



Universidad de Valladolid

Trabajo Fin de Máster

Máster en Investigación Biomédica

Establecimiento de un modelo celular para el estudio del efecto de la senescencia en astrocitos

Autor: Andrea Álvarez López

Tutora: María Beatriz Durán Alonso

INDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1. SENESCENCIA CELULAR.....	4
2.2. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.....	5
2.3. FUNCIÓN DE LOS ASTROCITOS EN EL SNC. EFECTOS DE LA SENESCENCIA.....	6
2.3.1. Modelos in vitro e in vivo para inducir senescencia en astrocitos..	9
3. OBJETIVOS.....	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1. CULTIVOS CELULARES.....	10
4.2. OBTENCIÓN DE CULTIVOS SENESCENTES.....	11
4.3. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR: CLICK-IT.....	12
4.4. ENSAYO DE β -GALACTOSIDASA.....	12
4.5. EXTRACCIÓN DE RNA.....	13
4.6. SÍNTESIS DE cDNA.....	13
4.7. RT-PCR.....	13
4.8. qPCR.....	13
4.9. INMUNOCITOQUÍMICA.....	15
4.10. OBTENCIÓN DE MEDIO CONDICIONADO	15
4.11. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	15
4.12. WESTERN BLOT.....	16
4.13. ELISA.....	16
4.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	17
5. RESULTADOS.....	18
5.1. ESTABLECIMIENTO DEL MODELO DE SENESCENCIA.....	18
5.1.1. Identificación de las condiciones de cultivo necesarias para inducir senescencia en la línea celular U-87 MG, atendiendo a los parámetros de crecimiento y morfología celular y actividad β - galactosidasa.....	18
5.1.2. Validación de DGal-300-D3 como tratamiento que reduce la proliferación de cultivos de células U-87 MG.....	21
5.1.3. Validación de DGal-200-D3 y DGal-300-D3 como tratamientos que causan una disminución en la expresión del gen Lamin B1 en células U-87 MG.....	22
5.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SENESCENCIA SOBRE LA EXPRESIÓN DE APOD EN CÉLULAS U-87 MG.....	23
6. DISCUSIÓN.....	25
7. CONCLUSIONES.....	27
8. BIBLIOGRAFÍA.....	28

1 RESUMEN

La senescencia es un proceso celular que implica la detención permanente del ciclo celular y la adquisición de una serie de propiedades como una disfunción lisosomal, acompañada de un aumento en los niveles de β -galactosidasa, cambios en la morfología celular y en la expresión de algunos genes como P16^{INK4a} y Lamin B1, y el desarrollo de un fenotipo secretor asociado a la senescencia. Este proceso se produce como respuesta a diversos estímulos, como el acortamiento de los telómeros, el daño al DNA, la activación de oncogenes y la disfunción mitocondrial. Cada vez más, se están asociando los procesos de senescencia al envejecimiento.

Esta investigación se centró en el establecimiento de un modelo celular de senescencia en astrocitos utilizando el monosacárido D-galactosa y una línea celular de glioblastoma humano. Para identificar condiciones de cultivo que indujeran senescencia en estas células, se analizó el efecto de variar la densidad de siembra, la concentración de D-Galactosa, y el número de días de tratamiento. Inicialmente, se seleccionó una combinación de estos factores atendiendo al crecimiento de los cultivos y la detección de actividad β -galactosidasa; estas condiciones se validaron al comprobar que inducían una disminución en la proliferación de los cultivos y en la expresión del gen Lamin B1, uno de los marcadores más fiables de senescencia. Una vez establecido el modelo de senescencia, se analizó el efecto del tratamiento sobre la expresión del gen APOD, ya que está descrito que la expresión de este gen aumenta en otros modelos de envejecimiento y neurodegeneración.

1 ABSTRACT

Senescence is a cellular process that involves the permanent cessation of the cell cycle and the acquisition of a series of properties such as lysosomal dysfunction, accompanied by an increase in β -galactosidase levels, changes in cellular morphology, and changes in the expression of some genes such as P16^{INK4a} and Lamin B1, and the development of a senescence-associated secretory phenotype. This process occurs in response to various stimuli, such as telomere shortening, DNA damage, oncogene activation, and mitochondrial dysfunction. Senescence processes are increasingly being associated with aging.

This research focused on establishing a cellular senescence model in astrocytes using the monosaccharide D-galactose and a human glioblastoma cell line. To identify culture conditions that induced senescence in these cells, the effect of varying seeding density, D-galactose concentration, and the number of days of treatment was analyzed. Initially, a combination of these factors was selected based on the growth of cultures and the detection of β -galactosidase activity; these conditions were validated by confirming that they induced a decrease in the proliferation of cultures and the expression of the Lamin B1 gene, one of the most reliable markers of senescence. Once the senescence model was established, the effect of treatment on the expression of the APOD gene was analyzed since it is described that the expression of this gene increases in other aging and neurodegeneration models.

2 INTRODUCCION

2.1 SENESCENCIA CELULAR

La senescencia es un proceso celular que implica la detención permanente del ciclo celular, y es una respuesta a diferentes tipos de estrés, incluyendo el acortamiento de los telómeros, el daño al DNA, la activación de oncogenes y la disfunción mitocondrial (Figura 1) (1–3). Este proceso se observa en una variedad de tipos celulares, como fibroblastos, células epiteliales, células musculares, hepatocitos y células endoteliales (3–6). En un inicio se pensó que la senescencia celular solo podía prevenir el crecimiento del daño celular, indicando ser protectora frente al cáncer; sin embargo, estudios más recientes han demostrado que las células senescentes están involucradas en el envejecimiento, la disfunción relacionada con el envejecimiento y las enfermedades crónicas (7). Entre las características de las células senescentes destaca la detención del crecimiento celular en fase G1, estas células no entran en fase S como respuesta a diversos mitógenos fisiológicos y, aunque muchos genes siguen siendo inducibles por mitógenos, algunos imprescindibles para la progresión del ciclo son reprimidos (7). También se observa un aumento de los niveles de β -galactosidasa lisosomal, una enzima hidrolasa que cataliza la hidrólisis de los β -galactosidos en monosacáridos. La detección de actividad β -galactosidasa a un pH de 6.0 fue ya propuesta en 1995 por Dimri et al. (8) como un marcador de senescencia; de ahí, la denominación de β -galactosidasa asociada a la senescencia (*senescence-associated β -Gal* o SA- β -Gal) (8). La actividad de SA- β -gal se suele medir mediante una tinción in situ con un sustrato cromogénico como X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) (9). El aumento de los niveles de mRNA y proteína GLB1 en células senescentes hace posible la detección de actividad β -galactosidasa a pH 6.0 (9), condiciones bajo las que, en general, no se detecta su presencia en células no envejecidas. Otras características de células senescentes son que se hacen más grandes, aplanadas y vacuoladas (10) y que acumulan lipofuscina, una proteína autofluorescente que es producto de la peroxidación de lípidos de membranas y que se acumula en las células postmitóticas. Cuando se produce una acumulación mayor de lo normal, se bloquea la proliferación celular en poco tiempo y se induce la muerte celular; así, se concluye que la acumulación de lipofuscina en células postmitóticas no es solo consecuencia del envejecimiento, sino una de las causas importantes de senescencia (11).

También se ha observado que hay cambios en la expresión de algunos genes en células senescentes, como un aumento en la expresión de $p16^{INK4a}$ o una disminución en la expresión de lamina B1. En las células se pueden apreciar cambios en el reordenamiento nuclear. Así, estudios recientes han destacado el papel de la envoltura nuclear en la regulación de la expresión génica. La envoltura nuclear está recubierta por una lámina cuyas principales proteínas estructurales son las llamadas laminas nucleares; entre ellas se encuentran las laminas de tipo B, codificadas por dos genes diferentes, LMNB1 y LMNB2. Ambas proteínas son suficientes para la supervivencia celular individual; sin embargo, la lamina B1 es imprescindible para la supervivencia del organismo y para una organogénesis adecuada. Se ha demostrado que cuando las células experimentan senescencia se produce una pérdida de la lamina B1 y una disminución en los niveles de su mRNA (12). Por otra parte, se ha propuesto que los mediadores de la senescencia, como p53, ARF y $p16^{INK4a}$, juegan un papel en el envejecimiento celular, pues limitan el crecimiento a largo plazo de los compartimentos autorrenovadores de las células madre, necesarias para la regeneración tisular (13). En base a esto, uno de los principales mediadores en la senescencia celular es el supresor tumoral $p16^{INK4a}$, se han detectado altos niveles de expresión de este gen en muchos tejidos durante el envejecimiento; los cambios son relativamente fáciles de medir por análisis cuantitativos de PCR en tiempo real (13). Cambios generalizados en la expresión génica frecuentemente conllevan el desarrollo de un fenotipo secretor asociado a la senescencia (*senescence-associated secretory phenotype* o SASP) (14).

Este fenotipo implica la secreción de más de 40 moléculas distintas en respuesta al daño del DNA; componentes del SASP promueven la detención del crecimiento durante la senescencia, a través de una compleja red que comprende receptores transmembrana IL-6 e IL-8 y los factores de transcripción CEBP- β y NK- κ β (15). El SASP, al ser proinflamatorio puede explicar que la senescencia se relacione con el envejecimiento. Las consecuencias del SASP en los tejidos pueden ser positivas (supresión de tumorigénesis, reparación y regeneración de tejidos) o perjudiciales (inducción de células proinflamatorias, estimulación de la progresión tumoral), dependiendo del contexto celular.

Otro rasgo que caracterizan a las células senescentes es el cambio en la heterocromatina como una condensación cromosómica profunda, de tal forma que cada cromosoma forma un dominio heterocromático punteado, llamado focos de heterocromatina asociados a la senescencia (SAHF). Se ha demostrado que la heterocromatina en células senescentes contiene modificaciones postraduccionales de histonas y proteínas asociadas, como lisina 9 metilada de la histona H3 (H3K9Me). La inclusión de genes promotores de la proliferación, como ciclina A, en dominios de heterocromatina, silencia la expresión de estos genes, contribuyendo a la detención de la proliferación que se asocia con la senescencia (16).

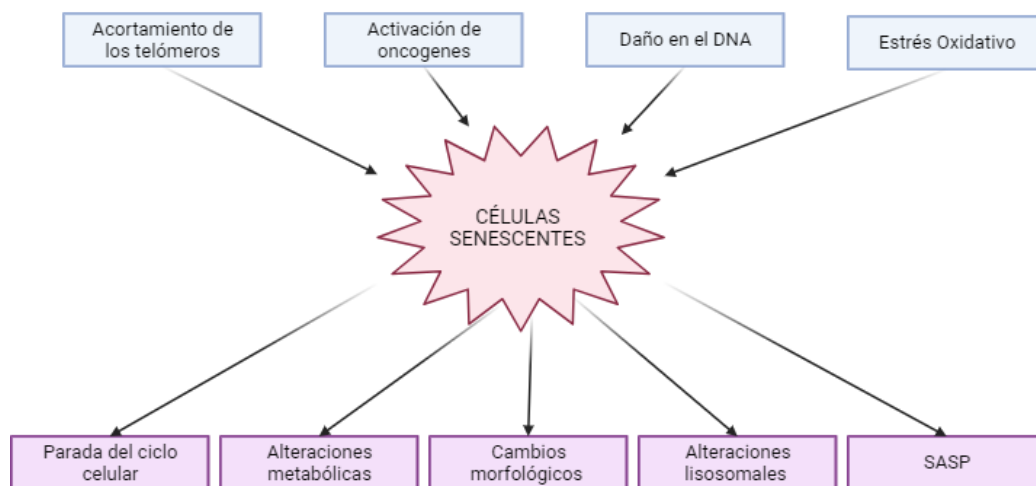


Figura 1: Causas y consecuencias posibles de la senescencia celular. Se han identificado diversos factores que inducen senescencia como el acortamiento de los telómeros, la activación de oncogenes, el daño del DNA y el estrés oxidativo. Por otro lado, las células senescentes se caracterizan por la parada del ciclo celular, cambios en el metabolismo, cambios morfológicos, alteraciones lisosomales y un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). Imagen creada con Biorender (<https://app.biorender.com>)

2.2 ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

En el cerebro, los procesos relacionados con la edad se asocian con una degeneración y pérdida neuronal, que en ocasiones conduce al deterioro cognitivo, dando lugar a enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Huntington (HD) y la enfermedad de Parkinson (EP) (4). Dos de los factores que impulsan el deterioro neurológico relacionado con la edad son el estrés oxidativo y la inflamación crónica, que aumentan con el envejecimiento debido a la menor capacidad del organismo para la reparación y mantenimiento. Niveles elevados de estrés oxidativo e inflamación se han observado también en una serie de trastornos neurológico y psiquiátricos. Algunos estudios han descrito que el envejecimiento ocurre debido a la incapacidad progresiva de una célula para hacer frente a diversas formas de estrés. Se sabe que un factor importante en el envejecimiento del cerebro es el nivel elevado de las especies reactivas de oxígeno

(ROS); estas dañan las enzimas y el DNA mitocondriales dando lugar a reacciones de fosforilación oxidativas defectuosas y con ello, generando más ROS (17). Se sabe que estas especies tienen efectos nocivos para las células, a través de al menos tres mecanismos; a) producen daño químico directo a macromoléculas celulares debido a su alta reactividad, b) interrumpen las vías básicas de señalización sensibles a redox al cambiar el equilibrio redox de una célula a un estado prooxidativo, c) inducen un estado senescente y activan el inflammasoma endógeno; la vinculación de ambos procesos desencadena una respuesta inflamatoria crónica y con ello, la interrupción de la homeostasis tisular (17).

Hay un interés creciente en los procesos de senescencia en relación con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. La edad es el factor de mayor riesgo para la aparición de muchas de estas enfermedades, como por ejemplo la EA, que es la causa más común de demencia en el hombre. Estudios recientes relacionan su desarrollo con una posible acumulación de células senescentes, cuyo número aumenta con la edad (2). Se cree que procesos característicos de la EA como son la acumulación de placas de péptido β -amiloide ($A\beta$) y de ovillos neurofibrilares constituidos por proteína Tau hiperfosforilada son potentes inductores de senescencia celular (18). Además, se ha visto que la eliminación de células senescentes reduce farmacológica y genéticamente la carga cerebral de $A\beta$ y Tau, mejorando la memoria de estos ratones (19–21). Estos estudios han demostrado así que la senescencia celular media la neurofisiopatología inducida por estos dos factores en el Alzheimer (18).

Entre los genes regulados por la edad, se ha demostrado con análisis de perfiles genómicos y análisis bioinformáticos que, **apolipoproteína D (APOD)**, es la proteína que más se sobreexpresa en un elevado número de enfermedades neurológicas en primates y roedores, incluida la EA (22). En humanos APOD se expresa en las células de Schwann y fibroblastos del sistema nervioso periférico, así como en el sistema nervioso central (SNC). Esta proteína se concentra en el citosol de las células gliales de la sustancia blanca y, en la materia gris se localiza principalmente en astrocitos y en unas pocas neuronas. Además, se ve un aumento de APOD en la corteza cerebral de pacientes de edad avanzada (23). El principal factor que afecta la expresión de APOD es el estrés celular; concretamente, se ha demostrado que el estrés oxidativo, luz UV y liposacáridos proinflamatorios inducen su expresión (17). La actividad antioxidante y antiinflamatoria de APOD en el cerebro envejecido apunta a su función como mecanismo neuroprotector. Estudios en ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína APOD humana y en ratones ApoD-KO han demostrado que la sobreexpresión de APOD humana en el cerebro de ratón aumenta la supervivencia en condiciones neurodegenerativas y que los ratones son menos sensibles al estrés oxidativo que se induce con el pesticida paraquat. Por el contrario, los ratones ApoD-KO muestran una mayor sensibilidad al estrés oxidativo y un deterioro de las habilidades locomotoras y de aprendizaje (23). Por lo tanto, se estudia su potencial como agente terapéutico en numerosas enfermedades neurodegenerativas.

2.3 FUNCIÓN DE LOS ASTROCITOS EN EL SNC. EFECTOS DE LA SENESCENCIA.

Según los estudios histológicos de Golgi, Cajal y sus sucesores se ha llegado al consenso de que las células del sistema nervioso se pueden dividir en dos grupos: neuronas, y células de sostén conocidas como glía, que tienen funciones esenciales en el sistema nervioso en desarrollo y en etapas posteriores (25). Se pueden diferenciar tres tipos de células gliales en el SNC: los oligodendrocitos, que son los encargados de recubrir los axones de las neuronas con mielina, las células microgliales, que derivan de células precursoras hematopoyéticas y se encargan de eliminar restos celulares de lugares de lesión o en procesos fisiológicos normales, y que además secretan moléculas señalizadoras que pueden modular la inflamación local (25), y los astrocitos. Estos últimos mantienen el medio iónico de las células nerviosas, modulan la velocidad de

propagación de las señales nerviosas, contribuyen a la captación de neurotransmisores en la hendidura sináptica, modulando así la actividad sináptica, y, junto con otras células gliales, actúan como andamios en ciertas fases del desarrollo neural y ayudan en la recuperación de lesiones neurales (25).

Mi proyecto se centra en los astrocitos, el tipo celular que representa la mayor población de células gliales en el cerebro adulto (26). Los astrocitos juegan un papel fundamental en la fisiología y en la función neuronal (27), regulando la transmisión sináptica en varias áreas del cerebro. Este intercambio de información entre astrocitos y neuronas se conoce como sinapsis tripartita e incluye a los astrocitos como elementos de la función sináptica junto a los procesos pre y postsinápticos (Figura 2). Funciones específicas de los astrocitos son: a) a nivel molecular, los astrocitos gracias al transporte iónico mantienen la homeóstasis del SNC, contribuyen a la captación y distribución de diversas moléculas como K^+ y glutamato, evitando que una acumulación excesiva de estas moléculas en el espacio intracelular pueda provocar una lesión celular; además, participan en la liberación de gliotransmisores y promueven la eliminación de especies ROS (28); b) a nivel metabólico, los astrocitos se encargan de regular la homeóstasis a través de la síntesis de glucógeno y la aportación de sustratos energéticos a las neuronas (27); c) a nivel sistémico, forman la cubierta del SNC, regulan la barrera hematoencefálica y actúan como quimiosensores, así, regulan el pH de la sangre, el equilibrio energético y la concentración de sodio (29). Por último, los astrocitos junto a la microglía, libera quimiocinas y citoquinas que regulan el tráfico de células inmunes hacia el SNC (27).

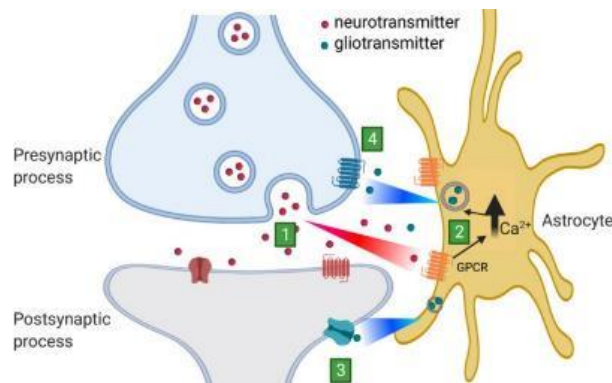


Figura 2: Representación de sinapsis tripartita. 1) Liberación del neurotransmisor desde el terminal presináptico hasta el terminal postsináptico, donde actúa. También se encuentran los receptores astrocíticos que median el aumento intracelular de Ca^{2+} a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). 2) El aumento de Ca^{2+} produce la liberación de gliotransmisores que se unen con los receptores terminales postsinápticos 3) o receptores presinápticos 4) esto produce la modulación de la transmisión sináptica (27).

Los astrocitos se caracterizan por su forma de estrella, normalmente conocida como fenotipo estrellado; su morfología es una malla compleja compuesta de proyecciones arborizadas delgadas enriquecidas en microfilamentos de actina y proteínas relacionadas con la actina (30). Sin embargo, en respuesta a situaciones patológicas o estresantes, los astrocitos pueden entrar en un proceso de senescencia (Figura 3).

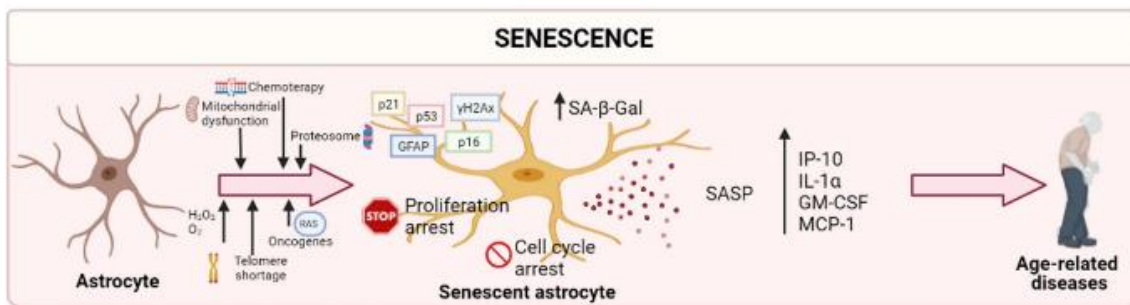


Figura 3: Cuando los astrocitos se someten a situaciones estresantes, como el daño en el DNA, se vuelven senescentes, estos se caracterizan por el aumento de la expresión de diversos genes como p16 o p53, además de un aumento de la actividad β -galactosidasa. Estos astrocitos senescentes llevan producen un SASP (fenotipo secretor asociado a la senescencia) que se caracteriza por relacionarse con la progresión de enfermedades relacionadas con la edad (30).

La comunicación bidireccional entre astrocitos y neuronas tiene efectos importantes en el funcionamiento de la sinapsis, y por ello, una comunicación deteriorada en este proceso puede ser muy relevante en la cadena de eventos que llevan a los fallos observados en la enfermedad neurodegenerativa. Así, se cree que un aumento en la liberación de glutamato puede ser la base de los cambios en la función sináptica y la plasticidad observados en la EA. Por otro lado, se ha visto como la liberación de ATP por los astrocitos puede inducir directamente la patología de EA (31). Las neuronas y los astrocitos, además de comunicarse por el contacto directo local célula a célula o por la liberación de los neurotransmisores, también se pueden comunicar a través de vesículas extracelulares (EV), vesículas secretadas por la glía como mediadores potenciales de las señales entre las neuronas y la glía. Por ello, también se ha estudiado el papel de estas vesículas. Su secreción constitutiva a partir de los astrocitos es crucial para el mantenimiento de las funciones neuronales, como el crecimiento de neuritas y la supervivencia neuronal; es decir, las EV suelen contribuir a la neuroprotección, neurotransmisión y antiinflamación. Sin embargo, cuando las EV son expuestas a diferentes estímulos como proteínas agregadas citotóxicas o a procesos de neuroinflamación, modifican su contenido de carga y tienen efectos duales en la supervivencia de las neuronas (Figura 4). De este modo se ha demostrado que los EV participan en procesos patológicos en enfermedades neurodegenerativas. Aunque se ha observado que la glía promueve la eliminación e inhibe la propagación de proteínas patológicas mediante la liberación de los EV, también se ha visto que EV secretadas facilitan la propagación de las proteínas patológicas y acaban dando lugar a la neurodegeneración (32). Cuando los astrocitos se vuelven senescentes se disminuye su interacción con las células vecinas, especialmente con las neuronas. Esto hace que se reduzca su capacidad para mantener la homeostasis del SNC (33). Sin embargo, los astrocitos senescentes no solo sufren la pérdida de funciones, sino que también adquieren propiedades nuevas, de forma que además de los cambios típicos de senescencia se pueden observar; a) pérdida progresiva, aislamiento funcional y degeneración de todas las sinapsis (34), b) alteración de la homeostasis del glutamato, incluyendo la absorción, el metabolismo y el transporte de neuronas(35), c) reclutamiento de células inmunes a través de la barrera hematoencefálica (33). Además de estas características, en algunos estudios se ha visto cómo al cultivar astrocitos senescentes con neuronas, se reduce la supervivencia neuronal en comparación con co-cultivos de neuronas con los astrocitos no senescentes, lo que demuestra que la senescencia de los astrocitos puede causar la muerte neuronal (36). Un estudio ha revelado que los medios condicionados de astrocitos aislados de ratones de 13 meses de edad provocan un descenso en la proliferación de células progenitoras neuronales

en comparación con NPC que se incuban con medios condicionados de astrocitos no senescentes, aislados de ratones de 3 meses de edad (37).

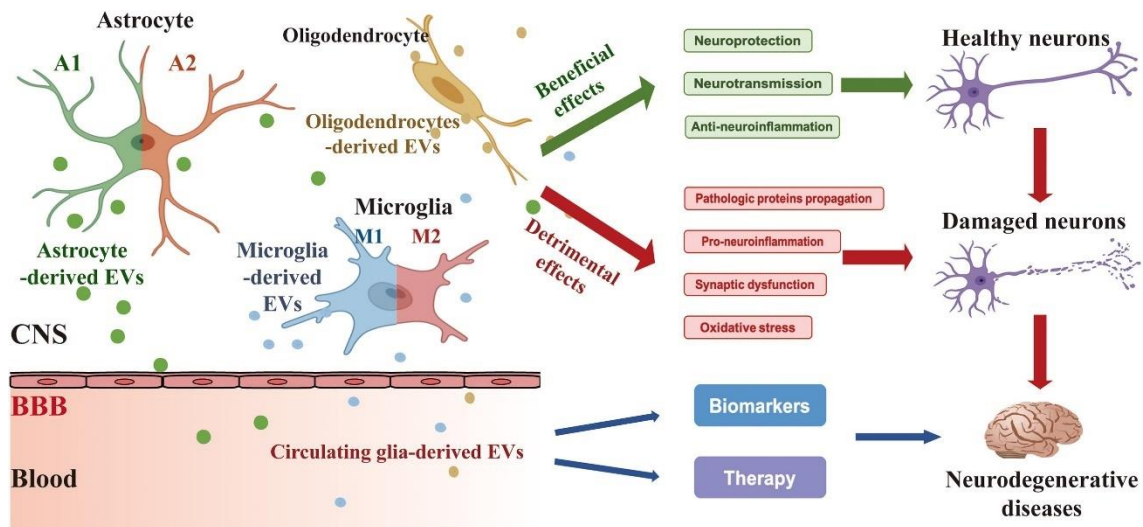


Figura 4: Secreción de EV derivadas de la glía (astrocitos, microglía y oligodendrocitos) y sus efectos sobre las neuronas y la neurodegeneración (32).

Las principales características de los astrocitos senescentes, que se definen por SASP, dependen del factor de transcripción NF- κ B. Estas propiedades se basan en el aumento de los niveles de moléculas como la interleucina-8 (IL-8), interleucina-6 (IL-6) y algunas metaloproteinas como MMP3 o MMP10, que inducen perfiles proinflamatorios alterados (33). Otro proceso que se ha relacionado con la senescencia en astrocitos y otros tipos celulares es la autofagia, una forma de autodegradación de proteínas mal plegadas y orgánulos dañados, los cuales, tras su digestión en el interior de lisosomas, se reciclan en el citoplasma y luego se restablecen (38). Una autofagia defectuosa causa una protección reducida contra el estrés cerebral (33).

2.3.1 Modelos *in vitro* e *in vivo* para inducir senescencia en astrocitos

La senescencia en los astrocitos se puede inducir *in vitro* por múltiples vías, entre ellas se pueden destacar: la radiación con rayos X (1,2), el tratamiento con D-Galactosa (D-Gal), con ROS, berberina, A β o el envejecimiento mediante cultivo sucesivo a lo largo del tiempo. Además, la administración de D-Gal y el envejecimiento de los organismos también pueden emplearse para generar modelos de senescencia *in vivo*.

Esta descrito cómo ROS (H_2O_2 , superóxidos, aniones, radicales hidroxilo) y compuestos como paraquat, pueden inhibir el crecimiento celular e inducir la muerte celular y la senescencia. La teoría del “estrés por oxígeno en el envejecimiento” es la hipótesis más documentada del envejecimiento, aunque no implica que ROS sea la causa principal. (1,39). Se ha demostrado que ROS y SASP estabilizan la senescencia de forma autocrina, pero también pueden inducir senescencia paracrina, que puede contribuir a los efectos perjudiciales de la senescencia durante el envejecimiento (40).

La **D-Galactosa** es un azúcar reductor que se encuentra de forma natural en el cuerpo. Sin embargo, se ha visto que su exceso puede inducir inflamación, estrés oxidativo y apoptosis en las células neuronales(41). También da lugar a la modificación de las proteínas a través de receptores para productos glicosilados avanzados en una variedad de especies (7). En algunos estudios se ha visto que al tratar las células con D-Gal se disminuye significativamente la viabilidad celular y se induce senescencia celular (7). Se ha demostrado que la inhibición de la vía YAP-CDK6 induce senescencia en fibroblastos humanos y en células de glioblastoma (42). D-Gal se ha utilizado también como tratamiento crónico para producir un aceleramiento del envejecimiento en modelos de

Drosophila y de roedores; estos últimos presentan un deterioro progresivo de las habilidades de memoria y aprendizaje, neurodegeneración y daño en el sistema inmunológico. Por otro lado, los modelos de moscas presentan una menor vida útil y un aumento del estrés oxidativo (7). Actualmente, no se conoce el mecanismo por el que D-Gal causa el envejecimiento, pero se piensa que este compuesto produce aldosa y peróxido de hidrógeno bajo la acción de la galactosa oxidasa y esto hace que aumenten ROS, la peroxidación lipídica y produce radicales libre de anión superóxido, lo cual da lugar al envejecimiento celular.

Otro compuesto químico con el que se puede inducir senescencia *in vitro* es la **berberina**, un alcaloide isoquinolínico presente en multitud de hierbas medicinales. Se sabe que este compuesto posee actividades anticancerígenas; se atribuye su efecto antitumoral a su capacidad para inducir senescencia celular. Se ha demostrado que hay una reducción en los niveles del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en células tratadas con berberina y esto hace que se inhiba la vía de señalización EGFR-RAF-MEK-ERK; se cree que este proceso media la inducción de senescencia celular en células de glioblastoma tratadas con berberina (43).

Por otro lado, la deposición de **A β** en el parénquima cerebral desencadena una serie de reacciones inflamatorias, incluidas la activación de astrocitos y microglía y la generación de ROS y citocinas (39).

3 OBJETIVOS

El OBJETIVO GENERAL del proyecto consiste en **establecer un modelo de senescencia en astrocitos U-87 MG que sirva como punto de partida para futuros estudios del efecto de la senescencia sobre la interacción astrocito-neurona.**

Como OBJETIVOS ESPECÍFICOS se proponen:

-Objetivo 1: Establecer las condiciones necesarias para inducir senescencia en células U-87 MG con el monosacárido D-galactosa. Para ello, se han aplicado tres concentraciones distintas de D-Gal durante tres períodos de tiempo a cultivos sembrados a dos densidades diferentes.

-Objetivo 2: Realizar un estudio preliminar del efecto de la senescencia en células U-87 MG sobre la expresión de APOD. Sabiendo que APOD es una proteína que se expresa en astrocitos y cuyo nivel de expresión aumenta de forma notable durante el envejecimiento, se han llevado a cabo una serie de estudios preliminares para ver si la expresión de este gen se ve alterada en células U-87 MG senescentes.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 CULTIVOS CELULARES

Para los experimentos se empleó la línea celular U-87 MG, derivada de un cáncer de glioblastoma humano. Las células se cultivaron en medio completo, consistente en una mezcla de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) inactivado por calor, 1% penicilina/estreptomicina (penicilina 10 U/ μ l, estreptomicina 10 U/ μ l) y glutamina (10 μ l/ml de una solución 200 mM). Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C con 5% de CO₂ atmósfera y 90-95% de humedad. Para su mantenimiento, los cultivos fueron sembrados a una densidad estándar de 4 x 10⁴ células/cm². Los pases se realizaron lavando cada cultivo dos veces con PBS (Gibco) y tratando con 0,25% tripsina a 37°C; una vez disgregadas las células, se inactivaba la tripsina usando medio completo de cultivo, por último, se recogían las células por centrifugación a 1000 rpm durante 3 minutos en una centrifuga Eppendorf Centrifuge 5810R.

Para el trabajo, se descongelaron varios viales de esta línea celular, que se almacenaban en un tanque de nitrógeno líquido. Los viales se descongelaron en un baño a 37°C; posteriormente se resuspendieron en medio completo de cultivo, y se

centrifugaron para eliminar los restos de dimetilsulfóxido (DMSO), que se usa como crioprotector durante la congelación de las células. Finalmente, se resuspendió el pellet en medio completo y se sembraron las células.

Para congelar la línea celular, las células se tripsinizaron al alcanzar una confluencia aproximada del 80%; la tripsina se inactivó con medio completo y las células se centrifugaron en una centrífuga Eppendorf Centrifuge 5810R. El pellet se resuspendió en un volumen adecuado de medio que contenía 45% DMEM/45% FBS/10% DMSO. Las células se guardaron a -80°C durante al menos una noche. Finalmente, los viales se guardaron en un tanque de nitrógeno líquido para su conservación.

El conteo celular se realizó usando un hemocitómetro: el número de células se calculó mediante la fórmula:

$$n \times \text{factor de dilución} \times 10^4$$

Siendo n el promedio número de células contabilizadas en los cuatro cuadrantes de la cámara y el factor de dilución el aplicado a la suspensión celular previamente a su carga en el hemocitómetro y el adecuado para permitir un conteo fiable de células.

4.2 OBTENCIÓN DE CULTIVOS SENESCENTES

Para obtener los cultivos senescentes, se utilizó una solución 2 M de D-Gal (Figura 5)..

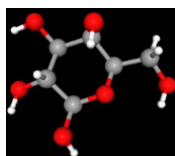


Figura 5: Molécula de D-Galactosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$). Imagen obtenida de PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Los cultivos se sembraron en medio completo, a $12000 \text{ células}/\text{cm}^2$ y a $35000 \text{ células}/\text{cm}^2$; 48 horas después de la siembra, se lavaron con PBS y se cambió el medio a un medio sin FBS que contenía diferentes concentraciones finales de D-Gal: 100 mM (DGal-100), 200 mM (DGal-200) y 300 mM (DGal-300); todos los experimentos incluían cultivos control, en medio control (Ctrl), crecidos en medio sin FBS y sin D-Gal. Todos los cultivos se mantuvieron en sus respectivos medios varios períodos de tiempo (entre 24 y 72 horas), a 37°C y 5% CO_2 (Figura 6).

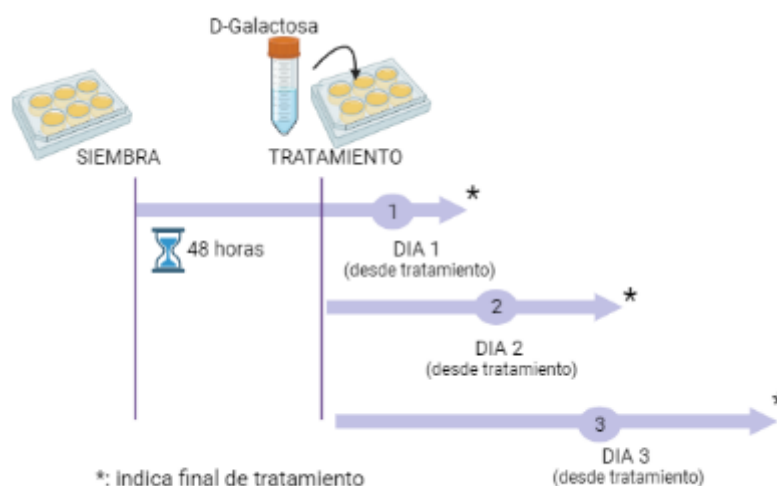


Figura 6: Representación del procedimiento seguido para tratar los cultivos con D-Gal. En el primer paso, se realizó la siembra del cultivo y, 48 horas después se aplicaron los respectivos tratamientos (DGal-100, DGal-200, DGal-300). Los tratamientos duraron 1, 2, o 3 días. Imagen creada con Biorender (<https://app.biorender.com>)

4.3 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR: CLICK-IT

Para evaluar la proliferación de los cultivos, se realizó el test Click-it, usando el Kit Click-iT® EdU Assay (Invitrogen). El método se basa en medir la síntesis directa de DNA; para ello se emplea EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina), que es un nucleósido análogo a la timidina que se incorpora en el DNA durante la síntesis activa de DNA. La detección se basa en una reacción de click, una reacción covalente catalizada por cobre que se produce entre un azida y un alquino. En este caso, EdU contiene el alquino y el fluoróforo Alexa Fluor® contiene el azida.

Para realizar este experimento se sembraron las células a una densidad de 12000 células/cm² sobre cubreobjetos redondos de cristal de 12 mm². Una vez aplicado el tratamiento con D-Gal, y media hora antes de concluir el experimento, se añadió Edu al medio, a una concentración final de 1xEdU. Tras la adición de EdU, las células se incubaron 30 minutos a 37°C en la incubadora. A continuación, se pasó a fijar y permeabilizar las células; en primer lugar, se hizo un lavado con PBS y se incubaron con una solución 4% formaldehído en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente, después se realizaron tres lavados, de 5 minutos cada uno, con PBS, seguidos de una incubación de 20 minutos en 0,5% Triton® X-100 en PBS. Para la detección, se lavaron dos veces las células con PBS y se incubaron las células 30 minutos en la oscuridad con el reactivo de Click-iT®, que contiene el fluoróforo Alexa Fluor®. A continuación, se tiñó el DNA en los núcleos. Para ello, se lavaron las células con PBS y se incubaron durante media hora a temperatura ambiente y en oscuridad, con una dilución 1:15000 de Hoechst (20 mM, Thermo Fisher Scientific) en PBS. Por último, se lavaron las células dos veces con PBS y se procedió a su análisis e imagen.

4.4 ENSAYO DE β-Galactosidasa

Se sabe que la actividad β-galactosidasa está elevada en las células senescentes. Esta enzima cataliza la hidrólisis de β-galactósidos en monosacáridos. Un test habitualmente utilizado para detectar actividad β-galactosidasa en senescencia es la adición de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal) a cultivos, el cual se escinde en galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-gidroxindol por acción de la enzima; este segundo compuesto se oxida en 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, siendo este último compuesto el causante del color azul (Figura 7). La tinción se realiza a un pH subóptimo para la reacción de 6.0, de forma que solo las células senescentes se tiñen, gracias al aumento en los niveles de la enzima en senescencia.

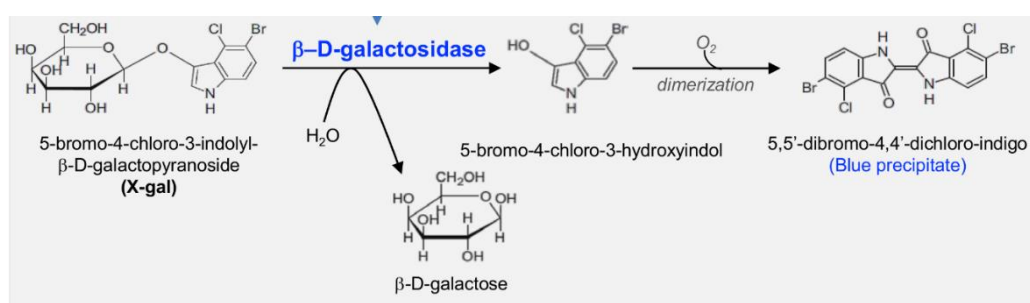


Figura 7: Esquema de la reacción de hidrólisis que se produce al actuar la enzima β-galactosidasa sobre el sustrato X-Gal, produciéndose un precipitado azul que tiñe las células senescentes (9).

Para el ensayo de β-Galactosidasa se siguió el protocolo descrito en (8). Las células se sembraron y trataron en cubreobjetos redondos de cristal, en placas de 4 pocillos. Terminado el tratamiento, se lavaron las células con PBS y se fijaron con una disolución 4% paraformaldehído en PBS durante 10 minutos; después, se lavaron 3 veces con PBS para eliminar posibles restos del fijador y se adicionó la solución de tinte (40 mM de ácido cítrico/fosfato de sodio, pH6, 5mM ferrocianuro de potasio, 5 mM ferricianida

de potasio, 2 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl, 1mg/ml X-Gal); los cultivos se dejaron en un incubador a 37°C y en oscuridad toda la noche. Al día siguiente, se lavaron los pocillos con PBS y se tomaron imágenes de los cultivos con el microscopio invertido de fluorescencia: NIKON modelo Eclipse TS100.

4.5 EXTRACCIÓN DE RNA

Para la extracción de RNA se trataron las muestras, 5 minutos a temperatura ambiente, con Quiazol®, un reactivo a base de fenol/guanidina, que se emplea para lisar las células, solubiliza los materiales biológicos y desnatura las proteínas. A continuación, se adicionaron 200 µl de cloroformo; este promueve la separación de fases, reduciendo las pérdidas de RNA en la interfase y aumentando la eficacia de la extracción. Las muestras se centrifugaron para separar las fases; la proteína permanece en la fase orgánica, el DNA en la interfase y el RNA en la fase acuosa, por lo que se recogió la fase acuosa con el RNA. A continuación, se adicionó isopropanol y se centrifugaron las muestras para precipitar el RNA. Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las muestras en 70% etanol. Finalmente, se volvieron a centrifugar las muestras, se retiró el sobrenadante, se dejaron secar los *pellets* y se resuspendieron en agua libre de RNasas, a 55°C durante 10 minutos en un termociclador Eppendorf ThermoMixer Comfort. Las muestras se guardaron a -80°C, listo para su uso. Para medir las concentraciones de RNA obtenido y ver su pureza se empleó NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific)

4.6 SÍNTESIS DE cDNA

Para realizar la retrotranscripción (RT) se usaron 500 ng de RNA y se empleó el Kit PrimeScrip Tm RT reagent kit (Takara). Como cebadores se añadió una mezcla de oligo dT (50 µM) y hexámeros aleatorios (100 µM), en un volumen final de 10 µl. Esta reacción se dejó a 42° durante una hora, seguido de un tratamiento de 5 minutos a 85°C para inactivar la enzima.

4.7 RT-PCR

Para comprobar que la síntesis de cDNA se había llevado a cabo con éxito, se realizó una RT-PCR convencional, utilizando una pareja de *primers* que amplifican un fragmento del gen HRL18, *primers* que se utilizan de forma rutinaria en el laboratorio. Las secuencias de estos primers son: HRL18-Fw: 5'- TTCCGTCTTTCCGGACCT -3' y HRL18Rev 5'- TCGGCTCATGAACAACCTCT -3'. La amplificación de los productos se realizó usando una dilución 1:10 del cDNA obtenido, 10 µM de los cebadores para cada gen y GOtaq mix 2x de Promega. Se utilizó un equipo MJ Mini Personal Thermal Cycler de Bio-Rad y las condiciones empleadas para la amplificación fueron: 94°C durante 2 minutos, 34 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 45 segundos a 72°C, y un ciclo a 72°C durante 5 minutos. Los productos de amplificación obtenidos se corrieron en un gel de 1% agarosa en 1x TAE (40 mM tris-acetato, 1 mM EDTA) para comprobar que todas las muestras contenían cDNA. Para detectar los fragmentos de PCR se añadió RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (Labotag), que emite fluorescencia verde cuando se une al DNA o RNA.

4.8 qPCR

Para el análisis cuantitativo de la expresión de genes relacionados con la senescencia, se diseñaron *primers* para los genes P16^{INK4a} y Lamin B1, así como para el gen PUM1, que fue utilizado como gen de referencia. Los *primers* se diseñaron empleando el programa PRIMER BLAST. Se aplicaron los siguientes criterios:

- Tamaño del producto de PCR: 120-150 pb.
- Temperatura de Melting (TM): similar para primer Fw y Rev (57-63°C).
- Preferiblemente, que los *primers* Fw y Rev se unan a exones distintos, habiendo al menos un intrón entre ellos, preferiblemente de un tamaño >1000 pb.

- Tamaño de los *primers*: 18-25 nucleótidos
- Contenido en Guanina y Citosina: 40%-60%

En la Tabla 1 se indican las secuencias de los *primers* diseñados. En paréntesis se muestran las secuencias de los genes a partir de las cuales se diseñaron los *primers* y también las secuencias de los *primers* utilizados para amplificar cDNA correspondiente al gen APOD, disponibles en el laboratorio.

Gen Diana	Cebador	Secuencia de Primers
PUM1 (NM_001020658.2)	FW	5'-AGCAGCAACTGTGGGACTTTT-3'
	RV	5'-GCGGGAGCTAAACCGATGTG-3'
LAMIN B1 (NM_001198557.2)	FW	5'-AAATTCTCAGGGAGAGGAGGTTGC-3'
	RV	5'-TTCTATTGGATGCTCTTGGGGTT-3'
p16INK4a (NM_000077.5)	FW	5'-AGAGGCAGTAACCATGCCCG-3'
	RV	5'-AGGACCTTCGGTGACTGATGA-3'
ApoD	FW	5'- GAAGCCAAACAGAGCAACG -3'
	RV	5'- TGTTTCTGGAGGGAGATAAGGA -3'

Tabla 1: secuencia de los primers diseñados, PUM1, LAMIN B1 y p16INK4a. También se muestra la secuencia de los primers empleados para amplificar el gen ApoD.

Las condiciones para cada *primer* se optimizaron utilizando cDNA obtenido de cultivos crecidos en medio completo, en reacciones de 20 μ l que contenían 10 μ l de SYBR Green® mix (Takara), y 0,4 μ l (stock 10 μ M) de cada primer, utilizando el termociclador RotorGene (Corvette) y el programa: 1 ciclo de 95° durante 30 seg, 40 ciclos de 5 segundos a 95°C, 15 segundos a T_m y 15 segundos a 72°C, seguidos de una curva de desnaturalización desde 62°C a 95° C, en etapas de 0,5°C. Para optimizar las condiciones, se probaron varias temperaturas de anillamiento (T_m), en el rango de 62°C a 64 °C, se probaron también diferentes números de ciclos en el rango de 35 a 40 ciclos. Los productos de amplificación se comprobaron en geles de 1,5% agarosa, preparados en 1x TAE. Finalmente, se decidió que T_m=64°C y 35 ciclos eran las mejores condiciones para todos los *primers*. En la Figura 8 se puede observar la curva de amplificación para los genes PUM1, LMNB1, P16^{INK4a} y ApoD, y HRL18 como control positivo; como control negativo, se empleó el mismo gen, HRL18, en ausencia de la enzima RT. Se puede observar cómo se consiguió amplificar todas las secuencias a excepción de la de P16^{INK4a} que se comportó de manera muy similar al control negativo. Estos resultados se verificaron en un gel de 1% agarosa en el que se observaron las bandas correspondiente a cada gen a excepción de P16^{INK4a}.

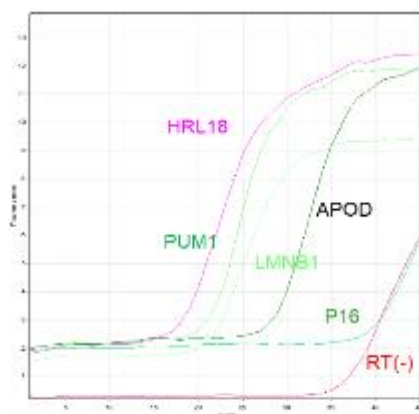
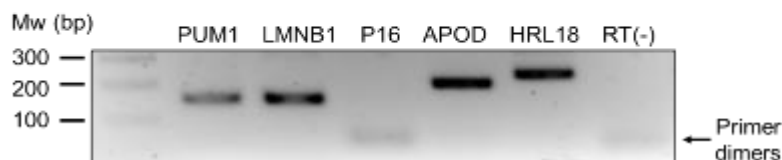


Figura 8: Curva de amplificación y gel de 1% agarosa para secuencias de PUM1, LMNB1, APOD y P16INK4a. Como control positivo se utilizaron primers para el gen HRL18 y como control negativo el gen HRL18 pero sin enzima (RT-).



4.9 INMUNOCITOQUÍMICA

Las células se fijaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído al 4% en PBS y, se lavaron tres veces, 10 minutos cada vez, con PBS, así, para eliminar cualquier resto de fijador. En el siguiente paso, se realizó un bloqueo y permeabilización con 0,1% Tween-20 y 1% suero de cabra en PBS durante 10 minutos. A continuación, se adicionó un anticuerpo policlonal de conejo anti-APOD humano (44), diluido 1:1000 en 0,1% PBS-Tween 20; se dejó incubando toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo Alexa 594 (Jackson Labs) (1:2000) y se realizó una incubación con PBS-0,1% Tween-20 durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, se volvió a lavar 3 veces con PBS. Para montar las muestras se empleó Vectashield (Vector Labs) como método de montaje. La observación de las células se llevó a cabo en un microscopio Nikon 90i equipado con una cámara Nikon DS-Fi3.

4.10 OBTENCIÓN DE MEDIO CONDICIONADO

El medio condicionado se recogió de placas de seis pocillos, en las que, tras haber pasado tres y cinco días de tratamiento con D-Gal, se lavaron los cultivos con PBS para eliminar cualquier resto de D-Gal y se cambió el medio a medio Ctrl; el medio condicionado se recogió 72 horas después (Figura 9). En primer lugar, se tripsinizaron las células y se centrifugaron 10 minutos a 4°C y 300 rcf, de este modo se consiguió sedimentar las células enteras que no habían roto su membrana. A continuación, se recogió el sobrenadante y se centrifugó otro 5 minutos a 4°C y 2000 rcf consiguiendo descartar el debris.

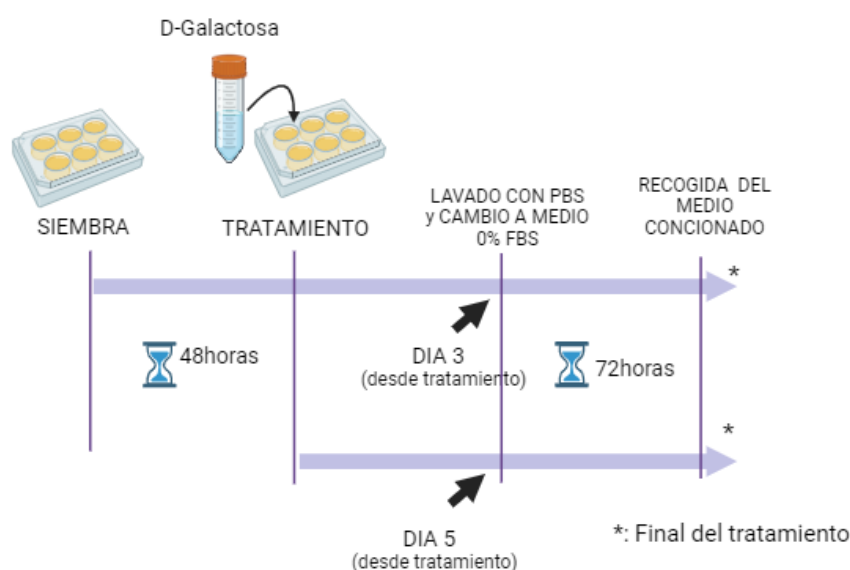


Figura 9: Esquema del diseño experimental para recoger el medio condicionado. Se siembra el cultivo y 48 horas después se aplican los respectivos tratamientos. En este punto se espera 3 o 5 días desde que se añade la D-Gal a los cultivos y a continuación se lava con PBS y se cambia el medio a medio Ctrl. 72 horas después se recoge el medio condicionado. Imagen creada con Biorender (<https://app.biorender.com>)

4.11 EXTRACCIÓN DE PROTEINAS

Para obtener las proteínas, se trabajó con las células que quedaban en las placas tras recoger el medio condicionado del paso anterior (4.10). Para ello, se tripsinizaron las células y se centrifugaron. El *pellet* obtenido se resuspendió en Jorge's Buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 mM EGTA pH 8.0, 1 mM NaF, 20 mM

$Na_4P_2O_7$, 2 mM Na_3VO_4 , 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 0,5% Sodium DOC, 10% Glicerol, 1 mM PMSF), con la adición de un inhibidor de proteasas (Roche), diluído 1:10. Las muestras se mantuvieron en movimiento durante 30 minutos a 4°C y después se centrifugaron a 13000 rpm; se recogió el sobrenadante, que se guardó a -20°C. Para medir la cantidad de proteína se llevó a cabo un **ensayo BCA**, utilizando BSA para preparar la curva patrón. Las mediciones se realizaron en un lector de placas Versamax, midiendo absorbancia a 562 nm.

4.12 WESTERN BLOT

Para separar las proteínas en función de su peso molecular se empleó un gel discontinuo al 10% de poliacrilamida con 0,1% dodecilsulfato de sodio o SDS-PAGE. Se emplearon como catalizadores persulfato de amonio (APS) al 10% y TEMED (N, N, N', N'-Tetrametildiamina).

Las muestras se prepararon adicionando un tampón de carga (Tris-HCl 63 mM, SDS 2%, Glicerol 10% y DTT 10 mM) y se dejaron a 80°C durante 5 minutos para su desnaturalización. Para la electroforesis se empleó una solución tamponada (Tris-HCl 25 mM, SDS 0,1%, glicina 190 mM y dH_2O) durante 30 minutos a un voltaje de 80 V que después se cambió hasta 120 V para finalizar la electroforesis. Una vez se separaron las proteínas por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas PVDF empleando un tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% con un pH 8,5) con un amperaje constante de 400 mA durante 90 minutos. Cuando finalizó la transferencia se lavaron las membranas 10 minutos en TBS con Tween-20 al 0,05%. A continuación, se bloquearon con 5% de leche en polvo en solución tamponada con Tris (TBS + 0,05% Tween-20) a temperatura ambiente durante 1 hora. El anticuerpo primario, un anticuerpo policlonal de conejo anti-APOD humana (44), se añadió a la membrana con la solución de bloqueo y se incubó durante 12 horas a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS + 0,5% Tween-20 y se añadió el anticuerpo secundario, policlonal de cabra anti-IgG de conejo, conjugado con HRP (Dako), diluído 1:10000, que se incubó durante 1 hora. Finalmente se llevaron a cabo otros tres lavados y se reveló la señal quimioluminiscente con una solución de ELC (Millipore) usando el sistema de captura de imagen VersaDoc™ (BioRad).

4.13 ELISA

La técnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent) es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas que permite identificar y cuantificar el antígeno de interés. Este método se basa en la reacción específica que se da entre el anticuerpo y el antígeno.

En este caso se realizó un ELISA indirecto con el Kit Human Apolipoprotein D ELISA Kit 3714-1HP de Mabtech, que emplea placas precubiertas con anticuerpos monoclonales (mAb) que capturan el analito. La cuantificación del analito se puede determinar por comparación con una dilución seriada del estándar para ELISA. Para preparar la curva estándar se empleó una solución estándar de APOD humano recombinante (2 µg/ml), a partir de la cual se hizo una dilución seriada empleando tampón Apo-ELISA según se indica en la Figura 10. En el caso de las muestras se realizó una dilución 1:1,5 en tampón APO-ELISA. Una vez preparados los estándares y las muestras, se realizaron tres lavados con 300 µl/pocillo del tampón de lavado (Wash buffer); después, se adicionaron 100 µl/pocillo de la curva estándar y 200 µl/pocillo de las muestras previamente preparadas. A continuación, se selló la placa y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. En este paso se dejó la placa a 4°C toda la noche.

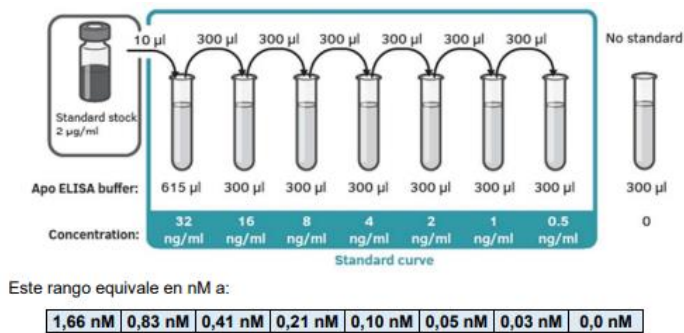


Figura 10: Esquema de la preparación de la curva estándar para el ELISA. La solución estándar (2 µg/ml) viene liofilizada, se resuspende con Tampón de Reconstitución estándar y se hacen las diluciones estándar empleando como diluyente el Tampón APO-ELISA (Mabtech)

Al día siguiente, se dejó la placa 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron los pocillos cinco veces con 300 µl/pocillo del tampón de lavado y, tras los lavados, se adicionaron 100 µl/pocillo del anticuerpo secundario (1:1000) en Tampón APO-ELISA. Este tampón impide que los anticuerpos heterófilos entrecrucen los anticuerpos del ensayo evitando así falsos positivos. A continuación, se selló la placa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. En el siguiente paso, se repitieron los cinco lavados y se adicionó 100 µl/pocillo de Streptavidina-HRP (1:1000 en diluyente de Streptavidina-HRP); se incubó otra hora en las mismas condiciones que con el anticuerpo. Se lavó de nuevo cinco veces con el tampón de lavado y se añadieron 100 µl/pocillo del sustrato TMB que se incubó 15 minutos en oscuridad; la adición de TMB da lugar a un producto coloreado. Por último, transcurrido los 15 minutos, se paró la reacción con 100 µl/pocillo de la solución STOP. Se midió la absorbancia de la placa a 450 nm con sustracción de fondo a 650 nm en el lector de placas VersaMax (Figura 11).

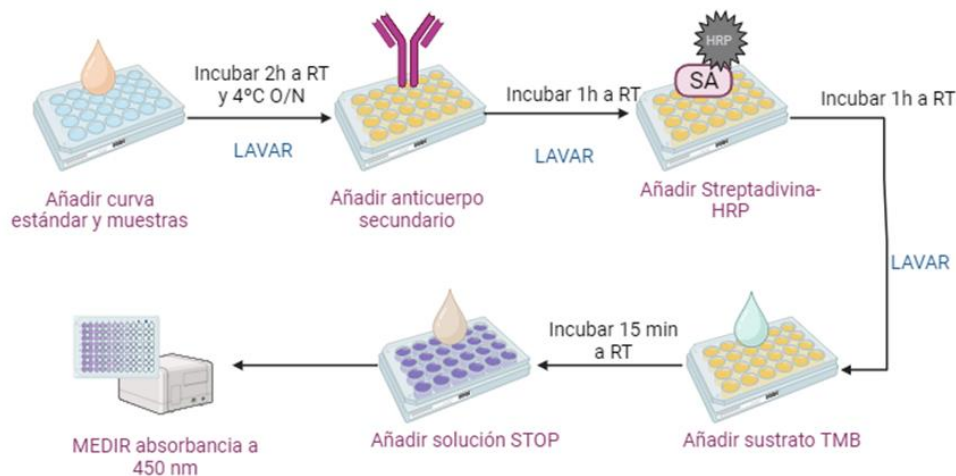


Figura 11: Esquema del protocolo para realizar ELISA. Imagen creada con Biorender (<https://app.biorender.com>)

4.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa SigmaPlot 11.0. En los análisis de los experimentos de conteo celular y ensayos de β-galactosidasa, se aplicó un ANOVA de dos vías; para el análisis de q-PCR del gen LMNB1 se usó un ANOVA de una vía; y para el análisis de los datos de qPCR de APOD y el ensayo Click-it de proliferación, se empleó el test de Mann-Whitney; los valores p<0,05 fueron aceptados como estadísticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 ESTABLECIMIENTO DEL MODELO DE SENESCENCIA

5.1.1 Identificación de las condiciones de cultivo necesarias para inducir senescencia en la línea celular U-87 MG, atendiendo a los parámetros de crecimiento y morfología celular y actividad β -galactosidasa.

El objetivo de este trabajo era establecer un modelo de senescencia en astrocitos trabajando con la línea celular U-87 MG. Para inducir senescencia, 48 h después de sembrar las células, se cambió el medio de cultivo a medio Ctrl al que se añadieron varias concentraciones de D-Gal (concentraciones finales de 0 mM (Ctrl), 100 mM (DGal-100), 200 mM (DGal-200) y 300 mM (DGal-300)). Para cada concentración, se evaluó el efecto de tratamientos de 1 día (D1), 2 días (D2) y 3 días (D3) de duración; además, se evaluó el efecto de sembrar las células a dos densidades distintas, una a 12000 células/cm², cercana a la densidad mínima de siembra recomendada (10000 células/cm²), y otra a 35000 células/cm², cercana a la densidad máxima de siembra (40000 células/cm²). Se comenzó analizando en paralelo el crecimiento de los cultivos y la actividad de la enzima β -galactosidasa (β -gal), para poder ver qué tratamiento inducía mejor las características de senescencia, ya que la detención de la proliferación celular, alteraciones morfológicas de las células y el aumento de la actividad β -galactosidasa son, en combinación, indicadores habituales de senescencia.

En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos del **contaje celular de los cultivos** sembrados a la densidad más alta (35000 células/cm²). No se observaron diferencias significativas en el número de células presentes entre los cultivos, independientemente de la concentración de D-Gal utilizada (Ctrl, DGal-100, DGal-200, DGal-300), ni tampoco se vio un efecto de la duración del tratamiento. Aunque se llegó a observar una tendencia hacia una menor densidad celular en los cultivos DGal-300, esto no llegó a ser estadísticamente significativo en ninguno de los casos, probablemente debido a la alta variabilidad observada en los cultivos. También se observó una alta variabilidad en los datos obtenidos de cultivos DGal-200. Además, se observó cómo a D3 las células se agrupaban en los cultivos, de acuerdo con la alta densidad de siembra inicial y el patrón típico de crecimiento de estas células.

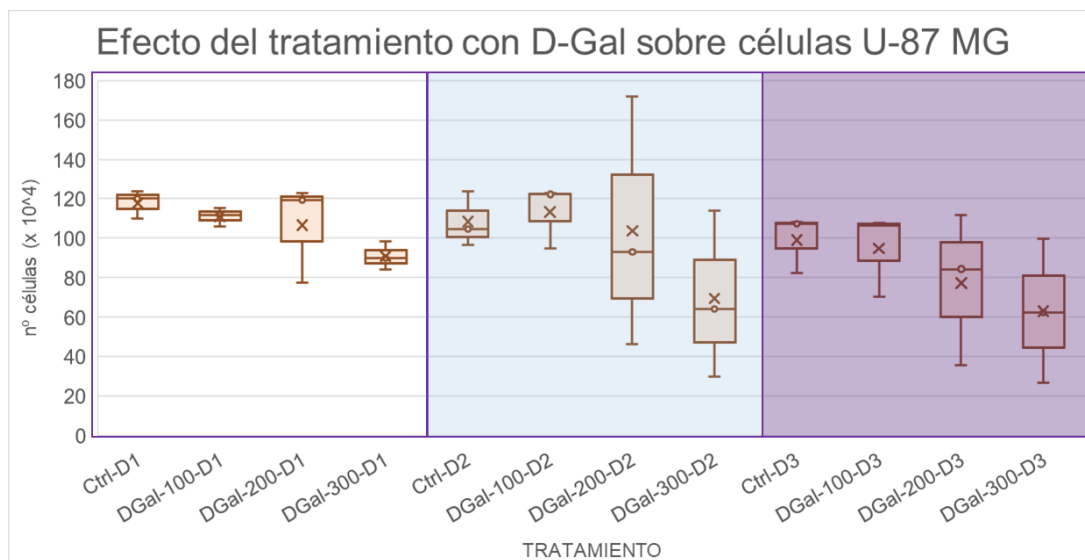


Figura 12: Resultado del estudio del crecimiento de cultivos sembrados a una densidad de 35000 células/cm². Ctrl: control; DGal-100: tratamiento con 100 mM D-Gal; DGal-200: tratamiento con 200 mM D-Gal; DGal-300: tratamiento con 300 mM D-Gal. Para mayor claridad, se han agrupado en cajas de diferentes colores los resultados obtenidos dependiendo de la duración del tratamiento (1 día (D1), 2 días (D2), 3 días (D3)): resultados a D1 aparecen indicados en blanco; D2, en azul; D3, en morado. n=3.

En paralelo estos contajes, se analizó la **actividad β -galactosidasa** en los cultivos, como ya se ha explicado en la sección Materiales y Métodos; los resultados se muestran en la Figura 13 y Figura 14.

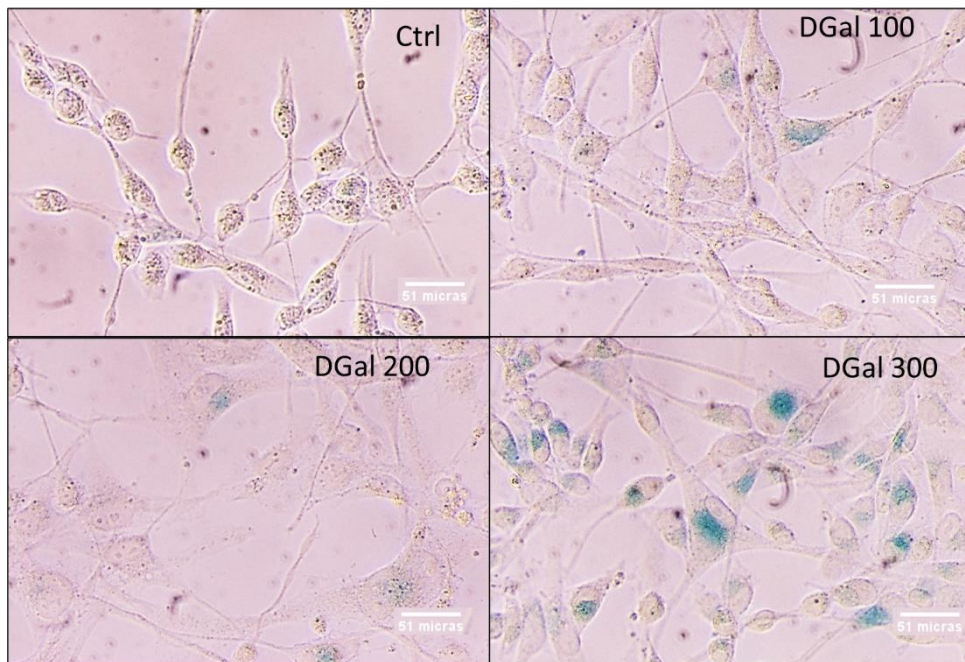


Figura 13: Imágenes obtenidas tras realizar un ensayo de β -galactosidasa en cultivos sembrados a una densidad de 35000 células/cm² y tratados durante 2 días con medio control (Ctrl), 100 mM D-Gal (DGal-100), 200 mM D-Gal (DGal-200) y 300 mM D-Gal (DGal-300)

Los resultados obtenidos con los cultivos sembrados a 35000 células/cm² indicaron un aumento significativo en la **actividad β -gal** en cultivos DGal-300-D1 (21,5 \pm 8,3% de las células se tiñeron con XGal), comparados con cultivos Ctrl-D1 (2,8 \pm 1,8%) y DGal-100-D1 (4,6 \pm 2,04%). Al analizar los resultados obtenidos de cultivos tratados durante 2 días con D-Gal se vieron diferencias significativas entre los cultivos DGal-200-D2 (38,1 \pm 7,8%) y DGal-300-D2 (51,5 \pm 10,7%), comparados con Ctrl-D2 (11,4 \pm 0,8%) y DGal-100-D2 (13,2 \pm 10,1%) (Figura 14).

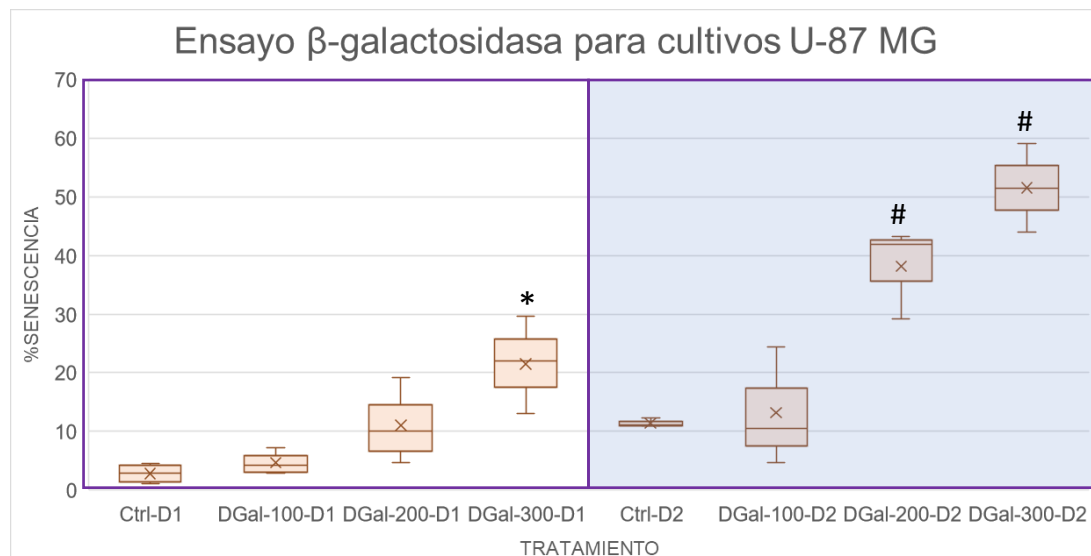


Figura 14: Resultado del ensayo de β -galactosidasa en cultivos sembrados a una densidad de 35000 células/cm². n=4 a D1 y n=3 a D2. Comparado con Ctrl-D1, el resultado DGal-300-D1 fue estadísticamente significativo (*p<0,05) y, a D2, comparando con el control, DGal-200-D2 y DGal-300-D2 mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células teñidas con XGal (#p<0,001). Ctrl: control; DGal-100: 100 mM D-Gal; DGal-200: 200 mM D-Gal; DGal-300: 300 mM D-Gal. En el marco blanco se agrupan los datos a D1 y en el marco azul se encuentran los de D2.

Por otra parte, cuando se analizaron los datos obtenidos con cultivos sembrados a 12000 células/cm², al realizar el **contaje celular de los cultivos** se vio cómo los tratamientos DGal-200 y DGal-300 presentaban diferencias significativas con respecto al Ctrl, en todos los días analizados (D1, D2 y D3) (Figura 15). Además de esto, los cultivos DGal-300-D3 demostraron un número de células significativamente inferior al de los cultivos DGal-100-D3 y DGal-200-D3; la disminución de células observada en DGal-300-D3 se correlacionó con una alta proporción de células flotando en el medio a D3, lo que indicaba muerte celular. Por otro lado, se observó un claro cambio en la **morfología de las células** que permanecieron en los cultivos DGal-300-D3.

Efecto del tratamiento con D-Gal sobre células U-87 MG

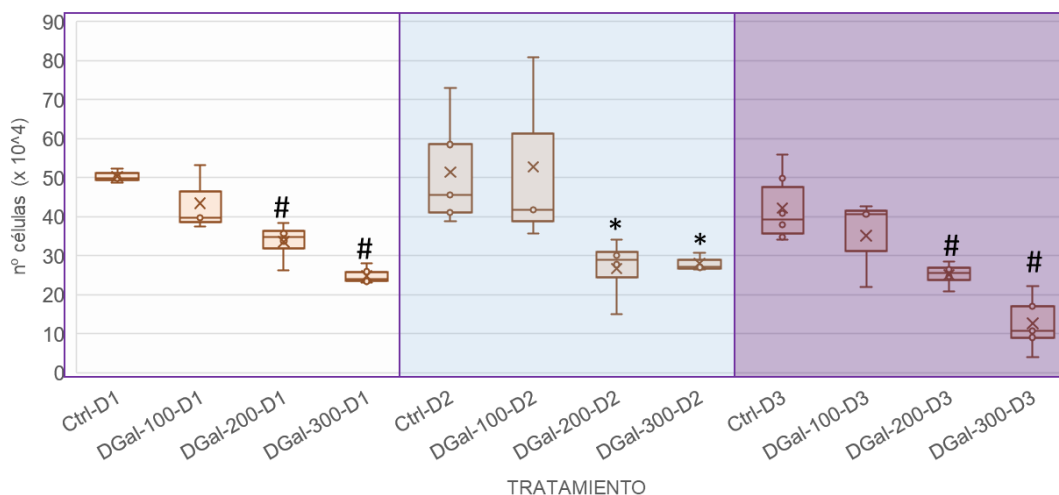


Figura 15: Resultado del estudio del crecimiento de cultivos sembrados a una densidad de 12000 células/cm². Ctrl: medio control; DGal-100: 100 mM D-Gal; DGal-200: 200 mM D-Gal; DGal-300: 300 mM D-Gal. D1: día 1, D2: día 2, D3: día 3. En el cuadrado blanco se recogen los resultados para D1, en azul para D2 y en morado para D3. n=3-6. *p<0,05, #p<0,001 (comparado a cultivos Ctrl).

En paralelo a los contajes celulares, se llevaron a cabo análisis de la **actividad β-gal** en estos cultivos. En base a los resultados obtenidos de los cultivos sembrados a 35000 células/cm², se decidió probar en estos experimentos solo concentraciones de 200 mM y 300 mM DGal en tratamientos de 2 y 3 días de duración. Sólo se observó un aumento significativo de la actividad β-gal en los cultivos DGal-300-D3 (59,4±2,8%) comparados con los cultivos Ctrl-D3 (21,2±5,7%) y DGal-200-D3 (30,8±1,5%) y también con los cultivos DGal-300-D2 (30,7±15,2%). Los resultados del ensayo β-gal se muestran en las Figuras 16 y 17. En la Figura 16 se puede ver cómo se tiñeron las células en cada tratamiento; en este caso, al trabajar a D3, ya se vio alguna célula senescente en cultivos Ctrl. En los cultivos DGal-200-D3 y DGal-300-D3 se observa cómo, en proporción al número de células que hay en cada cultivo, a mayor concentración de D-Gal el número de células teñidas es mayor.

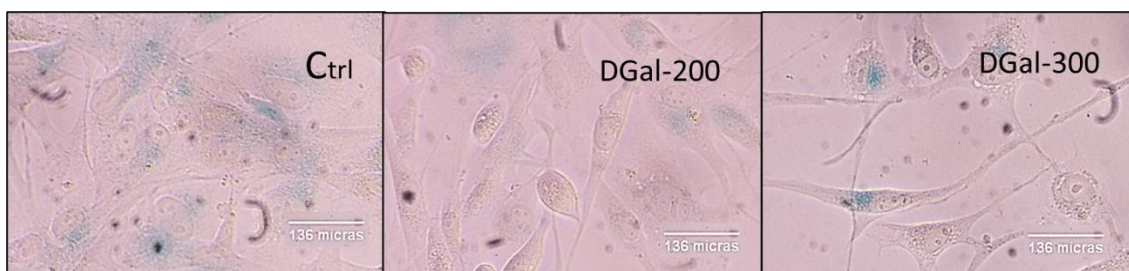


Figura 16: Imágenes obtenidas tras realizar un ensayo de β-galactosidasa en cultivos sembrados a una densidad de 12000 células/cm² y tratados durante 3 días con medio control (Ctrl), 200 mM D-Gal (DGal-200) y 300 mM D-Gal (DGal-300).

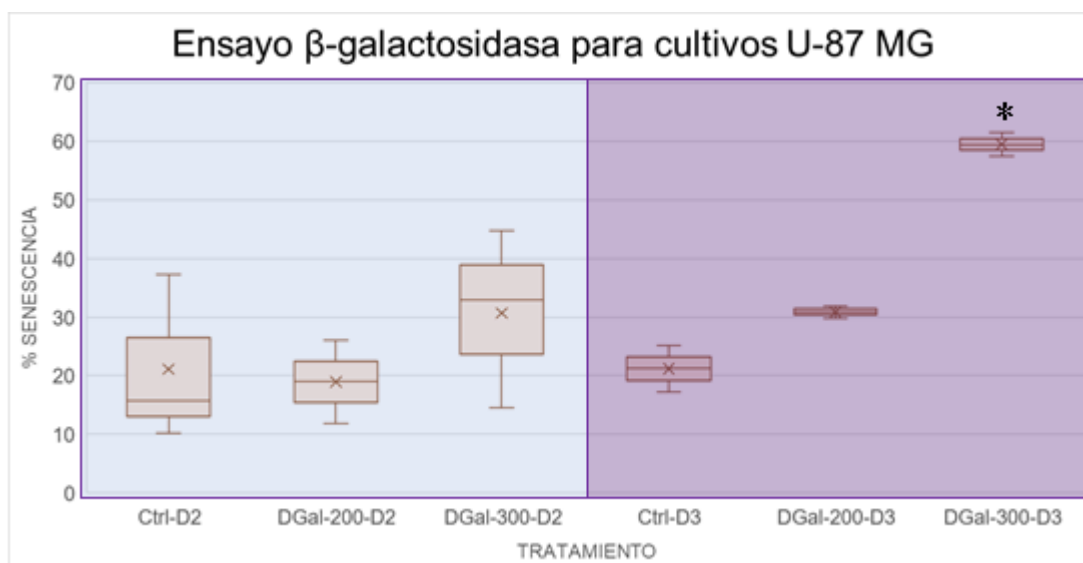


Figura 17: Resultado del ensayo de β -galactosidasa a una densidad celular de 12000 células/cm². En la gráfica se observa cómo el porcentaje de células que tiñen con XGal en cultivos DGal-300-D3 es significativamente mayor que el observado en Ctrl-D3 y DGal-200-D3 (* $p < 0,05$). Los valores observados son el resultado para $n=3$ a D2 y $n=2$ a D3. Ctrl: control; DGal-200: 200 mM D-Gal; DGal-300: 300mM D-Gal.

Realizamos una comparación con los resultados obtenidos de cada tipo de cultivo. Los cultivos sembrados a 35000 células/cm²: (a) presentaban una gran variabilidad con los tratamientos de 200 mM y 300 mM D-Gal; (b) no indicaban un efecto del tratamiento sobre el conteo celular; (c) ofrecían a los 5 días post-siembra, tanto en los cultivos Ctrl como en los tratados, cierta complejidad en su manejo. Esto último se debe a que al alcanzar cierta densidad las células U-87 MG crecen formando agregados que pueden separarse de la superficie de cultivo. Por estas razones, y por los datos favorables obtenidos con los cultivos sembrados a 12000 células/cm², se seleccionaron las siguientes condiciones para obtener cultivos de U-87 MG senescentes: siembra a 12000 células/cm², seguida de un tratamiento de 3 días con 300 mM D-Gal iniciado 48 h después de la siembra.

5.1.2 Validación de DGal-300-D3 como tratamiento que reduce la proliferación de cultivos de células U-87 MG

Para validar estas condiciones, se realizaron otros experimentos. Uno de ellos, consistió en un análisis de la proliferación con el método **Click-It**, que permite detectar las células que se están dividiendo con microscopía de fluorescencia. Los resultados obtenidos indicaron que había un descenso significativo en el número de células que proliferaban en cultivos DGal-300-D3, con respecto a Ctrl-D3 (Figura 18). Se vieron porcentajes de células en división de $15,6 \pm 3,8\%$ y $3,1 \pm 0,21\%$ para Ctrl-D3 y DGal-300-D3, respectivamente. Esta clara parada de la división celular está de acuerdo con lo esperado para cultivos senescentes, en los que se ha descrito que al tratar con 222mM de D-Gal a los cultivos de células CRT astrocíticas y astrocitos primarios de rata se suprime significativamente la viabilidad de los cultivos (7); en otros estudios realizados sobre la línea celular SH-SY5Y también han visto que al tratar con 300 mM D-Gal durante dos días la proliferación celular disminuye en un 53% (41)

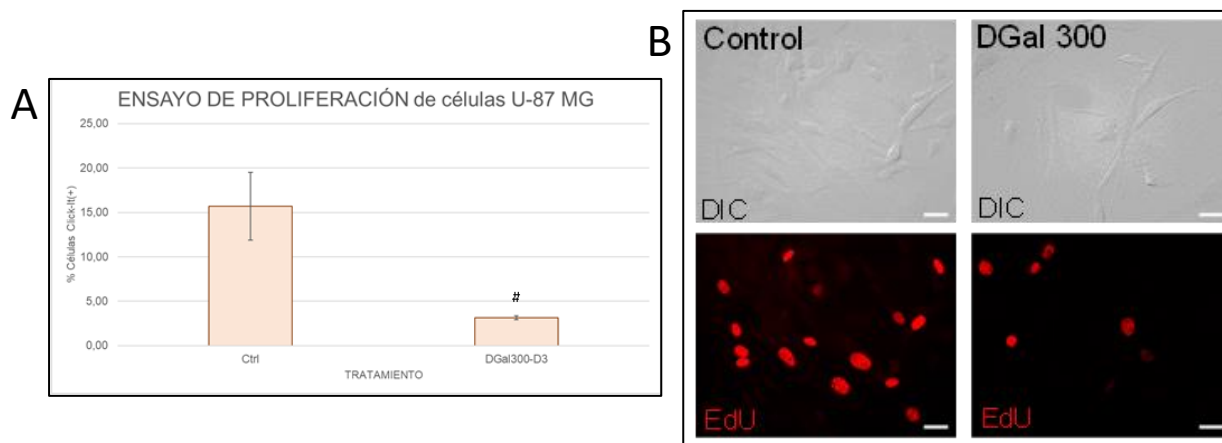


Figura 18: Ensayo de proliferación Click-IT. A) % células en división (ensayo Click-It) en cultivos sembrados a 12000 células/cm². Ctrl: control, DGal300-D3: 300 mM D-Gal durante 3 días. Se observa cómo al tratar las células con D-Gal disminuye la proliferación celular. $n=1$. Los resultados mostrados corresponden a replicados técnicos ($n=10$ para Ctrl y $n=7$ para DGal-300); en cada caso, se contaron más de 650 células. ($\#p<0,001$). B) Imágenes obtenidas de un ensayo Click-IT. Con DIC (Nomarski, contraste de interferencia) se pueden observar las células completas y la tinción con EdU marca el DNA de las células en división. Así, se observa cómo al tratar las células con D-Gal, el número de células en proliferación es mucho menor con respecto al control

5.1.3 Validación de DGal-200-D3 y DGal-300-D3 como tratamientos que causan una disminución en la expresión del gen Lamin B1 en células U-87 MG

En paralelo a estos experimentos, se analizó la expresión de los genes P16^{INK4a} y Lamin B1 (LMNB1), ya que se sabe que aumenta y disminuye su expresión, respectivamente, cuando se induce senescencia. Se realizaron estudios de qPCR para ambos genes tras 3 días de tratamiento con 300 mM D-Gal; en estos experimentos también se analizó la expresión de LMNB1 en cultivos tratados durante 3 días con 200 mM D-Gal. No se detectó señal con los *primers* diseñados para el gen P16^{INK4a} en ninguno de los experimentos. En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos para LMNB1; se observó una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de este gen en cultivos DGal200-D3 y DGal300-D3, comparados con cultivos Ctrl-D3. Como se esperaba, los resultados indicaron una disminución en la expresión del gen LMNB1, siendo esta disminución más prominente a día 3 que a día 2.

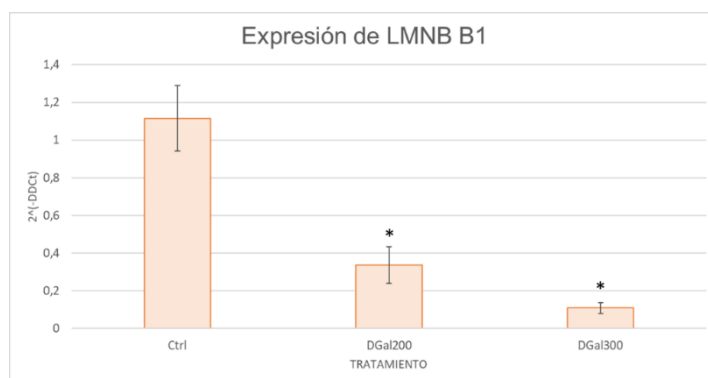


Figura 19: Expresión del gen LMNB1. Al aumentar la concentración de D-Gal se observa cómo la expresión del gen disminuye. Con respecto al Ctrl, se observan diferencias significativas para ambos tratamientos, DGal200 y DGal300 mM. $n=3$. ($*p<0,05$). Ctrl: control; DGal-200: 200 mM D-Gal; DGal-300: 300 mM D-Gal.

5.2 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SENESCENCIA SOBRE LA EXPRESIÓN DE APOD EN CÉLULAS U-87 MG

Una vez seleccionado DGal-300-D3 como el tratamiento a aplicar para inducir senescencia en cultivos de células U-87 MG, se procedió a analizar la expresión del gen APOD en cultivos control y cultivos senescentes, ya que se ha descrito un aumento en la expresión de este gen y su proteína durante el envejecimiento celular.

En primer lugar, se realizó un estudio **qPCR**. Observando la Figura 20 se puede ver un aumento significativo de la expresión del gen APOD en los cultivos tratados con D-Gal.



Figura 20: Expresión relativa del gen APOD. Se detecta un aumento significativo en su expresión en cultivos tratados con D-Gal (* $p < 0,001$). $n=3$. Ctrl: control; DGal-300: 300 mM D-Gal.

Tras confirmar un cambio en la expresión del gen APOD en U-87 MG senescentes con respecto a células control, se procedió a realizar un análisis por **inmunocitoquímica** de la expresión de la proteína en estos cultivos. Como se puede ver en la Figura 21, la proteína se expresa intracelularmente en los cultivos DGal-300-D3, pero prácticamente no se detecta en los cultivos control Ctrl-D3.

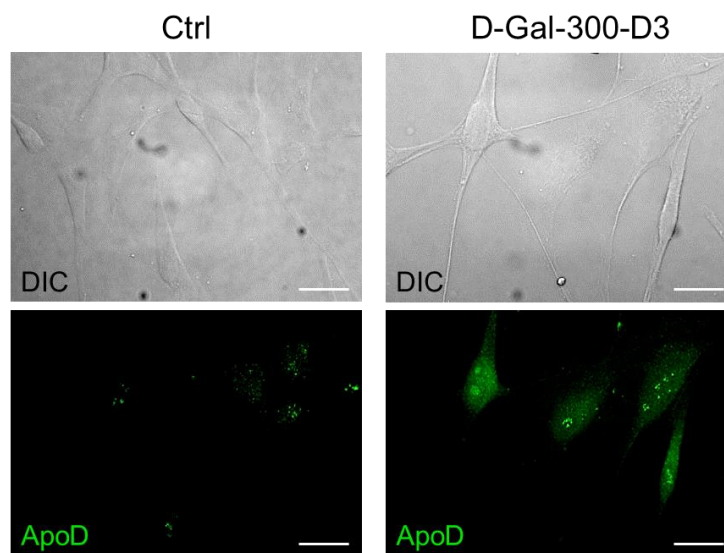


Figura 21: Inmunocitoquímica para la detección de la proteína APOD en células U-87 MG control (Ctrl) y tratadas con 300 mM D-Gal (DGal-300) durante 3 días

Además de la inmunocitoquímica, se realizó un **Western Blot** para comprobar si APOD se expresaba intracelularmente. APOD no se llegó a detectar: en la Figura 22 podemos ver cómo en el gel el anticuerpo se pegó de manera inespecífica; esto es característico cuando no hay suficiente cantidad de proteína, lo que puede significar que no se esté expresando lo suficiente o que se esté secretando al exterior.

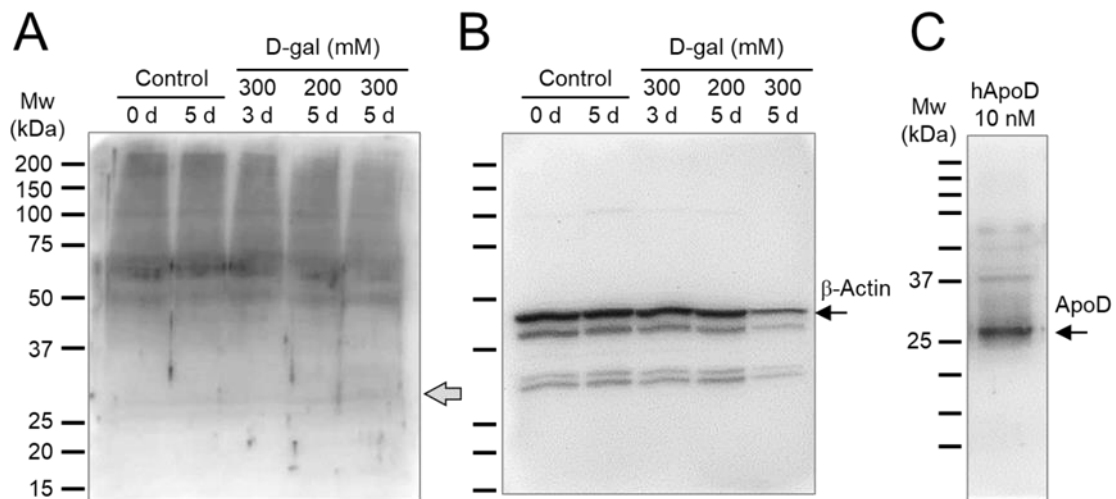


Figura 22: Western Blot para determinar si la proteína APOD se expresaba intracelularmente. A) Expresión de APOD aplicando tratamientos con 200 mM D-Gal durante 5 días y 300 mM D-Gal durante 3 y 5 días. B) Control para (A). C) Control positivo con detección de APOD.

Para verificar si la proteína se estaba secretando, se realizó un **ELISA** con el medio condicionado que se había recogido anteriormente (Figura 23). El resultado dio por debajo del límite de detección, indicando que o no había suficiente proteína o que esta no se estaba secretando.

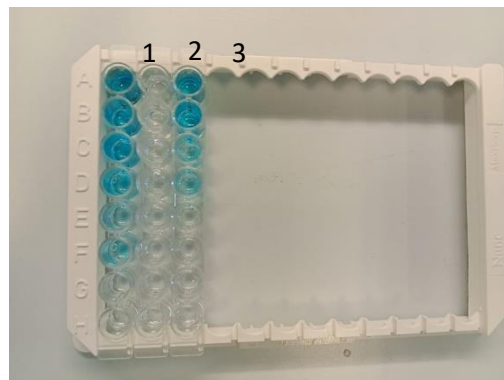


Figura 23: Resultado de un ensayo ELISA. Por columnas se puede ver: 1 A-F: Curva estándar; 2 A-F: Muestras para la detección de APOD; 3 A-D; Control positivo. 3 E-H: Muestras para la detección de APOD

6 DISCUSIÓN

El principal objetivo de este trabajo era establecer un método para inducir senescencia en astrocitos usando D-Galactosa, para después poder analizar el efecto de la senescencia en este tipo celular sobre la expresión de APOD. Estos cultivos serán la base de futuros estudios del efecto de la senescencia en astrocitos sobre la interacción astrocito-neurona. Para establecer el modelo, se eligió la línea celular de glioblastoma humano U-87 MG ya que, frente a las limitaciones que supone el trabajar con una línea celular, estas presentan también grandes ventajas, como la facilidad de cultivo y constante disponibilidad de células humanas. Otra razón por la que se eligió esta línea fue que estudios en el laboratorio han mostrado que estas células expresan niveles muy bajos de APOD; ya que nuestra hipótesis era que el tratamiento con D-Gal aumentaría la expresión de este gen, las U-87 MG eran una buena opción.

Establecimiento del modelo de Senescencia

En este trabajo hemos usado D-Galactosa, un azúcar simple, cómodo y de bajo coste que proporciona resultados estables, se ha empleado para inducir senescencia en diferentes tipos de células y también in vivo (42,45).

Las características más comunes que muestran las células senescentes incluyen una morfología agrandada, aplanada y vacuolada, un aumento de la actividad de la enzima β -galactosidasa asociado a la senescencia, una disminución de la proliferación celular, un aumento de la expresión del gen P16^{INK4a} (CDKN4A) y una disminución de la del gen LAMIN B1 (LMNB1). Aunque no existe un marcador específico para células senescentes, la combinación de varias de estas características en una célula se considera indicativa de un fenotipo senescente; en particular, se ha visto que la disminución en la expresión de Lamin B1 es con frecuencia un claro indicador (12). En este estudio, se analizó el efecto de tratar cultivos sembrados con dos densidades diferentes, 12000 células/cm² y 35000 células/cm², con 100 mM, 200 mM y 300 mM de D-Galactosa durante tres tiempos distintos (1, 2 y 3 días de tratamiento).

Los resultados obtenidos nos llevaron a elegir como el método más efectivo para inducir senescencia el de sembrar los cultivos a 12000 células/cm² y tratarlos con 300 mM de D-Gal durante tres días. Razones para ello fueron: a) las dificultades para consistentemente garantizar buenos cultivos Ctrl-D3 cuando la densidad de siembra era de 35000 células/cm², ya que las células U-87 MG tendían a agruparse en exceso en estos cultivos; b) no se observaron diferencias en la densidad celular entre cultivos Ctrl y cultivos DGal, que indicaran un efecto del tratamiento sobre la proliferación celular; por otra parte, c) sí se vieron diferencias significativas en el número de células en cultivos sembrados a 12000 células/cm² y tratados con D-Gal, comparados a cultivos Ctrl y se observaron cambios en la morfología celular. Inicialmente, se trabajó con cultivos DGal-200-D3 y DGal-300-D3, debido a la muerte celular observada en los cultivos DGal-300-D3. Sin embargo, la observación de que, una vez retirada la D-Gal tras los 3 días de tratamiento, los cultivos permanecían estables, y visto que solo este tratamiento inducía un aumento significativo en los porcentajes de células que tenían con XGal (indicativo de actividad β -galactosidasa), se optó por DGal-300-D3 como el tratamiento óptimo para inducir senescencia en U-87 MG. Los resultados de qPCR de LMNB1 apoyaron esta selección, ya que se observó una mayor reducción en la expresión del gen en cultivos DGal-300-D3. Además, un primer ensayo Click-it indicó que en DGal-300-D3 había una detención significativa de la proliferación con respecto a Ctrl-D3. Por último, se vio cuando se preparaban cultivos para recoger medio condicionado, que no aumentaba la muerte celular en cultivos mantenidos en DGal-300 durante 5 días, en vez de solo 3.

Nuestros estudios son consistentes con otros en los que también se ha utilizado la D-Gal para inducir senescencia en la línea celular U-87 MG (42). Se ha documentado que tratando los cultivos con 222 mM de D-Gal durante 7 días se obtiene un aumento significativo en el porcentaje de células β -galactosidasa positivas (60.36 \pm 2.02%), así

como una disminución en la expresión de LMNB1 (42). En este mismo estudio, se vio cómo al tratar otra línea celular de glioblastoma, C6, con 222 mM de D-Gal durante 8 días, las células presentaban características típicas de senescencia: cambios morfológicos, aumento de la actividad β -galactosidasa, así como una disminución de la expresión del gen LMNB1 y un aumento significativo en la expresión de P16^{INK4a} (42). Con nuestro estudio vimos cómo al tratar los cultivos con una mayor concentración de D-Gal se conseguía inducir el mismo porcentaje de células β -galactosidasa(+), aproximadamente un 60%, en un menor número de días (3 en lugar de 7). Con relación al resultado de qPCR de LMNB1, nuestros datos concuerdan con el estudio realizado por A. Freund y colaboradores (12), donde comprobaron que la lamina B1 se perdía en células humanas en las que se inducía senescencia. Se ha visto que esta disminución se debe a la activación de la vía supresora tumoral p53 o pRB, que provoca que Lamin B1 disminuya su nivel de mRNA a través de una disminución en la estabilidad del mRNA (12). Por otro lado, no se pudo comprobar si se producía un aumento en la expresión del gen CDKN2A ya que no se llegó a detectar su expresión ni en la qPCR, ni en la PCR convencional. Este resultado podría hacer pensar que los niveles de expresión de este gen eran demasiado bajos. Sin embargo, el hecho de que no se detectara expresión también podría deberse a los *primers* utilizados; habría que diseñar y probar nuevos primers para comprobarlo, dado que en otros estudios como los realizados por Rekha Bhat y colaboradores (2), se describe p16^{INK4a} como biomarcador de senescencia. En este caso, describieron un aumento significativo del gen y demostraron la presencia de astrocitos senescentes en sujetos entre 35 y 50 años y entre 78 y 90 años.

Efecto de la senescencia sobre la expresión de APOD

Todos los días las células dañadas mueren y son reemplazadas por células nuevas y sanas. Sin embargo, a medida que vamos envejeciendo, el cuerpo no elimina estas células tan eficientemente y, aunque esas células ya no se dividen, no mueren. Estas células que perduran son las células senescentes y pueden liberar sustancias químicas que dañan las células de su entorno. Estudios recientes en modelos animales han demostrado que las células senescentes juegan un papel importante en la degeneración y deterioro cognitivo (18). Pero no todas las células senescentes son dañinas, algunas también están involucradas en procesos fisiológicos normales y tienen funciones beneficiosas (46).

Entre las sustancias químicas que secretan las células senescentes destaca la apolipoproteína D, ApoD, que como se ha mencionado con anterioridad, es la proteína neuroprotectora que más se sobreexpresa en enfermedades neurodegenerativas. La neuroprotección ejercida por ApoD no solo influye en las células que expresan la proteína, como los astrocitos, sino que también afecta a las neuronas de manera paracrina (47,48). En este trabajo, se ha podido demostrar cómo los cultivos senescentes expresaban aproximadamente 2,5 veces más el gen APOD con respecto a los cultivos control no senescentes. Además, mediante inmunocitoquímica se pudo comprobar cómo ese aumento en la expresión del gen se detectaba también a nivel de proteína, que pudo detectarse en los cultivos tratados con D-Gal. Sabiendo que los cultivos senescentes expresaban esta proteína, se quiso determinar si la proteína se expresaba intracelularmente o si se secretaba; sin embargo, esto no se pudo comprobar ya que APOD no se detectó ni en Western blots ni en tests de ELISA. Dados los resultados obtenidos en los estudios de inmunocitoquímica, es posible que estos experimentos necesiten una optimización. En otras investigaciones, al inducir senescencia se ha visto, por RNA-seq, que el gen APOE ve aumentada su expresión (1). Esta apolipoproteína participa en el metabolismo y transporte de lípidos y péptidos hidrofóbicos, entre ellos el péptido A β . Al igual que APOD, es importante en la EA (1), y será relevante estudiarla en el futuro, dado que también se expresa en los astrocitos.

7 CONCLUSIONES

Durante este trabajo se han establecido unas condiciones de cultivo que inducen un fenotipo senescente en una línea celular de origen astrocítico. Estudios de la expresión del gen APOD en estos cultivos indican un aumento en los niveles de mRNA, así como la expresión de la proteína dentro de la célula. Aunque no se han podido demostrar cambios en los niveles de expresión de la proteína (pudiera ser que el método experimental necesite optimización), se han recogido medios condicionados por estas células que servirán para trabajo futuro.

Los astrocitos pueden afectar a la maduración y proliferación de neuronas y a su fisiología y comunicación sináptica (26,27) y las neuronas pueden a su vez afectar a la fisiología y la expresión génica de los astrocitos (49,50). Así, algunos estudios, como el realizado por De Simeone y colaboradores (51), que estudia la interacción astrocito-neurona, prueban tres neurotóxicos diferentes en monocultivos de astrocitos y neuronas y determinan si sus efectos podrían ser mitigados en condiciones de co-cultivo con astrocitos. Llegan a la conclusión de que, cuando los astrocitos se cultivan junto a las neuronas, atenúan los efectos citotóxicos de los agentes testados y los astrocitos se vuelven más resistentes (51). Como parte de mi trabajo en el laboratorio he recogido medios condicionados de astrocitos tratados con DGal-300 durante 3 y 5 días. Estos medios se utilizarán para iniciar la siguiente fase del proyecto, centrada en estudiar la interacción astrocito-neurona. Inicialmente, se analizará el efecto de los medios condicionados recogidos sobre la viabilidad neuronal utilizando líneas neuronales.

Todos los trabajos realizados hasta el momento sugieren que la senescencia celular contribuye al envejecimiento y sus enfermedades y varios estudios han demostrado resultados prometedores con medicamentos senolíticos (20). Por eso, el trabajo que presento sirve como primera fase de una línea de investigación prometedora, y, sobre todo, necesaria.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Limbad C, Oron TR, Alimirah F, Davalos AR, Tracy TE, Gan L, et al. Astrocyte senescence promotes glutamate toxicity in cortical neurons. 2020 [cited 2023 Jun 20]; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227887>
2. Bhat R, Crowe EP, Bitto A, Moh M, Katsetos CD, Garcia FU, et al. Astrocyte Senescence as a Component of Alzheimer's Disease. *PLoS One*. 2012 Sep 12;7(9).
3. van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature*. 2014 May 22;509(7501):439–46.
4. Zhou F, Onizawa S, Nagai A, Aoshiba K. Epithelial cell senescence impairs repair process and exacerbates inflammation after airway injury. *Respir Res* [Internet]. 2011 Jun 10 [cited 2023 Sep 9];12(1):1–18. Available from: <https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/1465-9921-12-78>
5. Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, Liu S, Sarnoski EA, Freund A, et al. Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell Metab* [Internet]. 2016 Feb 9 [cited 2023 Sep 9];23(2):303–14. Available from: <http://www.cell.com/article/S1550413115005781/fulltext>
6. Schnabl B. Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype. *Hepatology*. 2003 Mar;37(3):653–64.
7. Hou J, Yun Y, Xue J, Sun M, Kim S. D-galactose induces astrocytic aging and contributes to astrocytoma progression and chemoresistance via cellular senescence. *Mol Med Rep*. 2019;20(5):4111–8.
8. Dimri GP, Leet X, Basile G, Acosta M, Scorr G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo (replicative senescence/tumor suppression/18-galactosidase) Communicated by Arthur. Vol. 92, *Cell Biology*. 1995.
9. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*. 2006 Apr;5(2):187–95.
10. Xu X, Shen X, Wang J, Feng W, Wang M, Miao X, et al. YAP prevents premature senescence of astrocytes and cognitive decline of Alzheimer's disease through regulating CDK6 signaling. *Aging Cell* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2023 Jun 22];20(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34415667/>
11. von Zglinicki T, Nilsson E, Döcke WD, Brunk UT. LIPOFUSCIN ACCUMULATION AND AGEING OF FIBROBLASTS. *Gerontology*. 1995;41(2):95–108.
12. Freund A, Laberge RM, Demaria M, Campisi J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell*. 2012 Jun 1;23(11):2066–75.
13. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *Journal of Clinical Investigation*. 2004 Nov 1;114(9):1299–307.
14. Perrigue PM, Silva ME, Warden CD, Feng NL, Reid MA, Mota DJ, et al. The Histone Demethylase Jumonji Coordinates Cellular Senescence Including Secretion of Neural Stem Cell-attracting Cytokines. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2023 Aug 29];13(4):636. Available from: </pmc/articles/PMC4844544/>
15. Campisi J, Yaswen P. Aging and cancer cell biology, 2009. *Aging Cell*. 2009;8(3):221–5.
16. Adams PD. Remodeling chromatin for senescence. *Aging Cell*. 2007 Aug;6(4):425–7.
17. Dassati S, Waldner A, Schweigreiter R. Apolipoprotein D takes center stage in the stress response of the aging and degenerative brain. Vol. 35, *Neurobiology of Aging*. 2014. p. 1632–42.

18. Liu RM. Aging, Cellular Senescence, and Alzheimer's Disease. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
19. Musi N, Valentine JM, Sickora KR, Baeuerle E, Thompson CS, Shen Q, et al. Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain. *Aging Cell*. 2018 Dec;17(6):e12840.
20. Zhang P, Kishimoto Y, Grammatikakis I, Gottimukkala K, Cutler RG, Zhang S, et al. Senolytic therapy alleviates A β -associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci*. 2019 May 1;22(5):719–28.
21. Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, Swenson BL, van Deursen JM, Baker DJ. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature*. 2018 Oct 19;562(7728):578–82.
22. Sanchez D, Bajo-Grañeras R, Del Caño-Espinel M, Garcia-Centeno R, Garcia-Mateo N, Pascua-Maestro R, et al. Aging without apolipoprotein d: Molecular and cellular modifications in the hippocampus and cortex. *Exp Gerontol*. 2015 Jul 1;67:19–47.
23. Rassart E, Desmarais F, Najyb O, Bergeron KF, Mounier C. Apolipoprotein D. Vol. 756, *Gene*. Elsevier B.V.; 2020.
24. Ganfornina MD, Do Carmo S, Lora JM, Torres-Schumann S, Vogel M, Allhorn M, et al. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell*. 2008 Aug;7(4):506–15.
25. Dale Purves. *Neurociencia*. Panamericana. 2020;5^o:13–22.
26. García-Martín E, Majewska AK, Guizzetti M, Jäkel S, Dimou L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. 2017 [cited 2023 Jun 22]; Available from: www.frontiersin.org
27. López-Teros M, Alarcón-Aguilar A, López-Diazguerrero NE, Luna-López A, Königsberg M. Contribution of senescent and reactive astrocytes on central nervous system inflammaging. Vol. 23, *Biogerontology*. Springer Science and Business Media B.V.; 2022. p. 21–33.
28. Dozio V, Sanchez JC. Profiling the proteomic inflammatory state of human astrocytes using DIA mass spectrometry. *J Neuroinflammation*. 2018 Dec 30;15(1):331.
29. Bobermin LD, Roppa RHA, Gonçalves CA, Quincozes-Santos A. Ammonia-Induced Glial-Inflammaging. *Mol Neurobiol*. 2020 Aug 15;57(8):3552–67.
30. Villablanca C, Vidal R, Gonzalez-Billault C. Are cytoskeleton changes observed in astrocytes functionally linked to aging? *Brain Res Bull*. 2023 May 1;196:59–67.
31. Nanclares C, Baraibar AM, Araque A, Kofuji P. Dysregulation of astrocyte–neuronal communication in Alzheimer's disease. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021.
32. Li T, Tan X, Li S, Al-Nusaif M, Le W. Role of Glia-Derived Extracellular Vesicles in Neurodegenerative Diseases. Vol. 13, *Frontiers in Aging Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2021.
33. Meldolesi J. Role of Senescent Astrocytes in Health and Disease. Vol. 24, *International journal of molecular sciences*. NLM (Medline); 2023.
34. Palmer AL, Ousman SS. Astrocytes and Aging. *Front Aging Neurosci*. 2018 Oct 26;10.
35. Mahmoud S, Gharagozloo M, Simard C, Gris D. Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells*. 2019 Feb 20;8(2):184.
36. Cohen J, Torres C. Astrocyte senescence: Evidence and significance. *Aging Cell*. 2019 Jun 1;18(3).
37. Miranda CJ, Braun L, Jiang Y, Hester ME, Zhang L, Riolo M, et al. Aging Brain Microenvironment Decreases Hippocampal Neurogenesis Through Wnt-Mediated Survivin Signaling. *Aging Cell* [Internet]. 2012 Jun [cited 2023 Sep 14];11(3):542. Available from: [/pmc/articles/PMC3350615/](http://pmc/articles/PMC3350615/)

38. Young ARJ, Cassidy LD, Narita M. Autophagy and senescence, converging roles in pathophysiology as seen through mouse models. In 2021. p. 113–45.
39. Zhang Y, Zhao L, Wu Z, Chen X, Ma T. Galantamine alleviates senescence of U87 cells induced by beta-amyloid through decreasing ROS production. *Neurosci Lett*. 2017 Jul 13;653:183–8.
40. Correia-Melo C, Passos JF. Mitochondria: Are they causal players in cellular senescence? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2015 Nov 1;1847(11):1373–9.
41. Lee J, Kim YS, Kim E, Kim Y, Kim Y. Curcumin and hesperetin attenuate d-galactose-induced brain senescence in vitro and in vivo. *Nutr Res Pract*. 2020 Oct 1;14(5):438–52.
42. Xu X, Shen X, Feng W, Yang D, Jin L, Wang J, et al. D-galactose induces senescence of glioblastoma cells through YAP-CDK6 pathway [Internet]. Vol. 12. 2020. Available from: www.aging-us.com
43. Liu Q, Xu X, Zhao M, Wei Z, Li X, Zhang X, et al. Berberine induces senescence of human glioblastoma cells by downregulating the EGFR-MEK-ERK signaling pathway. *Mol Cancer Ther*. 2015 Feb 1;14(2):355–63.
44. Ruiz M, Sanchez D, Correnti C, Strong RK, Ganfornina MD. Lipid-binding properties of human ApoD and Lazarillo-related lipocalins: functional implications for cell differentiation. *FEBS J* [Internet]. 2013 Aug [cited 2023 Sep 15];280(16):3928–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23777559/>
45. Azman KF, Zakaria R. d-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. *Biogerontology*. 2019 Dec 20;20(6):763–82.
46. Regulski MJ. Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds*. 2017 Jun;29(6):168–74.
47. Pascua-Maestro R, Diez-Hermano S, Lillo C, Ganfornina MD, Sanchez D. Protecting cells by protecting their vulnerable lysosomes: Identification of a new mechanism for preserving lysosomal functional integrity upon oxidative stress. *PLoS Genet* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2023 Aug 29];13(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28182653/>
48. Bajo-Grañeras R, Ganfornina MD, Martín-Tejedor E, Sanchez D. Apolipoprotein D mediates autocrine protection of astrocytes and controls their reactivity level, contributing to the functional maintenance of paraquat-challenged dopaminergic systems. *Glia* [Internet]. 2011 Oct [cited 2023 Aug 29];59(10):1551–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21688324/>
49. Steward O, Torre ER, Tomasulo R, Lothman E. Neuronal activity up-regulates astroglial gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 1991 [cited 2023 Sep 13];88:6819–23. Available from: <https://www.pnas.org>
50. Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, et al. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature*. 1998 Jan;391(6664):281–5.
51. De Simone U, Caloni F, Gribaldo L, Coccini T. Human Co-culture Model of Neurons and Astrocytes to Test Acute Cytotoxicity of Neurotoxic Compounds. *Int J Toxicol*. 2017 Nov 19;36(6):463–77.