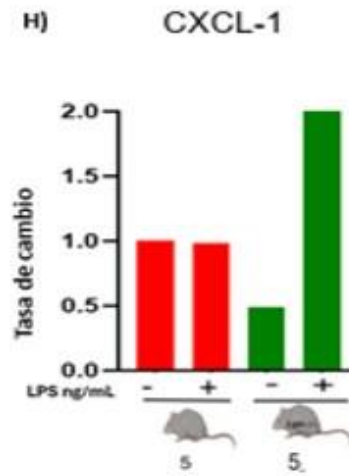


Figura 13. Niveles de secreción de citocinas inflamatorias tras la activación del TLR4 en células senescentes Lyn KO. **A y E)** Mapa de calor representando los niveles de secreción de las citocinas en los modelos de senescencia *in vitro* e *in vivo* respectivamente. El mapa representa los cambios en los niveles del SASP de acuerdo con el modelo de senescencia estudiado. **B-D)** Representación gráfica de la razón de cambio en la secreción de las citocinas IL-6, IL-1 β y CXCL-1 en el modelo de senescencia *in vitro* Lyn KO y WT. **F-H)** Representación gráfica de la razón de cambio de secreción de las citocinas IL-6, IL-1 β y CXCL-1 en el modelo de senescencia *in vivo* Lyn KO y WT. Los datos representan el cociente de los niveles de citocinas secretados respecto a la concentración presentada por las células no senescentes, cultivo de 5 semanas, o con el basal de cada grupo para la condición con LPS (n=3).

Para poder apreciar más fácilmente el perfil secretor en los diferentes grupos evaluados, nuevamente se realizó el análisis de las 7 citocinas considerando la secreción total como el 100% y calculando la proporción de cada una, en cada grupo experimental (Figura 14). En ausencia de estimulación (Figuras 14 A-D), las células Lyn KO presentaron niveles más altos de secreción de CXCL-1 a diferencia el grupo WT (Figura 14 A y 14 B). Cuando se estimularon con LPS, en ambos grupos se observó un aumento en la secreción de IL-6 y MCP-1 (Figura 14 C y 14 D). No obstante, las células Lyn KO no senescentes estimuladas con LPS mantuvieron la producción de CXCL-1 (Figura 14 D). En el modelo de senescencia *in vitro* (Figura 14 E-H), las células senescentes Lyn KO presentaron altos niveles de IFN- β , MCP-1 y CXCL-1 en comparación con las células senescentes WT (Figura 14 E y 14 F). Tras la activación del TLR4, las BMMCs Lyn KO senescentes aumentaron la secreción de IL-6 y disminuyeron la liberación de MCP-1, con respecto a las WT senescentes (Figura 14 G y 14 H). Sin embargo, el perfil secretor entre ambos grupos experimentales es semejante. En el modelo de senescencia *in vivo* (Figura 14 I y 14 L) las BMMCs Lyn KO senescentes activadas con LPS mostraron tener un perfil de secreción alto en varias citocinas entre ellas MCP-1, IL-10 y TNF-a, mientras que disminuyó IL-6 en comparación con las BMMCs WT senescentes también activadas (Figura 14 K y 14 L). Con este tipo de análisis, hay varios puntos interesantes a destacar con base al perfil general de secreción de cada condición. 1) Las células Lyn KO generadas en el modelo de senescencia *in vitro* presentaron un fenotipo de secreción parecido a las células WT generadas en el modelo de senescencia *in vivo*. 2) Las células senescentes *in vitro* WT y Lyn KO y las células senescentes *in vivo* WT, estimuladas con LPS mostraron la secreción de las mismas citocinas, pero en proporciones diferentes. 3) Las células Lyn KO senescentes generadas en el modelo *in vivo* estimuladas con LPS liberan gran variedad de citocinas, lo que constituye un perfil único.

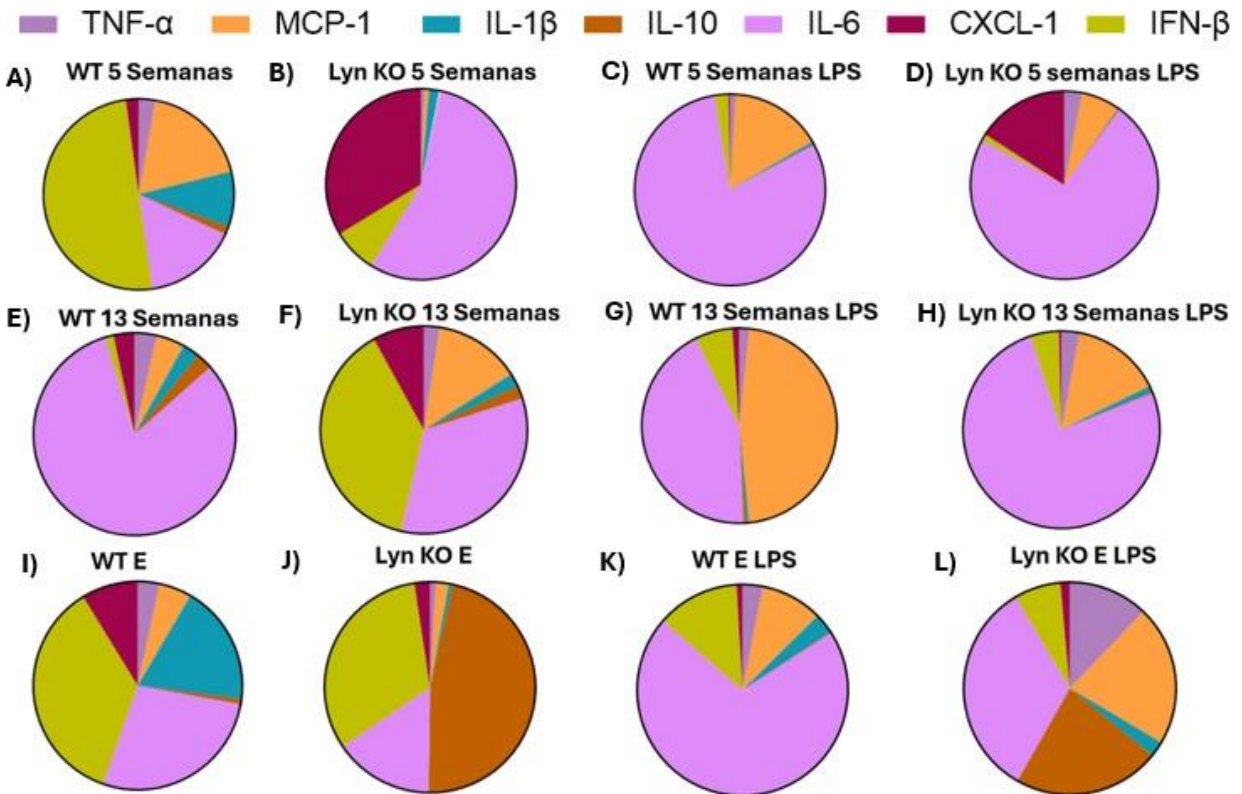


Figura 14: Fenotipo secretor en ambos modelos de senescencia. A-L) Fenotipo secretor en ambos modelos de senescencia con respecto a su genotipo. **A)** Células control no senescentes *in vitro* WT. **B)** Células control no senescentes *in vitro* Lyn KO *in vitro*. **C y D)** Los mismos grupos con LPS. **E y F)** Células WT y Lyn KO senescentes *in vitro*. **G y H)** Células anteriores tratadas con LPS. **I e J)** Células senescentes *in vivo* WE y Lyn KO respectivamente. **K y L)** Células anteriores tratadas con LPS. Las gráficas de pastel representan la proporción que corresponde a la secreción de 7 citocinas seleccionadas a partir del ensayo de LEGNDplex. Las siete citocinas se tomaron como el 100% para cada grupo y a partir del promedio, se dio el valor de proporción de secreción para cada grupo (n=3).

Lyn regula negativamente la migración de células cebadas senescentes hacia al LPS.

Para conocer el papel de Lyn sobre la migración hacia el LPS de las células cebadas generadas en los modelos de senescencia *in vitro* e *in vivo*, se realizaron ensayos en la cámara de Boyden. Las células Lyn KO senescentes *in vitro*, así como las no senescentes, migran más hacia el LPS en comparación con las células no senescentes WT, pero en igual magnitud que las células WT senescentes *in vitro* (Figura 15 A). Al evaluar las células senescentes *in vivo*, la migración hacia el LPS es mayor en las células senescentes Lyn KO en comparación con las WT (Figura 15 B).

En conjunto, los resultados obtenidos de este trabajo indican que las BMMCs carentes de Lyn presentan un estado pro- senescente, dado que expresan marcadores de senescencia, sintetizan altos niveles de RNAm de citocinas involucradas en el SASP, secretan citocinas del SASP y migran más hacia estímulos inflamatorios en comparación con las células WT. Esto sugiere que Lyn regula negativamente la función efectora de las células cebadas senescentes favoreciendo una respuesta inflamatoria exacerbada.

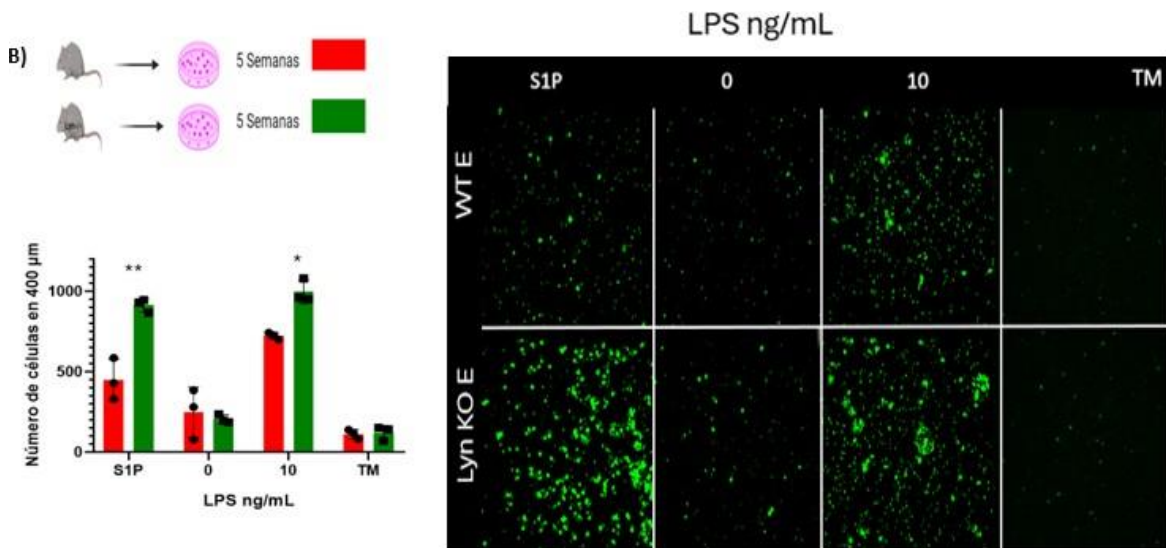
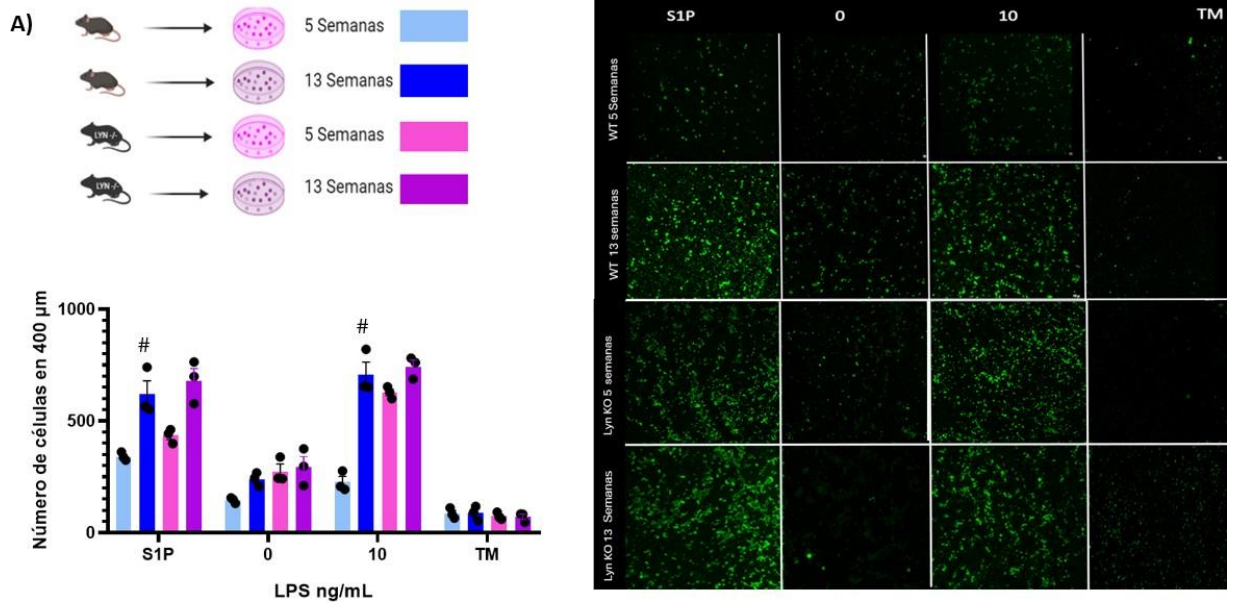


Figura 15: Migración de BMMCs senescentes Lyn KO tras la estimulación del TLR4
Migración de BMMCs tras la estimulación del TLR4. Se muestran imágenes representativas de migración de un experimento independiente (n=3). Microscopia confocal 10x, filtro Alexa 480. En el primer recuadro esfingosina 1-fosfato (S1P) control positivo, segundo concentración 0 ng/mL LPS, tercero concentración 10 ng/mL LPS, cuarto recuadro medio de migración (TM) control negativo. Replicación grupo WT 5 semanas en comparación con WT 13 semanas y WT E. Datos analizados con ANOVA de dos vías y prueba post hoc TUKEY. $p \leq 0.05$

8.- Discusión

Las células cebadas desarrollan senescencia replicativa en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Las células cebadas tienen una vida media larga de duración de años en los tejidos donde residen y no se conocen las condiciones en las cuales pudieran expresar marcadores de senescencia. Uno de esos marcadores (detectado en múltiples tipos celulares) es la expresión de p21, debido a que esa proteína participa en el arresto del ciclo celular (Barboza et al., 2006). La expresión de p21 se presentó en los dos modelos, tanto en aquel donde las BMMCs se mantuvieron durante 13 semanas en cultivo como en el modelo donde los precursores fueron aislados de animales envejecidos y cultivados solo 5 semanas. Independientemente del modelo utilizado, la producción del RNAm para la IL-6 y la secreción de esa citocina fue mayor en células senescentes que en células jóvenes. Nuestros resultados indican que ambas estrategias experimentales para inducir senescencia en las CC mimetizan un fenotipo similar. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos en otros tipos celulares del sistema inmune, como los macrófagos de la médula ósea en ratones y humanos envejecidos muestran un fenotipo activado, lo que significa que exhiben mayor expresión de señales inflamatorias. Esto implica que están en un estado de activación crónica, produciendo y liberando citocinas inflamatorias. (B. J. Frisch et al., 2019).

A pesar de que los RNAm para las citocinas proinflamatorias aumentaron en ambos modelos de senescencia, encontramos que la secreción de esas citocinas (por lo menos al tiempo que utilizamos) tiene un comportamiento diferente, ya que la IL-1 β (cuyo RNA se incrementa) no es secretada en grandes cantidades en células senescentes *in vitro*. Una de las razones por las que esto pudo haber sucedido es que la secreción de IL-1 β , a diferencia de la IL-6, depende de la activación del inflammasoma y la caspasa 1 (Baker et al., 2011) y es posible que eso ocurra solamente en las células provenientes de animales envejecidos. En un estudio en macrófagos provenientes de médula ósea de ratones envejecidos, se observó un aumento de la IL-1 β .

Además, la actividad de la caspasa-1, una enzima que procesa la pro-IL-1 β para convertirla en su forma activa, está aumentada en los macrófagos de ratones envejecidos (B. J. Frisch et al., 2019). Además, se ha descrito el comportamiento de los precursores de la médula ósea como su capacidad para autorrenovarse, diferenciarse en otros tipos de células y morir por apoptosis fenómeno regulado por factores tanto internos como externos. Entre los factores internos se incluyen las redes que controlan la transcripción genética y el metabolismo celular. Los factores externos abarcan citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, metabolitos, y moléculas que provienen de patógenos. (Kovtonyuk et al., 2016). Estos factores no se encuentran presentes en el modelo *in vitro*, lo cual pudo crear una diferencia en la secreción de algunas citocinas características del SASP. Este es un aspecto que deberá explorarse en el futuro.

Las células cebadas generadas en los dos modelos de senescencia presentan cambios en la vía de señalización del TLR4.

La vía de señalización del TLR4, activada por el LPS, ha sido estudiada en diferentes células del sistema inmune. Sin embargo, no se conoce cómo podría afectarse por la senescencia en las CC. En este trabajo se encontró que la senescencia no altera la expresión basal del receptor TLR4 y que su estimulación induce una internalización similar en células jóvenes o senescentes. Ese fenómeno ha sido observado previamente, ya que la endocitosis del receptor TLR4 inducida por su ligando es consecuencia de su activación y su acoplamiento con los adaptadores TRAM y TRIF. La endocitosis de TLR4, regulada por CD14 y varios factores citosólicos, es crucial para la señalización dependiente de TRIF y la activación de los genes de los interferones tipo b (Tan et al., 2015).

Aunque la senescencia celular no pareció alterar ni la expresión o la internalización del TLR4 en respuesta al LPS, la expresión de los RNAm para la IL-6, la IL-1 β y CXCL-1 tuvo un aumento en las células senescentes que en las células no senescentes (independientemente del modelo) y lo mismo ocurrió para la fosforilación de la subunidad p65 de NF κ B. Esto sugiere que el proceso de senescencia altera elementos río abajo del receptor TLR4 y ocasiona una hiper-respuesta al LPS. Estos resultados son congruentes con los obtenidos por (Kim et al., 2023). El envejecimiento también provoca que el sistema inmunológico funcione de manera anormal a través de los receptores que detectan patrones (PRR), como los receptores TLR. Este desajuste en la regulación del sistema inmunológico puede contribuir a enfermedades relacionadas con la edad, como problemas cardiovasculares, metabólicos y degenerativos.

Cuando analizamos la secreción de las citocinas IL-6, IL-1 β y CXCL2 en respuesta al LPS, observamos que solamente las CC senescentes producidas en el modelo *in vivo* (pero no aquellas generadas en el modelo *in vitro*) presentaron un incremento en la exocitosis de esas citocinas. Estos resultados sugieren que el proceso de senescencia que ocurre *in vivo* modifica la maquinaria secretora de las CC, y que este fenómeno no es reproducible por el transcurso de divisiones celulares *in vitro*. Esto puede deberse a la presencia de ciertos factores de crecimiento y diferenciación presentes en la médula ósea de los ratones durante el envejecimiento, los cuales podrían afectar a los precursores inmunes. Estos factores no están en el modelo *in vitro*, lo que explicaría el fenómeno. Hasta la fecha, no se tiene información acerca de la producción de factores específicos en la médula ósea de animales envejecidos ni se sabe su posible influencia sobre el proceso de maduración e inducción de capacidades secretoras en células inmunes.

Cuando se analizó la activación del factor de transcripción NF- κ B encontramos que la expresión basal de la subunidad p65 aumentó en células senescentes generadas con ambos modelos. En respuesta al LPS, las células senescentes del modelo *in vivo* tuvieron un incremento mayor al observado en células no senescentes, mostrando una hiper-reactividad al estímulo inflamatorio. Sin embargo, las CC senescentes del modelo *in vitro* no mostraron ese fenómeno, ya que, la adición de LPS no aumentó la fosforilación de esa proteína (más allá de su basal elevado). Estos datos son congruentes con lo que observamos en la secreción de citocinas, indicando que la senescencia *in vivo* va acompañada de cambios importantes asociados a la activación de la vía de producción de citocinas pro-inflamatorias y que esas alteraciones no son reproducibles en el modelo de inducción de senescencia *in vitro*. Futuros experimentos deberán diseñarse para estudiar la activación de otros factores de transcripción activados río abajo del TLR4, como AP-1, ETS-1 o CREB, que podrían participar en la síntesis de los RNAm para citocinas proinflamatorias en las CC senescentes.

Caracterización del SASP de células cebadas senescentes

El análisis del SASP en CC senescentes producidos en ambos modelos muestra que la senescencia altera de manera importante la secreción de citocinas en las CC, pero que los cambios específicos dependen de la manera en que la senescencia es generada. Así, cuando la senescencia se induce por replicación continua *in vitro*, la IL-6 se convierte en el principal componente del SASP en ausencia de estimulación, mientras que, cuando la senescencia se produce *in vivo*, el IFN β y la IL-1 β , junto con la IL-6, se secretan en proporción similar. Ante el reto con LPS, la senescencia producida *in vitro* induce un SASP caracterizado principalmente por IL-6 y la quimiocina MCP-1, mientras que la senescencia producida *in vivo* lleva a un SASP

donde la IL-6 se secreta de manera predominante. Estos resultados son congruentes con los trabajos de otros grupos de investigación que muestran que las células del sistema inmune innato sufren modificaciones importantes en su secretoma durante la senescencia. Por ejemplo, en células endoteliales senescentes se midió el SASP tras la estimulación con LPS, observando un aumento significativo de IL-6, CXCL2, MMP-3, TNF- α y MCP-3 (Abdelgawad et al., 2023). Por otro lado, nuestros datos muestran que el IFN- β (una citocina muy poco explorada como componente del SASP) sufre cambios importantes durante la senescencia de las CC. La secreción de IFN- β puede influir en la actividad proinflamatoria de las células senescentes y regular la expresión de genes que contribuyen a la respuesta antiviral. La disminución de IFN- β en las BMMCs senescentes in vivo nos indica que existe una menor respuesta antiviral, algo que ha sido reportado como característica dentro del envejecimiento, pero no relacionado, hasta ahora, con las células cebadas (S. M. Frisch & MacFawn, 2020). El incremento de MCP-1 en BMMCs senescentes en respuesta al LPS podría tener como consecuencia un mayor reclutamiento de monocitos a los sitios de inflamación, lo que se ha observado en modelos de aterosclerosis (Suzuki et al., 2022). La presencia aumentada de monocitos en tejidos senescentes puede contribuir a la inflamación crónica y a la progresión de diversas patologías relacionadas con la edad. En estas condiciones, los monocitos pueden diferenciarse en macrófagos, los cuales pueden engullir células senescentes y restos celulares, pero también pueden perpetuar la inflamación local al secretar más citocinas inflamatorias. El posible papel de las CC senescentes en la activación de monocitos dependiente de MCP-1 debería explorarse en el futuro.

Los estudios de quimiotaxis mostraron que el estado de senescencia ocasiona un aumento importante en la capacidad migratoria de las BMMCs y que esto fue independiente del modelo utilizado para inducir senescencia. Estos resultados son congruentes con los obtenidos en otros tipos celulares, en los que se ha descrito que un estado senescente no solo detiene la proliferación celular, sino que también altera la función y el comportamiento de las células, incluida su capacidad de migración celular (Childs et al., 2015). La migración celular se relaciona con proteínas de adhesión endotelial y la secreción de diferentes quimioatrayentes que se incrementan durante la senescencia. Por ejemplo, la senescencia replicativa de las células endoteliales contribuye a la disfunción endotelial, ya que las células endoteliales senescentes y dañadas muestran una producción reducida de óxido nítrico, mayor permeabilidad vascular y una mayor expresión de moléculas de adhesión superficial, como ICAM-1 y VCAM-1 que promueve una mayor migración (Bentzon et al., 2014). Estas características en conjunto modifican la migración celular creando una mayor migración en la senescencia. Se sabe que las células

cebadas de tejido mucosal (como las estudiadas en este trabajo) migran hacia los sitios donde se produce inflamación y contribuyen a la reparación tisular o la perpetuación del daño. Nuestros datos sugieren fuertemente que las CC senescentes tienen mayor capacidad de llegar a los tejidos dañados y ejercer funciones efectoras asociadas a las citocinas que componen el SASP. En un futuro, sería importante poner a prueba esa hipótesis en un modelo *in vivo* de inflamación.

La cinasa Lyn como un regulador negativo importante de la senescencia de las CC.

Con respecto a la cinasa Lyn, nuestros resultados mostraron un incremento en la expresión de p21 en ambos modelos de senescencia. El incremento en p21 también sucede en las células no senescentes. Este resultado sugiere que Lyn es un regulador negativo de la senescencia en CC. Este hallazgo que no ha sido reportado anteriormente. Este papel de Lyn pudo observarse también al determinarse la expresión de los RNAm para IL-6 e IL-1 β . Sin embargo, en el parámetro de los RNAm para esas citocinas, la función de Lyn sólo fue evidente en el modelo de senescencia *in vitro*, sugiriendo, de nuevo, que ciertos cambios deben producirse en la médula ósea de los ratones envejecidos que deben influir en el desarrollo de senescencia en las células inmunes maduras.

En cuanto al SASP, encontramos que la cinasa Lyn tiene un papel diferencial en el control de la secreción de citocinas, ya que, por ejemplo, regula negativamente la secreción de IL-6 y CXCL1 en células no senescentes (al menos en el modelo *in vitro*), pero tiene un papel positivo en las células senescentes en ese mismo modelo. En el modelo *in vivo*, Lyn no parece tener papel alguno en la producción de IL-6 y controla parcialmente la síntesis de CXCL1. De hecho, en el modelo de inducción de senescencia *in vivo*, Lyn sólo es un regulador negativo en la síntesis de IL-1 β .

La cinasa Lyn controla el secretoma de las CC

Analizando el perfil de citocinas secretadas en células no senescentes, observamos que la ausencia de la cinasa Lyn modifica de manera importante el secretoma de la BMMCs. Las citocinas más secretadas en células no senescentes fueron IFN β e IL-6, mientras que, en las células Lyn KO no senescentes, el IFN β fue variable. Además, en células no senescentes carentes de Lyn, la cantidad de IL-6 aumentó hasta sobrepasar el 60% del total del perfil secretor. Esto indica que Lyn es un regulador negativo de la síntesis basal de CXCL1, y es un regulador

positivo del IFN β en células no senescentes. Sin embargo, el papel de Lyn como regulador de la producción de esas citocinas cambió con el desarrollo de la senescencia y fue dependiente del modelo utilizado. Por ejemplo, en células generadas en el modelo in vitro, la ausencia de Lyn llevó a un incremento del IFN β , y a un aumento en MCP-1. En el modelo de senescencia in vivo, la ausencia de Lyn llevó a un incremento importante en CXCL1. Esto sugiere que Lyn controla de manera importante la producción de citocinas en las CC y que su papel cambia en el estado de senescencia. Se ha demostrado que en ratones carentes de Lyn se presentan niveles más altos inflamación y el padecimiento de enfermedades autoinmunes, es decir Lyn regula negativamente la inflamación (Lamagna et al., 2014). La deficiencia puede activar vías de señalización de senescencia, como p21 y p16, y aumentar la secreción de factores inflamatorios, sin que las células hayan llegado al estado de senescencia. En células no senescentes se ha observado una hiperactivación de las CC en ausencia de Lyn, debido al incremento de la activación de otra cinasa llamada Fyn (Gómez, et al., 2005). Sin embargo, cuando se presenta el estado de senescencia, las vías de señalización que involucran a Lyn pueden presentar alteraciones diferenciales dependiendo del modelo utilizado.

Un hallazgo relevante fue encontrar que, en el modelo de senescencia in vivo, la ausencia de Lyn conduce a la secreción aumentada de la citocina anti-inflamatoria IL-10 (Carlini et al., 2023). Este aspecto puede ser sujeto de investigación en el futuro, debido a que el papel anti-inflamatorio de las CC ha sido descrito en algunas patologías y esto podría estar relacionado a su estado de senescencia y al estado de activación de la cinasa Lyn.

Papel de la cinasa Lyn en la activación del TLR4 en BMMCs senescentes.

En ausencia de la cinasa Lyn se observó un incremento en la cantidad del receptor TLR4 en la superficie celular y esto no cambió después de la adición de LPS. Esto indica que Lyn no participa en el control de la síntesis del TLR4, pero sí en su activación, ya que el receptor no es endocitado en respuesta al LPS. Nuestro laboratorio describió hace tiempo el papel que la cinasa Lyn tiene en el sistema de señalización del receptor TLR4 en células no senescentes (Ávila et al., 2012), por lo que estos resultados son congruentes con nuestras observaciones previas.

Sin embargo, al analizar la expresión de los RNAs de citocinas pro-inflamatorias, observamos que la cinasa Lyn no parece tener influencia en la acumulación del RNA de IL-6 o de IL-1 β en respuesta al LPS, y tiene una influencia modesta en la síntesis de CXCL1 cuando las células son generadas en el modelo de senescencia *in vitro*. En marcado contraste, cuando se analizaron las células senescentes generadas en el modelo *in vivo*, encontramos que la cinasa Lyn tiene un papel regulador negativo en la síntesis de IL-1 β , IL-6 y CXCL1 en respuesta al LPS. Estos datos muestran, por primera vez, que esta cinasa regula un mecanismo que mantiene limitada la cantidad de citocinas pro-inflamatorias sintetizadas en células cebadas senescentes en respuesta a la estimulación del receptor TLR4.

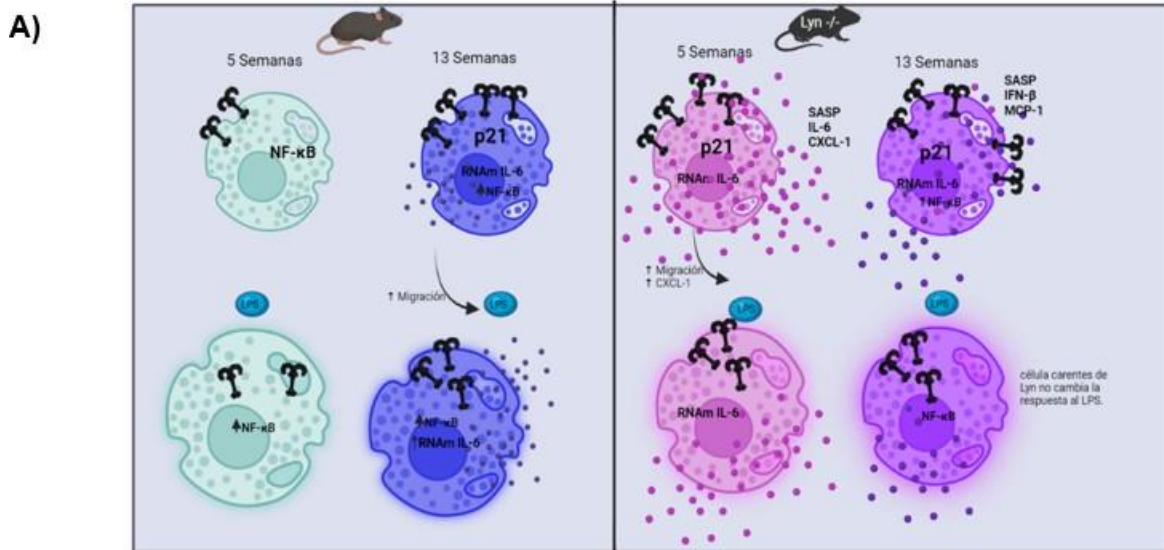
Lyn como regulador del perfil secretor y la migración dependiente del TLR4 en las células cebadas.

El análisis del papel de Lyn en el perfil de citocinas secretadas en respuesta al LPS mostró que esta cinasa regula negativamente la síntesis de IL-6 estimulada por el TLR4 en células generadas en el modelo *in vitro*. En el modelo de senescencia *in vivo*, Lyn mostró controlar la síntesis de IL-10 en respuesta al LPS, aunque de una forma más modesta que en células no senescentes. De manera congruente con el papel regulador de Lyn en los cambios que la senescencia induce en las células cebadas, encontramos que las CC carentes de Lyn muestran una mayor capacidad migratoria hacia el LPS que las células silvestres, y que este fenómeno se observa incluso en CC senescentes Lyn KO, sin importar el modelo utilizado para generar la senescencia. En conjunto, estos datos muestran que Lyn es un blanco molecular de interés para seguir explorando los mecanismos que controlan la activación del receptor TLR4 en las células cebadas y que esos estudios deberían extenderse a CC senescentes.

Los principales resultados de este trabajo se resumen en la Figura 16 A y 16 B. En el modelo de senescencia *in vitro*, puede verse que el papel de la cinasa Lyn participa en una regulación negativa en la expresión de marcadores de senescencia (la expresión de p21, SASP, e incremento de RNAm) inclusive si estas células cebadas provienen de un ratón joven con cinco semanas de cultivo. Por otro lado, en el modelo de inducción de senescencia *in vivo*, se observa un incremento en el SASP, en la producción de RNAm y un incremento en la migración hacia el LPS en las CC silvestres, mientras que el papel de Lyn es inducir en el SASP un fenotipo parcialmente antiinflamatorio con la producción de IL-10 y regula significativamente la producción de citocinas en las CC y que su función se modifica en el estado de senescencia. Además, tras la activación del receptor TLR4 se observó una expresión basal menor del receptor TLR4, que no se modificó con la activación del receptor mediante LPS. No obstante, el SASP aumento la

respuesta proinflamatoria, un fenómeno que no se observó en las células cebadas carentes de Lyn en el modelo *in vitro*.

Las diferencias encontradas en el modelo *in vitro* a diferencia del modelo *in vivo* fueron principalmente en la caracterización del SASP, hasta el momento no se ha estudiado el SASP respecto a cuál es su diferencia en ambos modelos. Se han descrito la ventajas de estudiar el modelo de senescencia *in vitro* para estudiar profundamente, mecanismos moleculares que ocurren durante a un estado senescente, mientras que en el modelo *in vivo* para un entorno de estudio fisiológico (Rabinowitz & Cui, 2023).



B)

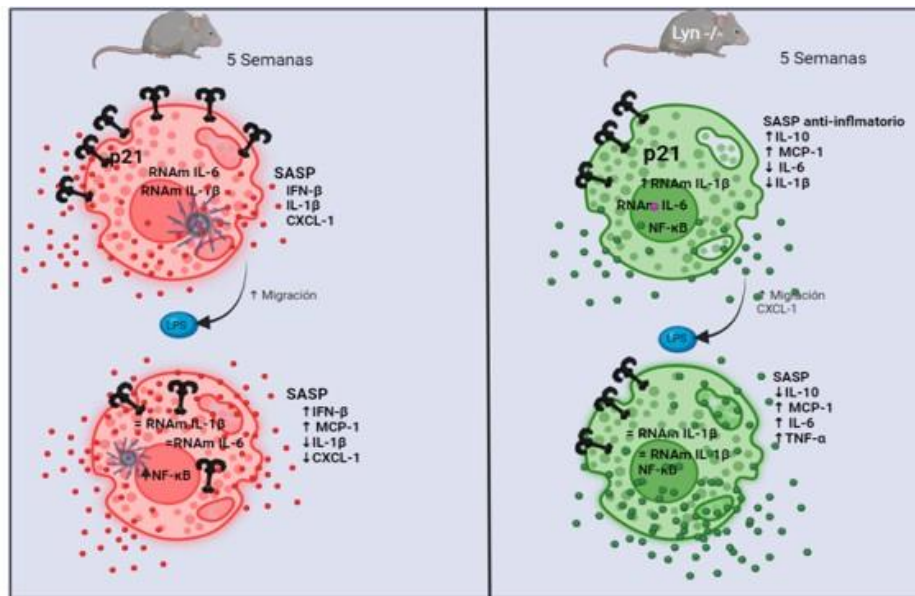


Figura 16: El papel de la cinasa Lyn regula negativamente la aparición de marcadores de senescencia. A) Comparación del papel de la cinasa Lyn en el modelo *in vitro*. La carencia de la cinasa Lyn provocó un fenotipo senescente en las células **B)** Comparación del papel de la cinasa Lyn en el modelo *in vivo*. las células carentes de la cinasa Lyn mostraron un incremento en la producción de citocinas que promueven la migración celular (para mayor detalle leer el texto).

9.- CONCLUSIONES

- 1.- La expresión de los principales marcadores de senescencia en BMMCs de ratones se presentan en modelos de senescencia replicativa *in vitro* e *in vivo*.
- 2.- La senescencia replicativa (*in vitro* e *in vivo*) activa al sistema de señalización del receptor TLR4 en BMMCs lo que provoca una respuesta disminuida tras la activación del receptor TLR4
- 3.-La cinasa Lyn es un regulador negativo en la expresión de marcadores de senescencia en las BMMCs en modelos de senescencia replicativa *in vitro* e *in vivo*.
- 4.-En modelos de senescencia *in vitro* e *in vivo* de BMMC la cinasa Lyn regula negativamente el sistema de señalización del receptor TLR4, esta regulación se aprecia mejor en el modelo de senescencia *in vivo*.

5. A pesar de sus similitudes, las BMMCs generadas en los modelos de inducción de senescencia *in vitro* e *in vivo* tienen diferencias significativas en la expresión de varios parámetros, lo que sugiere fuertemente que el envejecimiento va acompañado de cambios en los mecanismos de diferenciación de los precursores de las células de la inmunidad innata residentes en la médula ósea.

10.- PERSPECTIVAS

1. Continuar con la caracterización de las funciones efectoras de las BMMCs senescentes comparando los resultados obtenidos de modelos *in vitro* e *in vivo*.
2. Estudiar las consecuencias fisiológicas de la senescencia de las BMMCs en padecimientos crónico-degenerativos donde se ha demostrado la participación de las células cebadas.
3. Analizar con mayor profundidad el papel de la cinasa Lyn en el desarrollo de la senescencia de las BMMCs.
4. Profundizar en los cambios que el envejecimiento ocasiona en la médula ósea y cómo influyen en el desarrollo de los precursores de las células del sistema inmune innato, como las BMMCs.

11.- BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Kader, S. M., & Al-Shreef, F. M. (2018). Inflammatory cytokines and immune system modulation by aerobic versus resisted exercise training for elderly. *African Health Sciences*, 18(1), 120–131. <https://doi.org/10.4314/ahs.v18i1.16>
- Aiello, A., Farzaneh, F., Candore, G., Caruso, C., Davinelli, S., Gambino, C. M., Ligotti, M. E., Zareian, N., & Accardi, G. (2019). Immunosenescence and its hallmarks: How to oppose aging strategically? A review of potential options for therapeutic intervention. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02247>
- Barboza, J. A., Liu, G., Ju, Z., El-Naggar, A. K., & Lozano, G. (2006). *p21* delays tumor onset by preservation of chromosomal stability. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0606343104

- Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R., & Falk, E. (2014). Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation Research*, *114*(12), 1852–1866. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302721>
- Berenbaum, F., Humbert, L., Bereziat, G., & Thirion, S. (2003). Concomitant recruitment of ERK1/2 and p38 MAPK signalling pathway is required for activation of cytoplasmic phospholipase A2 via ATP in articular chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(16), 13680–13687. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211570200>
- Beutler, B., Hoebe, K., Du, X., & Ulevitch, R. J. (2003). How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *Journal of Leukocyte Biology*, *74*(4), 479–485. <https://doi.org/10.1189/jlb.0203082>
- Burd, P. R., Rogers, H. W., Gordon, J. R., Martin, C. A., Jayaraman, S., Wilson, S. D., Dvorak, A. M., Galli, S. J., Dorf, M. E., Hospital, B. I., & Dana, C. A. (n.d.). *INTERLEUKIN 3-DEPENDENT AND-INDEPENDENT MAST CELLS STIMULATED WITH IgE AND ANTIGEN EXPRESS MULTIPLE CYTOKINES*. <http://rupress.org/jem/article-pdf/170/1/245/1670308/245.pdf>
- Chen, C.-C., Grimbaldston, M. A., Tsai, M., Weissman, I. L., & Galli, S. J. (2005). *Identification of mast cell progenitors in adult mice*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0504197102
- Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & Van Deursen, J. M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: From mechanisms to therapy. In *Nature Medicine* (Vol. 21, Issue 12, pp. 1424–1435). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nm.4000>
- Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: The dark side of tumor suppression. In *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* (Vol. 5, pp. 99–118). <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>
- Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biology*, *6*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>
- Dhawan, P., & Richmond, A. (n.d.). *Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma*.
- Ferhat, M., Robin, A., Giraud, S., Sena, S., Goujon, J. M., Touchard, G., Hauet, T., Girard, J. P., Gombert, J. M., Herbelin, A., & Thierry, A. (2018). Endogenous IL-33 contributes to kidney ischemia-reperfusion injury as an alarmin. *Journal of the American Society of Nephrology*, *29*(4), 1272–1288. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017060650>
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., Luca, M. DE, Ottaviani, E., & Benedictis, G. DE. (n.d.). *Inflamm-aging An Evolutionary Perspective on Immunosenescence INTRODUCTION: THE NETWORK HYPOTHESIS OF AGING*.
- Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., Giunta, S., Olivieri, F., Sevini, F., Panourgia, M. P., Invidia, L., Celani, L., Scurti, M., Cevenini, E., Castellani, G. C., & Salvioli, S. (2007). Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms of Ageing and Development*, *128*(1), 92–105. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.016>

- Frisch, B. J., Hoffman, C. M., Latchney, S. E., LaMere, M. W., Myers, J., Ashton, J., Li, A. J., Saunders, J., Palis, J., Perkins, A. S., McCabe, A., Smith, J. N. P., McGrath, K. E., Rivera-Escalera, F., McDavid, A., Liesveld, J. L., Korshunov, V. A., Elliott, M. R., MacNamara, K. C., ... Calvi, L. M. (2019). Aged marrow macrophages expand platelet-biased hematopoietic stem cells via interleukin-1B. *JCI Insight*, 4(10). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.124213>
- Frisch, S. M., & MacFawn, I. P. (2020). Type I interferons and related pathways in cell senescence. In *Aging Cell* (Vol. 19, Issue 10). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ace1.13234>
- Galli, S. J., Kalesnikoff, J., Grimbaldston, M. A., Piliponsky, A. M., Williams, C. M. M., & Tsai, M. (2005). Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: Recent advances. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 23, pp. 749–786). <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141025>
- Hálová, I., Dráberová, L., Bambousková, M., MacHyna, M., Stegurová, L., Smrž, D., & Dráber, P. (2013). Cross-talk between tetraspanin CD9 and transmembrane adaptor protein non-T cell activation linker (NTAL) in mast cell activation and chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(14), 9801–9814. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.449231>
- Halova, I., Draberova, L., & Draber, P. (2012). Mast cell chemotaxis chemoattractants and signaling pathways. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 3, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00119>
- Haque, T. T., & Frischmeyer-Guerrero, P. A. (2022). The Role of TGFβ and Other Cytokines in Regulating Mast Cell Functions in Allergic Inflammation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 18). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms231810864>
- Hellmich, C., Wojtowicz, E., Moore, J. A., Mistry, J. J., Jibril, A., Johnson, B. B., Smith, J. G. W., Beraza, N., Bowles, K. M., & Rushworth, S. A. (2023). p16INK4A-dependent senescence in the bone marrow niche drives age-related metabolic changes of hematopoietic progenitors. *Blood Advances*, 7(2), 256–268. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022007033>
- Hernandez-Hansen, V., Mackay, G. A., Lowell, C. A., Wilson, B. S., & Oliver, J. M. (2004). The Src kinase Lyn is a negative regulator of mast cell proliferation. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(1), 143–151. <https://doi.org/10.1189/jlb.0503224>
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. In *Nature Immunology* (Vol. 11, Issue 5, pp. 373–384). <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
- Kawai, T., Ikegawa, M., Ori, D., & Akira, S. (2024). Decoding Toll-like receptors: Recent insights and perspectives in innate immunity. In *Immunity* (Vol. 57, Issue 4, pp. 649–673). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.03.004>
- Kim, H. J., Kim, H., Lee, J. H., & Hwangbo, C. (2023). Toll-like receptor 4 (TLR4): new insight immune and aging. In *Immunity and Ageing* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12979-023-00383-3>
- Kovtonyuk, L. V., Fritsch, K., Feng, X., Manz, M. G., & Takizawa, H. (2016). Inflamm-aging of hematopoiesis, hematopoietic stem cells, and the bone marrow microenvironment. In

- Frontiers in Immunology* (Vol. 7, Issue NOV). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00502>
- Kreis, N.-N., Friemel, A., Zimmer, B., Roth, S., Rieger, M. A., Rolle, U., Louwen, F., & Yuan, J. (2016). *Mitotic p21 Cip1/CDKN1A is regulated by cyclin-dependent kinase 1 phosphorylation* (Vol. 7, Issue 31). www.impactjournals.com/oncotarget
- Krystel-Whittemore, M., Dileepan, K. N., & Wood, J. G. (2016). Mast cell: A multi-functional master cell. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 6, Issue JAN). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00620>
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187–195. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>
- Lobb, C. (n.d.-a). *Hannah & Huia*.
- Lobb, C. (n.d.-b). *Hannah & Huia*.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. In *Cell* (Vol. 153, Issue 6, p. 1194). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. In *Cell* (Vol. 186, Issue 2, pp. 243–278). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>
- Mkaddem, S. Ben, Murua, A., Flament, H., Titeca-Beauport, D., Bounaix, C., Danelli, L., Launay, P., Benhamou, M., Blank, U., Daugas, E., Charles, N., & Monteiro, R. C. (2017). Lyn and Fyn function as molecular switches that control immunoreceptors to direct homeostasis or inflammation. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00294-0>
- Myriantopoulos, V., Evangelou, K., Vasileiou, P. V. S., Cooks, T., Vassilakopoulos, T. P., Pangalis, G. A., Kouloukoussa, M., Kittas, C., Georgakilas, A. G., & Gorgoulis, V. G. (2019). Senescence and senotherapeutics: a new field in cancer therapy. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 193, pp. 31–49). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.08.006>
- Nagata, K., & Nishiyama, C. (2021). IL-10 in mast cell-mediated immune responses: Anti-inflammatory and proinflammatory roles. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22094972>
- Prieto, L. I., Graves, S. I., & Baker, D. J. (2020). Insights from In Vivo Studies of Cellular Senescence. In *Cells* (Vol. 9, Issue 4). NLM (Medline).
<https://doi.org/10.3390/cells9040954>
- Rabinowitz, Z. M., & Cui, L. (2023). Detecting cellular senescence in vivo: Imagining imaging better. *Aging and Cancer*, 4(3–4), 97–110. <https://doi.org/10.1002/aac2.12067>
- Revisión, A. DE, Marcio Barros de Oliveira, C., Kimiko Sakata, R., Machado Issy, A., Roberto Gerola, L., & Salomão, R. (2011). Citocinas y Dolor. In *Revista Brasileira de Anestesiologia* (Vol. 137, Issue 2).

- Rietschel, E. T., Galanos, C., Tanaka, A., Ruschmann, E., Luderitz, O., & Westpu, O. (1971). Biological Activities of Chemically Modified Endotoxins. In *Eur. J. Biochem* (Vol. 22).
- Rosillo, M. A., Alarcón-De-La-Lastra, C., & Sánchez-Hidalgo, M. (2016). An update on dietary phenolic compounds in the prevention and management of rheumatoid arthritis. In *Food and Function* (Vol. 7, Issue 7, pp. 2943–2969). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c6fo00485g>
- Salmeron, K., Aihara, T., Redondo-Castro, E., Pinteaux, E., & Bix, G. (2016). IL-1alpha induces angiogenesis in brain endothelial cells in vitro: Implications for brain angiogenesis after acute injury. *Journal of Neurochemistry*, 136(3), 573–580. <https://doi.org/10.1111/jnc.13422>
- Salminen, A., Huuskonen, J., Ojala, J., Kauppinen, A., Kaarniranta, K., & Suuronen, T. (2008). Activation of innate immunity system during aging: NF-kB signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 7, Issue 2, pp. 83–105). <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.09.002>
- Sati, S., Bonev, B., Szabo, Q., Jost, D., Bensadoun, P., Serra, F., Loubiere, V., Papadopoulos, G. L., Rivera-Mulia, J. C., Fritsch, L., Bouret, P., Castillo, D., Gelpi, J. L., Orozco, M., Vaillant, C., Pellestor, F., Bantignies, F., Marti-Renom, M. A., Gilbert, D. M., ... Cavalli, G. (2020). 4D Genome Rewiring during Oncogene-Induced and Replicative Senescence. *Molecular Cell*, 78(3), 522-538.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.007>
- SenGupta, S., Hein, L. E., & Parent, C. A. (2021). The Recruitment of Neutrophils to the Tumor Microenvironment Is Regulated by Multiple Mediators. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.734188>
- Singh, S., Sadanandam, A., & Singh, R. K. (2007). Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. In *Cancer and Metastasis Reviews* (Vol. 26, Issues 3–4, pp. 453–467). <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9068-9>
- Song, Y., Shen, H., Schenten, D., Shan, P., Lee, P. J., & Goldstein, D. R. (2012). Aging enhances the basal production of IL-6 and CCL2 in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(1), 103–109. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.236349>
- Suzuki, R., Leach, S., Liu, W., Ralston, E., Scheffel, J., Zhang, W., Lowell, C. A., & Rivera, J. (2014). Molecular editing of cellular responses by the high-affinity receptor for IgE. *Science*, 343(6174), 1021–1025. <https://doi.org/10.1126/science.1246976>
- Tan, Y., Zanoni, I., Cullen, T. W., Goodman, A. L., & Kagan, J. C. (2015). Mechanisms of Toll-like Receptor 4 Endocytosis Reveal a Common Immune-Evasion Strategy Used by Pathogenic and Commensal Bacteria. *Immunity*, 43(5), 909–922. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.008>
- Tarabykina, S., Griffiths, T. R. L., Tulchinsky, E., Mellon, J. K., Bronstein, I. B., & Kriajevska, M. (2007). Metastasis-Associated Protein S100A4: Spotlight on its Role in Cell Migration. In *Current Cancer Drug Targets* (Vol. 7).
- Tatara, Y., Ohishi, M., Yamamoto, K., Shiota, A., Hayashi, N., Iwamoto, Y., Takeda, M., Takagi, T., Katsuya, T., Ogihara, T., & Rakugi, H. (2009). Macrophage inflammatory protein-1 β induced cell adhesion with increased intracellular reactive oxygen species. *Journal of*

Molecular and Cellular Cardiology, 47(1), 104–111.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.03.012>

Wernersson, S., & Pejler, G. (2014). Mast cell secretory granules: Armed for battle. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 14, Issue 7, pp. 478–494). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/nri3690>

Zhang, R., Liu, Q., Peng, J., Wang, M., Li, T., Liu, J., Cui, M., Zhang, X., Gao, X., Liao, Q., & Zhao, Y. (2020). CXCL5 overexpression predicts a poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma and is correlated with immune cell infiltration. *Journal of Cancer*, 11(9), 2371–2381. <https://doi.org/10.7150/jca.40517>

Zhang, Y., Dépond, M., He, L., Foudi, A., Kwarteng, E. O., Lauret, E., Plo, I., Desterke, C., Dessen, P., Fujii, N., Opolon, P., Hérault, O., Solary, E., Vainchenker, W., Joulin, V., Louache, F., & Wittner, M. (2016). CXCR4/CXCL12 axis counteracts hematopoietic stem cell exhaustion through selective protection against oxidative stress. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep37827>

ANEXOS

ANEXO I

Descripción de las principales citocinas y quimiocinas reguladoras de la inflamación y su participación en el envejecimiento inflamatorio

El envejecimiento inflamatorio se describió inicialmente como un aumento en las concentraciones circulantes de citocinas clásicamente proinflamatorias. Sin embargo, existen muchas alteraciones complejas en la inmunidad adaptativa e innata que también influyen en la secreción de citoquinas antiinflamatorias y proinflamatorias. Con respecto a la inflamación sistémica, se han encontrado niveles circulantes elevados de la proteína C reactiva (PCR) de fase aguda y de citocinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6), en personas de edad avanzada. Se considera que la inflamación desempeña un papel en el desarrollo y el pronóstico de la enfermedad, y los niveles elevados de marcadores inflamatorios se asocian con un mayor riesgo de desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Marcio Barros et al., 2011).

La IL-6 es una citocina proinflamatoria que genera la madurez y la activación de los neutrófilos, la madurez de los macrófagos y la diferenciación/mantenimiento de los linfocitos -T citotóxicos y

de las células N.K (asesinas naturales) Además, activa los astrocitos y la microglía, regulando la expresión de los neuropéptidos posterior a la lesión neuronal, y contribuyendo así para su regeneración. Pero también ejerce propiedades antiinflamatorias durante la lesión(Franceschi et al., 2000.).

Los niveles de interleucina-6 (IL-6) son inicialmente bajos durante la juventud y comienzan a incrementarse alrededor de los 50-60 años en individuos saludables. Este aumento persiste a medida que las personas envejecen, incluso en aquellos que experimentan un envejecimiento exitoso. Se ha observado que altos niveles de IL-6, así como de otras proteínas como las proteínas de fase aguda, lipoproteína, fibrinógeno y otras citocinas proinflamatorias, están presentes en centenarios que mantienen una buena forma física. A pesar de esta presencia en personas de edad avanzada, es importante destacar que los elevados niveles de IL-6 se consideran marcadores poderosos de morbilidad y mortalidad en la población anciana.

La interpretación propuesta es que este aumento en los niveles de IL-6 con la edad puede ser una adaptación exitosa a diversas tensiones experimentadas a lo largo de la vida, incluyendo infecciones. En el caso de los centenarios, se sugiere que el proceso de "inflammaging" alcanza niveles cercanos al umbral de morbilidad y mortalidad, marcando así la última fase de la vida. Esta dinámica puede ser vista como una respuesta adaptativa continua a estresores, y en el caso de los individuos más longevos, la elevación de IL-6 podría reflejar un estado próximo al fin de la vida, donde la probabilidad de morir es considerablemente alta (Franceschi et al.,2000.).

El Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) es una citocina proinflamatoria que desempeña un papel clave en la regulación de respuestas inmunitarias y procesos inflamatorios. Su influencia en la senescencia celular se ha estudiado en diversos contextos celulares, pero la relación específica con las CC podría depender del contexto biológico. Se ha sugerido que la inflamación crónica puede contribuir al proceso de senescencia celular. Las células senescentes secretan diversas moléculas proinflamatorias en lo que se conoce como el fenotipo secretor de células senescentes (SASP), y TNF- α podría ser parte de este perfil de secreción en las CC. TNF- α se ha asociado con diversas enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como enfermedades neurodegenerativas y enfermedades crónicas inflamatorias. Las células senescentes pueden contribuir a la progresión de estas enfermedades, la interacción de TNF- α con las CC puede variar según el entorno (Abd El-Kader & Al-Shreef, 2018).

La interleucina-23 (IL-23) es una citocina que desempeña un papel crucial en la respuesta inmunitaria y la inflamación. Su participación se ha investigado en diversas enfermedades

inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento, como la artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal y aterosclerosis. En términos generales, se ha observado que IL-23 contribuye al mantenimiento de respuestas inmunitarias inflamatorias crónicas, promoviendo la diferenciación y activación de células T específicas, especialmente las células T helper 17 (Th17). Estas respuestas pueden desencadenar procesos inflamatorios persistentes que están relacionados con el desarrollo y la progresión de enfermedades crónicas (Curtis MM. et al; 2009).

La interleucina-27 (IL-27) se reconoce por sus destacadas propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias. En análisis preclínicos, se ha documentado que la IL-27 ejerce un impacto significativo en la modulación de la respuesta inmunitaria, contribuyendo a la atenuación de procesos inflamatorios. La IL-27 influye en la diferenciación y función de diversas células del sistema inmunológico, entre las que se incluyen las células T. Esta capacidad de regular respuestas inmunitarias sugiere la posibilidad de implicaciones relevantes para la salud global y procesos asociados con enfermedades relacionadas con la edad, tales como enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias crónicas, la IL-27 en el envejecimiento y sus implicaciones potenciales en el desarrollo de enfermedades crónicas asociadas con la edad (Stumhofer JS. et al; 2006).

La interleucina IL-1 β es una citocina proinflamatoria clave que desempeña un papel importante en diversas funciones biológicas, incluido el sistema inmunológico y la inflamación. Su participación en el envejecimiento ha sido objeto de estudio. La IL-1 β no solo actúa como un mediador inflamatorio, sino que también interviene en la regulación de otras citoquinas y moléculas señalizadoras, desencadenando respuestas inmunitarias que pueden influir en la salud a lo largo del envejecimiento. Su participación en la red de señalización inflamatoria sugiere que puede tener implicaciones significativas en la patogénesis de enfermedades asociadas con la edad. Estudios recientes en donde se ha medido la IL 1B en adultos muestran una mayor concentración circulante, muy similar a la concentración que se encuentra en enfermos por infecciones virales (Dinarello CA. 2006).

La interleucina (IL-17), es una glucoproteína homodimérica de 155 aminoácidos vinculada a un radical disulfuro. Es producida mayormente por linfocitos-T-CD4, actuando como un homodímero de 35 kDa en linfocitos T. La IL-17A es proinflamatoria, y conduce a la formación de IL-6 y IL-8 (Marcio Barros et al., 2011).

El interferón gamma (IFN- γ) puede desempeñar un papel en la senescencia celular, El IFN- γ puede ser liberado en el microambiente celular en respuesta a infecciones o estímulos inflamatorios. Este entorno puede afectar a las células circundantes y contribuir al desarrollo de la senescencia celular. Se ha observado que el IFN- γ puede inducir la senescencia celular en ciertos contextos. Por ejemplo, estudios han demostrado que la exposición crónica al IFN- γ puede contribuir a la senescencia en células endoteliales (Natarajan VT. et al; 2014). Sin embargo, también puede ser la posibilidad de que el IFN- γ puede ser liberado como parte de la

Citocinas proinflamatorias	función en la senescencia celular/envejecimiento
IL-6	Activación y madurez de células del sistema inmune.
TNF- α	Inflamación crónica.
IL-23	Respuesta autoinmune en el envejecimiento.
IL-27	Diferenciación de células del sistema inmune.
IL-1 β	Regula diferentes citocinas y quimiocinas.
IL-17A	Induce la formación de IL-6 y IL-8
IFN- γ	Induce senescencia celular.

respuesta inmunitaria, Inhibe la senescencia celular al reducir a la baja C/EBP β a través de la vía p-STAT1/p-p65 estrés celular o daño, y esta liberación puede influir en las vías que regulan la senescencia celular. (Kim KS. et al; 2008).

Figura 5.- Diferentes citocinas proinflamatorias. Funciones que han sido caracterizadas en la senescencia celular o en el envejecimiento y cuáles han sido sus principales funciones en dicho fenotipo celular.

1.51 Quimiocinas

Las quimiocinas son pequeñas proteínas, segregadas por las células sanguíneas periféricas, neuronas o células gliales, que ejercen la mayor parte de las funciones a través de la activación de receptores acoplados a la proteína-G (CCR1, CCR2, CCR5, CXCR3, CXCR4 y CX3CR1). Son los responsables primarios de la migración de leucocitos hacia la región de la lesión tisular o infección, y también participan en la transmisión sináptica y en la formación de los sistemas de segundo mensajero en las neuronas y células de la glía, favoreciendo la comunicación celular.

Existen diferentes quimiocinas que participan en la promoción de la senescencia celular ó el envejecimiento. La participación de la quimiocina CCL2 (quimioquina de ligando de C-C), también conocida como MCP-1 participa en la promoción de la senescencia celular en células endoteliales, contribuyendo así al envejecimiento vascular (Song et al., 2012). La quimiocina CXCL8 puede desempeñar un papel en la senescencia prematura de las células troncales (Coppé et al., 2008) Además, la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4 han sido implicados en la modulación de la senescencia celular en diversos contextos fisiológicos y patológicos (Y. Zhang et al., 2016). Se ha establecido a las quimiocinas como un factor importante en la comunicación celular durante el fenotipo de senescencia celular.

1.7.1 Quimiocinas en el envejecimiento

Para el estudio de la senescencia celular se ha sugerido no solo estudiar el SASP de las principales citocinas proinflamatorias, sino el de las quimiocinas que propician que el fenotipo suceda promoviendo la quimiotaxis de las células senescentes o se inhiba.

LIX, o CXCL5, es una quimiocina que ha sido principalmente estudiada en el contexto de la respuesta inflamatoria y la migración celular LIX y la inflamación en el microambiente tumoral, sugiriendo su papel en la promoción de respuestas inflamatorias y el potencial impacto en la senescencia celular (Singh et al., 2007). Otro trabajo señala la implicación de LIX en la movilización de células progenitoras hematopoyéticas, lo que podría tener consecuencias en la homeostasis celular y la senescencia (SenGupta et al., 2021). Además, se ha observado que la quimiocina LIX está regulada en enfermedades inflamatorias crónicas, lo que subraya su papel en la regulación de la respuesta inflamatoria y, por implicación, su potencial conexión con la senescencia celular (R. Zhang et al., 2020).

La quimiocina KC, también conocida como CXCL1 (quimioquina ligando de C-X-C), ha sido objeto de interés en la investigación sobre la senescencia celular. Aunque la literatura específica sobre el papel de CXCL1 en la senescencia es limitada, estudios indican su participación en procesos inflamatorios y regulación de la respuesta inmunitaria.(Dhawan & Richmond, n.d.)

CXCL1 está vinculada a la promoción de la inflamación y podría contribuir a fenómenos de senescencia celular en el contexto de enfermedades crónicas, se ha propuesto que las quimiocinas como CXCL1 pueden tener un papel en la senescencia prematura de células endoteliales (Salmeron et al., 2016).

RANTES también conocida como CCL5 es una quimiocina específica para tipos celulares que expresan receptores transmembrana de tipo CCR1, CCR3 y CCR5 presentes en linfocitos Th1, monocitos/ macrófagos, células dendríticas, basófilos y eosinófilos, induciendo su activación, polarización, proliferación y quimiotaxis.

La expresión de CCL5 puede estar aumentada en células senescentes y contribuir a un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) (Rosillo et al., 2016). en células endoteliales sugieren que CCL5 puede desencadenar la senescencia celular mediante la activación de la ruta de señalización p53-p2. La inhibición de CCL5 puede atenuar la senescencia celular inducida por la radiación en células de carcinoma hepatocelular, sugiriendo un papel clave en respuestas al daño celular (Ferhat et al., 2018).

MIP-1 α y MIP-1 β , han sido identificadas como participantes potenciales en la regulación de la senescencia celular. Se ha implicado a MIP-1 β en la inducción de la senescencia celular en fibroblastos, sugiriendo una conexión con la remodelación del tejido y el envejecimiento tisular (Tatara et al., 2009)

Quimiocinas proinflamatorias	función en la senescencia celular/envejecimiento
CXCL5 (LIX)	Migración celular.
CXCL1 (KC)	Senescencia celular prematura.
CCL5 (RANTES)	Contribuye al SASP en la proliferación celular.
MIP-1 α y MIP-1 β	Remodelación de tejidos en el envejecimiento.

Figura 6.- Diferentes quimiocinas proinflamatorias. Funciones que han sido caracterizadas en la senescencia celular o en el envejecimiento y cuáles han sido sus principales funciones en dicho fenotipo celular.

Migración celular.

La migración celular, un fenómeno fundamental en el desarrollo embrionario, la reparación de tejidos y la respuesta inmunitaria, desempeña un papel esencial en la fisiología y patología celular. Este proceso altamente regulado implica el desplazamiento direccional de las células a

través de tejidos y estructuras extracelulares. Una de las características más notables de la migración celular es su papel crítico en el desarrollo embrionario.

La formación de órganos y tejidos implica la migración coordinada de células precursoras desde su lugar de origen hasta su destino final, este proceso se da por diferentes señales intracelulares dadas por diferentes quimiocinas. Su capacidad para atraer células inmunitarias hacia el sitio de lesión subraya la importancia de las quimiocinas en la migración celular durante procesos regenerativos y de defensa inmunitaria (Tarabykina et al., 2007).

La migración celular es un proceso intrínseco y crucial en la biología celular, regulando eventos desde el desarrollo embrionario hasta la respuesta inmunitaria y contribuyendo a patologías como el cáncer. Las quimiocinas y sus receptores emergen como actores clave en la orquestación de estos movimientos celulares, proporcionando objetivos potenciales para intervenciones terapéuticas.

En las CC, un aspecto esencial de su funcionalidad es su capacidad para migrar hacia sitios específicos en los tejidos, facilitando respuestas rápidas a estímulos externos (Wernersson & Pejler, 2014).

La migración en CC es un fenómeno complejo y altamente regulado. Diversos estudios han identificado varias quimiocinas, moléculas señalizadoras, como actores clave en este proceso. La quimiocina CCL5, también conocida como RANTES, ha sido objeto de investigaciones detalladas en relación con las CC (Kandere-Grzybowska et al. 2003)

ANEXO II

Tablas de 13 citocinas y quimiocinas proinflamatorias detectadas por la técnica de LEGENDplex se muestra la media en pg/mL y SEM.

CITOCINAS PROINFLAMATORIAS (MEDIA ± SEM)													
GRUPO	IL-23	IL-1α	IFN-γ	TNF-α	MCP-1	IL-12p70	IL-1β	IL-10	IL-6	IL-27	IL-17A	IFN-β	GM-CSF
WT 5 WKS	244.6 ± 11.38	1.1 ± 0.04	5.9 ± 0.46	4.4 ± 0.33	39.1 ± 5.5	1.90 ± 0.09	4.28 ± 0.35	N.D.	82.5 ± 49.13	42.6 ± 15.37	2.41 ± 0.17	27.5 ± 4.38	1.3 ± 1.32
WT 5 WKS LPS	220.7 ± 157.74	0.7 ± 0.07	4.9 ± 0.23	8.1 ± 5.32	192.9 ± 34.19	3.01 ± 1.2	2.43 ± 1.14	22.6 ± 22.61	550.5 ± 199	N.D.	0.68 ± 0.36	64.2 ± 1.97	21.7 ± 21.71
WT 13 WKS	N.D.	0.8 ± 0.05	4.9 ± 0.20	2.7 ± 0.97	3.4 ± 1.2	1.51 ± 0.18	0.63 ± 0.27	N.D.	N.D.	N.D.	0.58 ± 0.21	N.D.	N.D.
WT 13 WKS LPS	176.5 ± 18.80	1.0 ± 0.20	5.8 ± 0.88	3.2 ± 1.13	81.1 ± 49.03	3.31 ± 1.15	2.92 ± 0.4	23.7 ± 23.74	137.9 ± 46.02	22.4 ± 2.99	1.93 ± 0.87	N.D.	10.3 ± 10.31
LYN 5 WKS	477.3 ± 81.53	1.8 ± 0.28	6.6 ± 0.40	4.1 ± 0.86	5.7 ± 0.85	2.52 ± 0.65	7.39 ± 0.26	30.8 ± 30.78	188.0 ± 19.79	47.2 ± 20.68	4.80 ± 1.22	34.3 ± 8.40	5.3 ± 5.2
LYN 5 WKS LPS	137.9 ± 75.16	1.4 ± 0.10	5.9 ± 0.30	16.7 ± 8.80	50.8 ± 7.20	2.41 ± 0.62	1.82 ± 0.23	N.D.	435.4 ± 174.32	35.9 ± 2.79	2.39 ± 0.25	16.3 ± 1.12	3.3 ± 3.2
LYN 13 WKS	N.D.	0.9 ± 0.01	5.6 ± 0.47	2.4 ± 0.53	7.0 ± 4.16	1.41 ± 0.19	1.50 ± 1.25	19.4 ± 19.4	31.7 ± 1.3	N.D.	0.71 ± 0.18	N.D.	3.4 ± 3.3
LYN 13 WKS LPS	95.8 ± 60.47	1.3 ± 0.24	5.9 ± 0.70	20.7 ± 0.46	83.1 ± 17.52	1.67 ± 0.16	4.55 ± 1.03	17.1 ± 17.13	477.2 ± 44.64	N.D.	1.81 ± 0.61	18.9 ± 0.12	5.1 ± 5.13
WTE	293.2 ± 44	1.5 ± 0.16	5.7 ± 0.43	4.3 ± 0.40	5.9 ± 1.99	2.54 ± 0.27	4.64 ± 2.47	79.7 ± 26.65	25.9 ± 7.32	N.D.	4.03 ± 2.16	15.4 ± 0.12	4.6 ± 4.51
WTE LPS	290.0 ± 104	1.6 ± 0.42	6.3 ± 0.66	22.6 ± 1.01	40.3 ± 5.89	1.51 ± 0.90	13.53 ± 0.70	115.2 ± 38.40	546.0 ± 67.89	N.D.	8.64 ± 0.22	N.D.	8.8 ± 8.75
LYN E	N.D.	1.5 ± 0.17	6.6 ± 0.91	3.0 ± 0.19	12.0 ± 3.3	1.96 ± 0.46	15.44 ± 1.9	122.4 ± 41.95	50.7 ± 224.44	75.4 ± 8.68	44.65 ± 33.92	15.2 ± 2.31	8.8 ± 8.75
LYN E LPS	352.4 ± 26.84	1.3 ± 0.12	6.3 ± 0.65	56.2 ± 7.21	166.1 ± 2.49	2.63 ± 0.62	6.06 ± 0.84	100.6 ± 35.83	161.3 ± 17.09	164.4 ± 5.25	2.61 ± 0.44	33.2 ± 0.39	22.7 ± 13.20

QUIMIOCINAS PROINFLAMATORIAS (MEDIA Y SEM)					
GRUPO	MIP-1α	MCP-1	CXCL-1	TARC	MDC
WT 5 WKS	1.11 ± 0.36	27.90 ± 6.87	73.52 ± 1.15	0.85 ± 0.7	0.20 ± 0.10
WT 5 WKS LPS	39.98 ± 24.33	120.42 ± 5.82	3.88 ± 1.04	0.74 ± 0.12	0.02 ± 0.02
WT 13 WKS	0.92 ± 0.51	8.07 ± 4.19	N.D.	1.01 ± 0.19	0.15 ± 0.02
WT 13 WKS LPS	11.86 ± 8.80	52.39 ± 39.84	N.D.	1.45 ± 0.53	N.D.
LYN 5 WKS	15.30 ± 13.86	6.25 ± 5.67	45.43 ± 19.76	1.47 ± 0.33	30.17 ± 1.24
LYN 5 WKS LPS	43.58 ± 12.87	43.80 ± 0.94	61.28 ± 4.27	1.61 ± 0.32	30.31 ± 0.13
LYN 13 WKS	2.47 ± 2.18	4.28 ± 0.49	1.69 ± 0.33	0.97 ± 0.31	N.D.
LYN 13 WKS LPS	15.90 ± 8.08	60.72 ± 12.07	0.35 ± 0.08	1.06 ± 0.29	N.D.
WTE	1.00 ± 0.22	13.03 ± 1265	1.65 ± 0.14	0.71 ± 0.6	7.82 ± 0.40
WTE LPS	9.99 ± 4.61	37.46 ± 25.39	1.55 ± 0.11	0.79 ± 0.15	9.25 ± 0.19
LYN E	6.17 ± 5.67	11.63 ± 10.54	N.D.	0.80 ± 0.20	N.D.
LYN E LPS	169.10 ± 161.69	47.83 ± 32.53	3.33 ± 0.17	1.05 ± 0.04	N.D.

