



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Posgrado en Biología Experimental

**Inhibición de la secreción de citocinas proinflamatorias del SASP de astrocitos
de rata Wistar inducidos a senescencia prematura**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Biología Experimental

P R E S E N T A

LUIS ÁNGEL MACIEL BARÓN

Comité Tutorial:

Co-Directora: **Dra. Mina Königsberg Fainstein**

Co-Director: **Dr. Claudio Torres**

Asesora externa: **Dra. Viviana Pérez**

Ciudad de México

Mayo de 2019

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

Número de registro de la beca otorgada por el CONACYT: 265781.

Número de becario: 265781

CVU: 420075

Miembros del jurado

Presidenta: Dra Norma Edith López Diazguerrero

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa



Secretaria: Dra. Susana Castro Obregón

Instituto de Fisiología Celular

Universidad Nacional Autónoma de México



Vocal: Dra. Anahí Chavarría Krauser

Departamento de Medicina Experimental

Facultad de Medicina UNAM

Hospital General de México



Vocal: Dra. Rebeca López Marure

Departamento de Fisiología

Instituto Nacional de Cardiología



Miembros del Comité Tutorial

Co-Directora: Dra. Mina Königsberg Fainstein

Departamento de Ciencias de la Salud, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana,
Unidad Iztapalapa, México D. F. México.

Co-Director: Dr. Claudio Torres

Department of Pathology & Laboratory Medicine. Drexel University College of
Medicine, Philadelphia PA, USA.

Asesora externa: Dra. Viviana Pérez

Department of Biochemistry and Biophysics. Linus Pauling Institute. Oregon State
University. Corvallis OR, USA.

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a las víctimas y damnificados del sismo ocurrido el 19 de septiembre de 2017; especialmente a los investigadores, estudiantes y trabajadores del edificio S de la UAM Iztapalapa quienes, a dos años del suceso, siguen sin recibir un espacio digno donde desarrollar su importante labor. También dedico este trabajo a la memoria de mi compañera de preparatoria Gabriela Rodríguez, quien perdió la vida a causa del sismo, y a la memoria de otras 3 grandes personas que perdieron la vida en los últimos años:

Viridiana González, compañera, mentora y amiga durante mis estudios de maestría;

David Yafté, compañero de trabajo y amigo

Mireya Barón, tía, amiga y compañera de viajes y aventuras.

Los echaré de menos y honraré su memoria en cada día de mi vida...

Y por supuesto, a la memoria de mi padre, Marco Antonio Maciel.

Agradecimientos

A la Dra. Mina Konigsberg, muchas gracias por confiar nuevamente en mí para este proyecto y por todo el apoyo brindado tanto en el ámbito académico como en el personal.

Al Dr. Claudio Torres por ser parte de mi comité tutorial y por enriquecer este trabajo con sus comentarios.

A la Dra. Viviana Pérez por los comentarios, sugerencias y observaciones a lo largo de estos 4 años.

A las doctoras Susana Castro, Anahí Chavarría, Rebeca López y Norma Edith López por enriquecer este trabajo con sus comentarios y observaciones.

A la Dra. Lourdes Massieu del IFC por permitirme llevar a cabo los últimos experimentos de este trabajo en su laboratorio.

A la Dra. Ruth Rincón por su valioso apoyo en el análisis de microscopia confocal.

Al Dr. Jorge Antonio García por su apoyo en el análisis del SASP por multiplex.

Al Dr. Luis Enrique Gómez Quiróz por su apoyo como coordinador del posgrado y sus comentarios que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Armando Luna por sus comentarios, apoyo técnico, sugerencias, preguntas, etc. a lo largo de estos 7 años que hemos colaborado.

A mis compañeros de laboratorio: Pedro, Sandra, Rafa, Gibrán, Paola, Alex, Vero, Angie, Mónica, Ady, Elisa, Naty, Edith, Ula, David, Roberto, Royer, Silvia, Alfredo,

Betty, Alice, Belén... mil gracias por compartir grandes momentos. ¡Los echo de menos!

A mi familia. Mi esposa Nancy quien siempre ha estado aquí, en las buenas y en las malas. Quien no me ha dejado caer y ha recorrido conmigo ya 11 años. A las pequeñitas que tenemos juntos, Nabiki e Iris quienes cada día me brindan el amor más grande al que uno puede aspirar. ¡Las amo!

A mi mamá, Lorena Barón, quien ya me perdonó por desertar de la preparatoria hace algunos años... ¿Te dedico más títulos, mamita? Por estar siempre que la necesito y por todos los años de sacrificio por mí.

A mi hermano, Alejandro Maciel, por el apoyo que me ha brindado en estos años.

A los amigos virtuales que he hecho en los últimos años y con quienes he comenzado a emprender algunos proyectos. Especialmente a Oliver Barona quien me motivo a echar a andar proyectos que ya comenzaban a llenarse de telarañas en mi cabeza y a María Fernanda Montoya, quien ha participado en forma incondicional en dichos proyectos. ¡Vamos por algo grande!

A mis colegas de La Casa de las Matemáticas, quienes han estado ahí para no dejarme caer: Omar, Ángeles, Mónica, Alejandro, Yessenia, mil gracias por sumarse al esfuerzo y hacer suyo este proyecto.

A mis alumnos, en quienes veo reflejados los sueños que tenía hace años. Ustedes son el futuro, chicos, gracias por permitirme construirlo a su lado.

Resumen

El envejecimiento es un proceso natural en la vida de los organismos en el que disminuyen de manera gradual, sus capacidades físicas y mentales, aumentando el riesgo de padecer enfermedades crónicas y crónico-degenerativas. Un fenómeno asociado al envejecimiento es la acumulación gradual de células senescentes en los tejidos de los individuos. La senescencia celular consiste en un conjunto de cambios que ocurren en una célula como producto de su exposición a ciertos tipos de estrés o a estímulos endógenos. Una de las principales características de las células senescentes es el perfil de secreción proinflamatorio conocido como Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia (SASP, por sus siglas en inglés) el cual es el causante de las actividades biológicas inducidas por las células senescentes. En el Sistema Nervioso Central, se ha asociado la senescencia celular en astrocitos con neurodegeneración, sin embargo, poco se ha estudiado del SASP de astrocitos y su similitud con otros tipos celulares. En este trabajo se analizó, de forma cuantitativa el SASP de astrocitos de rata Wistar inducidos a senescencia por estrés oxidante (SIPS) e inhibición del proteosoma (PIIPS), empleando la tecnología de inmunoensayo Multiplex. El SASP incluyó principalmente quimiocinas e IL-1 α . Sin embargo, en el SASP de astrocitos no se detectó la IL-6, que ha sido reportada en otros tipos celulares, ni tuvo efecto en el potencial de membrana mitocondrial de neuronas corticales expuestas a él.

Para evaluar la posibilidad de modificar la secreción del SASP, se trató a los astrocitos senescentes con tres fármacos: sulforafano, dehidroepiandrosterona y ácido

acetilsalicílico. Los dos primeros generaron una disminución en la secreción de varios factores del SASP, en particular disminuyeron la secreción de la IL-1 α e incrementaron la de IL-10, sugiriendo que estos fármacos podrían, potencialmente, ser utilizados para reducir la inflamación crónica provocada por los astrocitos senescentes en los cerebros de organismos envejecidos. El ácido acetilsalicílico no disminuyó la secreción de las citocinas proinflamatorias de los astrocitos senescentes.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, concluimos que los factores secretados por las células senescentes pueden variar en función del tipo celular y de la forma en que entraron en senescencia, además, demostramos que el perfil de secreción de los astrocitos senescentes puede ser modificado con el tratamiento de distintos fármacos de acción antiinflamatoria.

Abstract

Aging is a natural process of the living organisms in which their physical and mental abilities gradually decrease and, as a consequence, the risk to suffer chronic and chronic-degenerative diseases increase. The accumulation of senescent cells within the tissues is an aging-related phenomenon. Cellular senescence consists in a set of changes that occur in the cell as a product of its exposure to some kinds of stress or by endogenous stimuli. One of the main hallmarks of cellular senescence is its secretory profile called Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP), which is the driver of the biology activities induced by senescent cells. In the Central Nervous System, cellular senescence has been associated with neurodegeneration, however, little is known about the composition of the SASP from astrocytes compared with other cell types. In this study, a quantitative analysis of the SASP from senescent astrocytes induced by oxidative stress or proteasome inhibition was carried out using the Multiplex technology. The SASP mainly included chemokines and IL-1 α . However, IL-6 that has been reported in other cell types was not found, and the SASP did not have any effect in the mitochondrial membrane potential of cortical neurons exposed to it.

To evaluate the possibility of modify the SASP secretion, senescent astrocytes were treated with three anti-inflammatory drugs: sulforaphane, dehydroepiandrosterone and acetylsalicylic acid. The first two, decreased the secretion of some SASP factors, in particular IL-1 α secretion, and increased the anti-inflammatory IL-10, suggesting that both drugs could, potentially, be used to reduce the chronic inflammation provoked by

senescent astrocytes in the brain of aged organisms. Acetylsalicylic acid did not decrease or change the SASP profile of senescent astrocytes.

Whit these results, we concluded that secreted factors by senescent cells can vary as a function of the cell type and with the stimuli that induce senescence. Moreover, we demonstrated that the secretion profile of senescent astrocytes can be modified with anti-inflammatory drugs treatments.

Lista de abreviaturas

ASA	Ácido acetilsalicílico
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3 related
CD	Patrón de diferenciación
CDK	Cinasa dependiente de Ciclina
CDKI	Inhibidor de CDK
CEBP	Proteína de unión a secuencia CCAAT tipo beta
CONAPO	Consejo Nacional de Población
COPD	Enfermedad pulmonar crónica obstructiva
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DDR	Respuesta de daño al ADN
DSB	Rompimientos de cadena doble
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
ERN	Especies reactivas de Nitrógeno
ERO	Especies reactivas de Oxígeno
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
GRO	Oncogene regulado por crecimiento
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
IGFP	Proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina
IL	Interleucina
JAK	Quinasa de Janus
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MCP	Proteína quimioatrayente de monocitos
MIP	Proteína Inflamatoria de macrófagos
MMP	Metaloproteinasas de matriz
mTOR	Proteína TOR de mamíferos

NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NFKB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
OIS	Senescencia Inducida por Oncogenes
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
PD	Duplicaciones Poblacionales
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfoinositol 3- Cinasa
PIIPS	Senescencia Prematura Inducida por Inhibición del Proteosoma
pRB	Proteína del retinoblastoma
SASP	Fenotipo secretor asociado a la senescencia
SC	Senescencia celular
SFN	Sulforafano
SIPS	Senescencia prematura inducida por estrés
SOD	Superóxido dismutasa
SR	Senescencia replicativa
SSB	Rompimientos de cadena sencilla
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TIMP	Inhibidor de metaloproteinasa
TNF	Factor de necrosis tumoral
TOR	Blanco de rapamicina
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

Índice

Introducción.....	1
<i>Transición demográfica en México y el mundo</i>	<i>1</i>
<i>El envejecimiento es el primer factor de riesgo de padecer enfermedades crónicas y crónico degenerativas... ..</i>	<i>3</i>
<i>La senescencia celular.....</i>	<i>6</i>
<i>Vías de señalización involucradas en la inducción de senescencia.....</i>	<i>9</i>
<i>El fenotipo secretor asociado a la senescencia y su regulación.....</i>	<i>14</i>
<i>La senescencia celular es un proceso común a lo largo de la vida de los individuos... ..</i>	<i>20</i>
<i>Mecanismos de intervención sobre las células senescentes.....</i>	<i>23</i>
Antecedentes.....	25
Justificación.....	29
Hipótesis.....	30
Objetivo general	30
Objetivos particulares... ..	30
Material y Método.....	31
<i>Reactivos.....</i>	<i>31</i>
<i>Animales... ..</i>	<i>31</i>
<i>Cultivo primario de astrocitos... ..</i>	<i>32</i>
<i>Cultivo primario de neuronas corticales.....</i>	<i>33</i>
<i>Cultivo primario de fibroblastos del pulmón.....</i>	<i>35</i>
<i>Caracterización celular.....</i>	<i>35</i>
<i>Inducción de senescencia prematura en astrocitos.....</i>	<i>36</i>
<i>Tinción de actividad de β-galactosidasa asociada a la senescencia.....</i>	<i>37</i>
<i>Inmunocitoquímica.....</i>	<i>37</i>
<i>Tratamiento de los astrocitos con los posibles inhibidores del SASP.....</i>	<i>39</i>

<i>Determinación del SASp en los medios condicionados de astrocitos senescentes</i>	39
<i>Cuantificación de IL-6</i>	40
<i>Exposición de neuronas al medio condicionado de astrocitos senescentes.</i>	40
<i>Potencial de membrana mitocondrial</i>	41
<i>Análisis estadístico</i>	41
Resultados.....	43
<i>El estrés oxidante y la inhibición del proteosoma inducen senescencia prematura</i>	43
<i>El Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia de astrocitos difiere del perfil clásico de secreción</i>	53
<i>Efecto de los posibles moduladores en la secreción del SASP</i>	58
<i>Efecto del SASP de Astrocitos en el potencial de membrana mitocondrial de neuronas corticales</i>	66
Discusión.....	72
Conclusiones y perspectivas... ..	81
Referencias.....	83
Anexo I: Artículo de investigación	95
Anexo II: Artículo de revisión	112

Inhibición de la secreción de citocinas proinflamatorias del SASP de astrocitos de rata Wistar inducidos a senescencia prematura

Introducción

Transición demográfica en México y el mundo

En 2004, el Consejo Nacional de Población (CONAPO) publicó la primera edición del libro titulado “Envejecimiento de la Población de México: Reto del siglo XXI”. En ese libro se revisaban las estimaciones sobre uno de los fenómenos al que nos enfrentaremos en este siglo: la transición demográfica (Figura 1). Este fenómeno se refiere al cambio en las proporciones de distintos grupos de edad en nuestra sociedad. Así, si en el año 2015 el grupo de adultos mayores (> 60 años) representaron el 10% de la población mexicana, se prevé que para 2050 dicho grupo de edad alcance el 21.5%, lo que significa que aproximadamente 1 de cada 5 mexicanos serán adultos mayores (19). Este fenómeno no es exclusivo de nuestro país o de nuestra región, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que para el año 2050 el 16% de la población mundial tendrá más de 60 años, aproximadamente 1,500 millones de adultos mayores en el mundo. En 2010 la población mundial de adultos mayores representó un 8% de la población mundial, lo que significa que en 40 años la proporción mundial de adultos mayores se duplicará. Además, este fenómeno será distinto en países desarrollados que en países en vía de desarrollo; los primeros experimentarán un incremento del 71% de sus adultos mayores, mientras que los segundos un 250%. Existen muchos factores que explican este fenómeno, pero el primordial es la

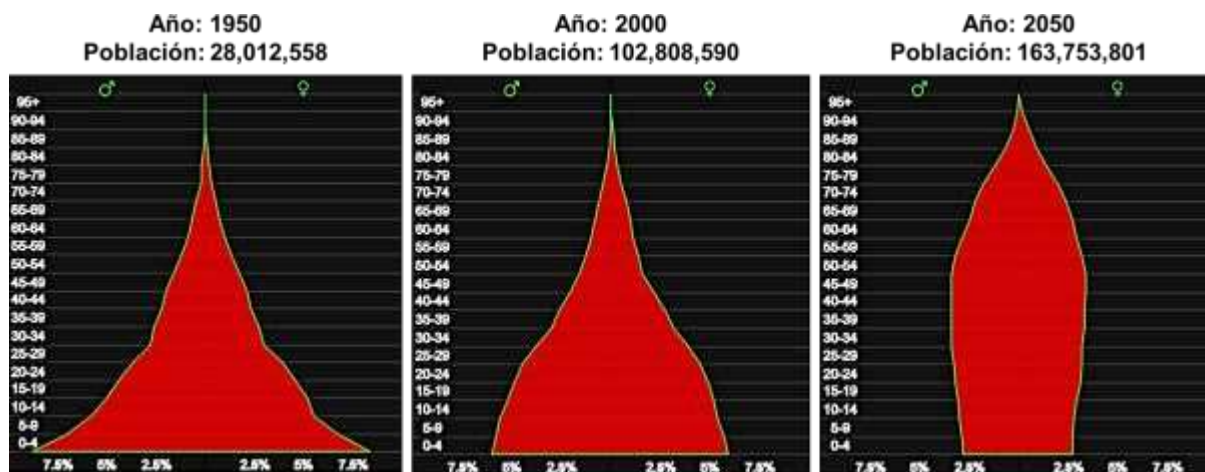


Figura 1. Transición demográfica en México 1950-2050

Las pirámides poblacionales muestran la proporción de personas en la población mexicana con respecto a la edad que hubo en los años 1950 y 2000. En el panel derecho se muestra la proyección prevista para el año 2050. Se observa que la proporción de la población joven disminuirá, mientras que la población de adultos mayores aumentará. Las gráficas están hechas con datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Banco Mundial y la Organización de las Naciones Unidas (ONU).

*Imágenes modificadas de <https://www.worldlifeexpectancy.com/country-health-profile/mexico>

disminución en las tasas de natalidad y el incremento en la esperanza de vida de la población (85).

La transición demográfica desencadenará cambios sociales, tanto en nuestro país como en el mundo, para los que debemos prepararnos con anticipación. En México alrededor del 65% de los hombres de entre 60 y 64 años aún son económicamente activos y, aunque con la edad disminuye esta proporción, a los 80 años el 25% de los varones aún trabajan. Por otro lado, solo el 10% de las mujeres mayores a 60 años mantienen alguna actividad económica. En el escenario de la transición demográfica, si se mantiene el mismo sistema laboral y de pensiones, los adultos mayores jugarán un papel de gran impacto en la productividad de nuestro país en el año 2050 (19).

En contraparte, el grupo de adultos mayores es el que representa una mayor tasa de morbilidad. Las cinco causas principales de muerte en este grupo en el año 2000 fueron, en este orden: enfermedades cardiovasculares, neoplasias malignas, diabetes mellitus, enfermedades digestivas y enfermedades respiratorias (19). En el futuro, la proporción de pacientes con enfermedades crónico-degenerativas aumentará como consecuencia de la transición demográfica. Los costos asociados al tratamiento de las enfermedades crónico-degenerativas incrementarán notablemente debido a la cronicidad e implican el uso de terapias basadas en tecnologías y medicamentos costosos, además de que los pacientes requieren de largos periodos de hospitalización. En resumen, si mantenemos la tendencia actual, tendremos una sociedad en la que una quinta parte de la población demandará atención de los sistemas de salud y al mismo tiempo participará en buena medida en la productividad y economía de nuestro país.

El envejecimiento es el primer factor de riesgo de padecer enfermedades crónicas y crónico-degenerativas.

La OMS define el envejecimiento como “la consecuencia de la acumulación de una gran variedad de daños moleculares y celulares a lo largo del tiempo, lo que lleva un descenso gradual de las capacidades físicas y mentales, un aumento del riesgo de enfermedad, y finalmente a la muerte” (85). En 2013 López-Otin y colaboradores publicaron un trabajo de revisión en el que sugirieron nueve marcadores del envejecimiento a nivel molecular y celular (61): Inestabilidad genómica, acortamiento de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, desregulación en

los mecanismos de censado de los nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de las células troncales y comunicación intercelular alterada. Todos estos marcadores se encuentran presentes en el envejecimiento natural, pero, por otro lado, pueden acelerar o retrasar el proceso de envejecimiento si se les induce o inhibe, respectivamente.

Conforme los individuos envejecen, aumenta su probabilidad de padecer alguna enfermedad crónica (15). Según la OMS, las enfermedades crónicas se han convertido en la principal causa de muerte a nivel mundial, provocando el 60% de las muertes en 2002 y se espera que para 2020 aumente la cifra al 73%. El 79% de las muertes atribuidas a las enfermedades crónicas ocurren en países en vías de desarrollo. Los 4 tipos de enfermedades crónicas más frecuentes son: enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedad pulmonar crónica obstructiva (COPD, por sus siglas en inglés) y diabetes tipo 2 (85). La incidencia y muertes causadas por estas enfermedades aumentan con la edad. En un estudio epidemiológico publicado en este año por Aramillo Irizar y cols. se observa que a partir de los 25 años las muertes causadas por el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes aumentan gradualmente (Figura 2A). En el caso de la diabetes y el cáncer, alcanzan un máximo alrededor de los 65 años, mientras que las muertes causadas por enfermedades cardiovasculares continúan creciendo en la última etapa de la vida. Es importante notar que a partir de los 65 años se observa un aumento en las muertes causadas por otro tipo de enfermedades crónicas, las neurodegenerativas. Interesantemente, el aumento en el número de muertes causadas por las enfermedades neurodegenerativas coincide con

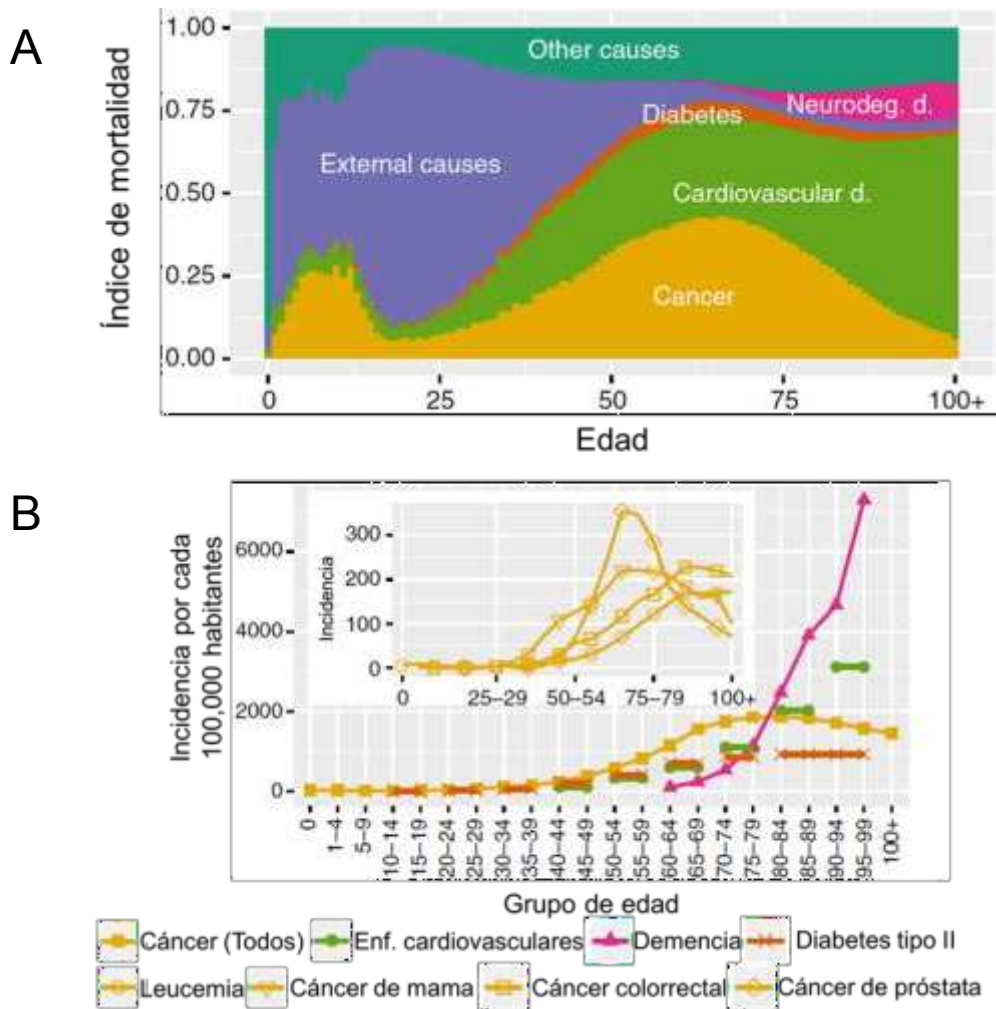


Figura 2. El envejecimiento es un factor de riesgo de padecer enfermedades crónico-degenerativas

- A. Índice de mortalidad de algunas enfermedades crónico-degenerativas en función de la edad. Se observa un aumento gradual en la incidencia de estas enfermedades en función de la edad.
- B. Incidencia de enfermedades crónico-degenerativas en distintos grupos de edad. La gráfica insertada muestra la incidencia en distintos tipos de cáncer.

* Imagen modificada de (6).

el decremento de muertes causadas por cáncer y diabetes. Por otro lado, al analizar la incidencia de estos padecimientos se observa que existe un dramático incremento en las enfermedades neurodegenerativas que, a partir de los 80 años, rebasa a la incidencia de cáncer hasta quintuplicarla después de los 90 años (Figura 2B). De

hecho, a partir de los 85 años, las enfermedades neurodegenerativas se convierten en los padecimientos crónicos más frecuentes (6). Por todo esto se ha establecido que el envejecimiento, por sí mismo, es un factor de riesgo de padecer este tipo de enfermedades y se ha sugerido que prevenir o retrasar el envejecimiento podría reducir su incidencia (15).

La OMS ha propuesto el término 'envejecimiento saludable', que consiste en mantener las capacidades funcionales de los adultos mayores, tales que les permitan tener bienestar en edades avanzadas. Las investigaciones, tanto de ciencia básica como clínica, tienen como finalidad contribuir para lograr que cada vez más adultos mayores alcancen un envejecimiento saludable.

La senescencia celular

Como se mencionó antes, uno de los marcadores del envejecimiento es la Senescencia Celular (SC). Descrita por primera vez por Hayflick y Moorhead en 1961, quienes descubrieron que el cultivo en serie de fibroblastos humanos alcanzaba un límite de replicación, conocido como "el límite de Hayflick" (47). Actualmente sabemos que el fenómeno que observaron fue debido al acortamiento gradual de los telómeros que ocurre de forma natural con cada ronda de duplicación celular; este fenómeno es conocido hoy como Senescencia Replicativa (SR). La SC se caracteriza primordialmente por una detención permanente del ciclo celular, sin embargo, las células senescentes siguen siendo metabólicamente activas y, gracias al perfil de secreción que desarrollan, pueden participar en procesos fisiológicos como remodelación de tejidos durante el desarrollo embrionario o después de alguna lesión;

sin embargo, si se acumulan, lo que generalmente sucede durante el envejecimiento, pueden contribuir a la pérdida del potencial regenerativo y funcional de los tejidos, a la inflamación crónica y tumorigénesis (50). Existen diversos estímulos que pueden inducir senescencia de forma prematura, es decir, independientemente del número de duplicaciones y por lo tanto del acortamiento de los telómeros, por ejemplo, Hernández-Segura y cols. reconocen los siguientes tipos de senescencia prematura:

a) Senescencia inducida por daño al ADN: el daño irreparable al ADN puede inducir tanto senescencia como apoptosis, dependiendo de la magnitud del daño. Agentes como la radiación ionizante o diversos fármacos pueden inducir este tipo de senescencia.

b) Senescencia inducida por oncogenes (OIS, *Qncogene-Induced Senescence*): inducida por la activación de oncogenes tales como *Ras* o *BRAF*, o la inactivación de supresores de tumores, como PTEN.

c) Senescencia inducida por estrés oxidante (SIPS, *Stress-Induced Premature Senescence*): ocurre por la exposición a agentes oxidantes, tales como el peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , o bien hiperoxia. Aunque estos agentes pueden ejercer un efecto directo sobre el ADN, otros procesos y componentes celulares también son afectados.

d) Senescencia inducida por quimioterapia: se sabe que múltiples fármacos utilizados en tratamientos contra el cáncer, tales como bleomicina o doxorubicina, inducen senescencia debido a que causan daño al ADN. Otros agentes, como

abemaciclib y palbociclib, inducen senescencia al inhibir a las Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs).

e) Senescencia asociada a disfunción mitocondrial: se puede inducir al silenciar los genes *SIRT3* o *SIRT5*, que codifican para un tipo especial de desacetilasas dependientes de NAD⁺ que controlan el metabolismo mitocondrial. Interesantemente, este tipo de senescencia parece tener un perfil de secreción distinto a otros tipos de senescencia.

f) Senescencia inducida epigenéticamente: se ha reportado que algunos inhibidores de metilasas de ADN, por ejemplo 5-asa-2'-desoxicitidina, o desacetilasas de histona, como el ácido hidroxámico suberoilánilida o butirato de sodio, también inducen SC.

g) Senescencia paracrina: senescencia inducida por factores secretados por otras células senescentes.

h) Senescencia inducida por inhibición de proteostasis: ésta se genera debido a que se pierde la proteostasis, particularmente al inhibir la autofagia o la actividad del proteosoma.

A la fecha no existe un marcador universal de SC, por lo que al estudiar la senescencia se evalúa un conjunto de características que definen el fenotipo senescente; sin embargo, cabe hacer notar que en ocasiones algunas de estas características no se expresan en algunas células senescentes, dependiendo del tipo celular y del inductor de senescencia (50). Además de la pérdida de la capacidad replicativa, en las células senescentes ocurren cambios en la expresión génica, en la regulación epigenética,

alteraciones en la homeostasis mitocondrial y el estado redox, disrupción del metabolismo energético y de los mecanismos de degradación de macromoléculas, además de múltiples cambios en el metabolismo celular global (50,64,65).

Vías de señalización involucradas en la inducción de senescencia

La respuesta de daño al ADN (DDR, por sus siglas en inglés, *DNA Damage Response*) es una de las principales inductoras de la detención del ciclo celular en la senescencia. En la SR una DDR sostenida se induce cuando la longitud de los telómeros se reduce llegando a una longitud crítica. Sin embargo, algunas Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN), pueden generar aductos en las bases nitrogenadas o entrecruzamientos entre proteínas y ADN, así como rompimientos de cadena sencilla (SSB, *Single-Strand Breaks*) o de doble cadena (DSB, *Double-Strand Breaks*) del ADN (53,86). Durante el establecimiento de la SC participan principalmente los DSB, y ocasionalmente los SSB, como los principales activadores de la DDR. Cuando este tipo de rompimientos de la cadena de ADN se detectan, una cinasa, ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), fosforila a una variante de histona, la H2AX, en la serina 139 para obtener la variante conocida como γ H2AX, marcador muy utilizado para detectar daño al ADN. La γ H2AX activa al complejo RAD50/NBS1/MRE11 que actúa como un sensor; éste complejo vuelve a fosforilar la proteína cinasa ATM y también a la ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3 related protein*). ATM y ATR son cinasas transductoras de la señal cuyos blancos son las cinasas CHK2 y CHK1, respectivamente. Al ser activadas, CHK2 y CHK1, activan a su vez al factor de transcripción y supresor de tumores p53, que induce la expresión de

p21, una de las principales proteínas reguladores del ciclo celular durante la senescencia (29,82).

Otra proteína clave que controla la detención de la proliferación es la proteína del retinoblastoma (pRB). Particularmente pRB y otros miembros de su familia, como p107 y p130, son represores transcripcionales de los factores de transcripción miembros de la familia E2F (33). Estos factores de transcripción juegan un rol esencial en la detención de la proliferación durante la SC. En células en proliferación, las CDKs, incluyendo CDK2, CDK4 y CDK6 junto con su ciclina asociada, principalmente Ciclina D1, inducen la hiperfosforilación de pRB, y consecuentemente un cambio conformacional en ella, lo que rompe su unión con E2F, resultando en la transcripción de genes para iniciar la replicación del ADN y la progresión del ciclo celular (11,33). En las células senescentes, los complejos CDK-ciclinas son inactivados por inhibidores de CDKs (CKIs). Existen 2 clases de CKIs: 1) Proteínas que interactúan con los complejos CDK-ciclina (CIP/KIP, *CDK-interacting protein/kinase inhibitory protein*), tales como p21/CDKN1A o p27/CDKN1B y p57/CDKN1C (referidos solamente como p21, p27 y p57, respectivamente) y 2) la familia de inhibidores de la proteína cinasa 4 (INK4, *Inhibitor of Kinase 4*), tales como p16/CDKN2A, p15/CDKN2B, p18/CDKN2C y p19/CDKN2D). Los miembros de la familia CIP/KIP pueden inhibir cualquier CDK, mientras que los de la familia INK4A inhiben específicamente CDK4 y CDK6, que son cruciales para la progresión de G1-S del ciclo celular (11,52). Por esta razón, los miembros de la familia INK4 son conocidos como inhibidores de la fase G1. Durante la SC p21 y/o p16 aumentan considerablemente. p21 se sobreexpresa debido a la

acción de su factor de transcripción p53, como se mencionó antes, mientras que p16 se puede sobreexpresar de forma independiente a p53. Tanto p21 como p16 pueden actuar de forma sinérgica para inactivar a las CDKs y al mismo tiempo evitar la fosforilación de los miembros de la familia de pRB y, así, evitar la proliferación celular. Se ha demostrado que la inactivación de p53 y pRB permite que las células reinicien la replicación del ADN; sin embargo, aún en este caso, las células senescentes son incapaces de proliferar, sugiriendo una inhibición adicional en las fases G2 o M del ciclo celular (11). En este sentido, se ha reportado que la activación de la vía p16-pRB, en conjunto con señales mitogénicas, induce sobreproducción de ERO, lo que podría activar a un mediador río abajo, PKC δ , cuya actividad de cinasa reduce los niveles de WARTS, una cinasa involucrada en la citocinesis, bloqueándola de forma irreversible (43).

Durante la OIS, se ha sugerido que la DDR se induce por una señalización oncogénica sostenida. En un trabajo, Di Micco y cols. demostraron que células en fase S expuestas a estrés oncogénico mostraban una cantidad significativamente alta de repicones, que a su vez exhibían defectos en la progresión de la horquilla de replicación, resultando en la activación a ATM y ATR (32).

Alternativamente, la vía ERK/p38/MAPK puede controlar la detención de la proliferación independientemente de las señales provenientes de la DDR (105). Esta inducción ocurre debido a la activación de una cinasa regulada por señal extracelular (MEK-ERK, *MEK-Extracellular signal-Regulated Kinase*) y acumulación de algunas proteínas cinasas de la familia MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) tales como

MAPK MKK3 y MKK6 que culminan en la activación de p38/MAPK (referida como p38). p38 tiene la capacidad de activar tanto a p53 como a p16. Este mecanismo de detención del ciclo celular se ha observado en OIS y SIPS, y es un mecanismo que puede ser regulado por ERO. Dependiendo de la magnitud del inductor de senescencia (p. ej. concentración H₂O₂ o bien intensidad de la radiación) la pérdida de la capacidad proliferativa puede llevarse a cabo poco tiempo después del tratamiento. Esto puede estar relacionado con una reducción en la expresión de genes de respuesta temprana como *c-fos* o genes relacionados a *id*; los productos de estos genes pueden alterar la vía ERK/MAPK e inducir la detención de la proliferación relacionada a la senescencia (71). El declive en la expresión de dichos genes se ha relacionado a una disminución en la capacidad de unión de sus respectivos factores de transcripción, SRF y AP-1. En 2001 y 2003, el grupo de Cristofalo y cols. publicó 2 trabajos proponiendo un modelo en el que, al reducir la actividad del proteosoma se conducía a la estabilización de MPK-2, que es una fosfatasa implicada en la desfosforilación y subsecuente inactivación de la p-ERK nuclear. El decremento de p-ERK nuclear disminuye la unión de SRF al promotor de *c-fos* y, en última instancia, provoca la detención del ciclo celular (94,96). Aunque la inhibición total del proteosoma induce muerte celular por apoptosis, su inhibición parcial provoca una acumulación subletal de proteínas ubiquitinadas que no pueden ser degradadas y se desarrolla un fenotipo senescente conocido como PIIPS, mencionado antes. También se ha reportado que los inhibidores químicos del proteosoma, como epoxomicina o lactacistina, provocan disfunción mitocondrial y generación de ERO, que en última instancia provocarían la detención del ciclo celular por los mecanismos antes mencionados (95).

Otra vía que también se encuentra involucrada en la OIS es la vía PI3K/AKT/mTOR. Esta vía se encuentra activada frecuentemente en diversos tipos de cáncer y se activa de manera constitutiva debido a una inactivación genética o epigenética de la fosfatasa PTEN, considerada un supresor de tumores. Así como por mutaciones ganancia de función de PI3K y sobreexpresión de AKT (38). En estudios recientes se ha reportado que la activación sostenida de esta vía puede inducir OIS; por ejemplo, una forma miristilada de AKT, que lo mantiene activo de forma constitutiva indujo OIS en cultivos primarios de fibroblastos murinos y en células endoteliales humanas por medio de la vía p53/p21(68). Al parecer este evento es mediado por la regulación negativa del factor de transcripción FOXO3a, que es un sustrato río debajo de AKT. FOXO3a aumenta la transcripción de genes que amortiguan a las ERO, tales como la MnSOD. La activación constitutiva de AKT inhibe la actividad transcripcional de FOXO3a y por lo tanto disminuye la expresión de la MnSOD, conduciendo a un incremento en las ERO, lo que induce la activación de la vía p53/p21 y en última instancia la senescencia celular (105).

Adicionalmente, la pérdida de PTEN también indujo OIS dependiente de p53 en cultivos primarios de fibroblastos de ratón. Una pérdida completa de la actividad de PTEN induce la expresión de p19, que también funciona como inhibidor de la ubiquitina ligasa tipo E3 MDM2, la cual tiene como blanco específico a p53. La sobreexpresión de p19 provoca que p53 se mantenga estable en la célula y por lo tanto se mantiene también la expresión de p21, conduciendo a senescencia (26). Efectos similares se han observado *In Vivo* al depletar a PTEN en lesiones premalignas en epitelio

prostático de ratón, lo cual apoya el mecanismo supresor de tumores de la senescencia en el caso de la OIS (105).

Por otro lado, se ha sugerido un papel de mTOR en la OIS en fibroblastos humanos. La inhibición del complejo 1 de mTOR (mTORC1) por rapamicina o bien por shRNAs contra mTOR o Raptor, retrasa la entrada a SR y a OIS, mientras que la inhibición del complejo 2 (mTORC2) no mostró ningún efecto. Sin embargo, aún falta mucho por investigar para desentrañar el mecanismo por el cual mTOR podría inducir senescencia (7,56).

El fenotipo secretor asociado a la senescencia y su regulación

Una de las características más complejas e interesantes de la SC es su fenotipo secretor (SASP, *Senescence Associated Secretory Phenotype*) que incluye una variedad de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, metaloproteinasas y ERO. Los componentes del SASP pueden modular respuestas paracrinas y autocrinas. A la fecha se han reportado entre 40-80 factores secretados por las células senescentes en distintos tipos celulares de distintas especies, principalmente en fibroblastos y células epiteliales, y aunque los componentes del SASP pueden diferir según el tipo celular, o la forma de inducción de senescencia, siempre parecen expresar un perfil proinflamatorio (20,22,64). Entre los principales factores presentes en el SASP se encuentran las Interleucinas 1 α , 6, 7 y 8 (IL-1 α , IL-6, IL-7 e IL-8), las quimiocinas MCP-2 y MIP-3 α , los factores de crecimiento GRO α , HGF, metaloproteinasas de matriz (MMPs) y proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina (IGFPs). Debido a la variedad de los factores secretados, el SASP se ha asociado tanto con efectos

benéficos como con efectos deletéreos (22). Los efectos benéficos incluyen cicatrización y regeneración de tejidos después de un daño, remodelación de tejidos embrionarios y activación del sistema inmune. En contraparte, los efectos deletéreos del SASP incluyen su contribución al fenotipo envejecido, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, disrupción y disfunción de tejidos, proliferación y aceleración en el crecimiento de tumores, angiogénesis, diferenciación y transición epitelio-mesénquima. Estos efectos pleiotrópicos del SASP dependen del tipo celular que está sometido al SASP, al contexto biológico que se esté estudiando e incluso a la edad del organismo (17,27,48).

El SASP se empieza a detectar varios días después de inducir la senescencia, sin embargo, la señalización que lo controla inicia de forma simultánea con la de la detención del ciclo celular y, además, es un evento que cuenta con varios pasos y con distintos puntos de control (64). En algunos tipos celulares, el SASP requiere hasta 10 días para madurar y ser detectable. Se ha hipotetizado que durante la DDR que induce la detención del ciclo celular, ocurre una fase rápida de secreción con funciones autocrinas que refuerza la detención del ciclo celular de forma que la célula pueda distinguir entre otros eventos que incluyen una detención transitoria del ciclo celular, como una completa reparación del ADN, o la misma apoptosis. Aunque esta secreción temprana aún no ha sido detectada, la reducción de proteínas de la DDR, tales como ATM, CHK2, NBS1 y H2AX, que como se dijo antes, inducen la detención del ciclo celular, lo cual es suficiente para prevenir la secreción de diversos factores del SASP, incluyendo IL-6, IL-8 y varios miembros de la familia GRO; además en algunos trabajos

se ha reportado que las células senescentes que no presentan daño al ADN ni DDR no desarrollan el SASP (63,64,87). Por otro lado, la DDR por sí misma no es la condición única y suficiente para desarrollar el SASP, de ser así, el SASP sería detectable a niveles considerables pocas horas después de inducir la senescencia, además de que al tiempo que el SASP es detectable (~10 días) la cantidad de ATM activado es muy baja y no se encuentra focalizado en los sitios de lesión del ADN (74). Por esto, se ha hipotetizado que esta secreción temprana podría ocurrir dentro de las primeras 36 horas después de inducir la senescencia. Posterior a este periodo de tiempo, comienzan a ser detectables, aunque en muy bajos niveles, algunos de los componentes clásicos del SASP, principalmente la IL-1 α , que también puede tener efectos autocrinos que le permitan a la célula auto-amplificar la producción de otros factores de una forma gradual y controlada. La autoregulación de la IL-1 α involucra la activación de NF- κ B y es un proceso dependiente del estado redox. McCarthy y cols. mostraron que los niveles de H₂O₂ incrementan la expresión de IL-1 α a nivel transcripcional y que el procesamiento de IL-1 α para obtener su forma activa, se lleva a cabo por la proteasa calpaína, que es dependiente de Ca²⁺. El estado redox celular puede influenciar directamente un procesamiento diferencial de la IL-1 α , ya que las alteraciones en el estado redox están acopladas a la homeostasis del Ca²⁺. Además de su autoregulación, la IL-1 α activa la vía PI3K/Akt que activa al NF- κ B, el cual induce la expresión de varias citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, TNF y MMPs, entre otras (66). Esta segunda etapa dura entre 4 y 10 días, cuando la producción de

citocinas alcanza eventualmente un estado maduro, que es el perfil del SASP el cual ha sido ampliamente estudiado.

Debido a que el SASP maduro es detectable entre 10 y 12 días después de la inducción de la senescencia, y que la DDR no es suficiente para controlar este proceso, deben existir otras vías de señalización que controlen la expresión de los componentes del SASP. Un candidato para inducir la secreción del SASP es una proteína miembro de la familia de las MAPK, p38. Al igual que otros miembros de la familia MAPK, p38 se activa por fosforilación generalmente pocos minutos después de un estrés agudo y

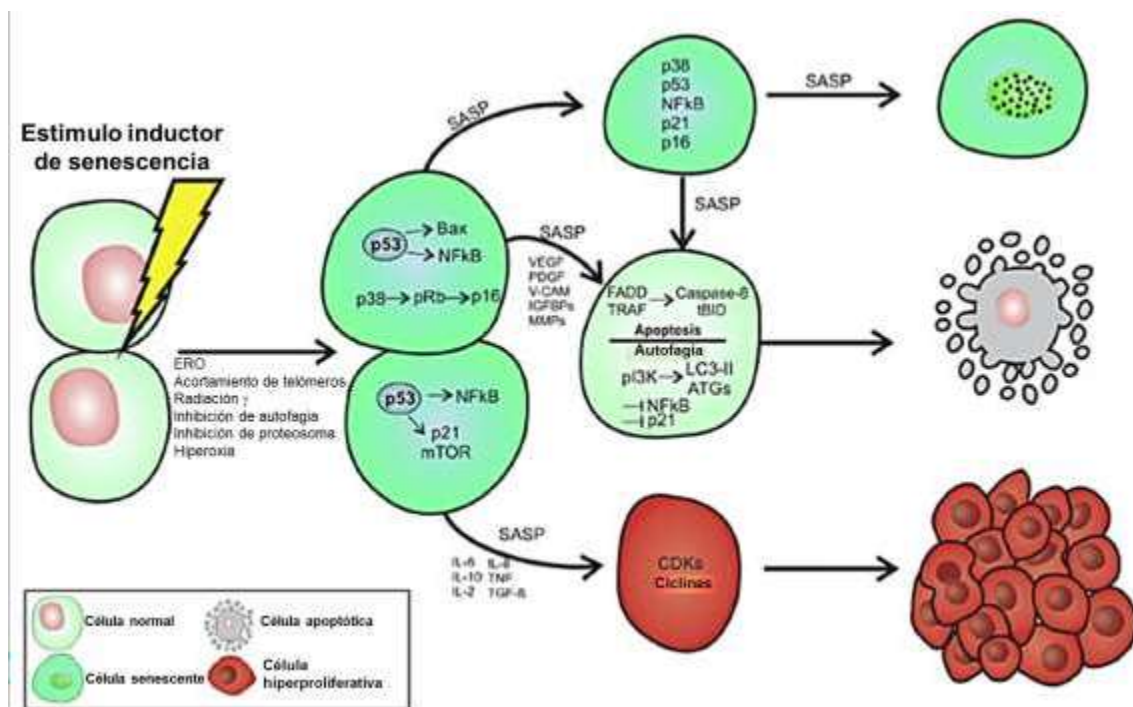


Figura 3. La senescencia celular induce diversas actividades fisiológicas en células con las que comparte el microambiente

Las actividades fisiológicas en las que participan las células senescentes son muy diversas y dependen de muchos factores, como el estímulo inductor de senescencia, el tipo celular que se vuelve senescente, el tipo celular que es expuesto al SASP de las células senescentes, etc. Sin embargo, se han elucidado diversos patrones moleculares entre las células senescentes y las células adyacentes para inducir, por ejemplo: senescencia, apoptosis o hiperproliferación en las células adyacentes.

su activación es mantenida durante algunas horas. Además, como se mencionó arriba, p38 es importante para mantener la detención del ciclo celular al activar las vías de p53 y p16/pRb, incluso la inhibición de p38 retrasa la entrada a senescencia replicativa. Se sabe también que p38 regula positivamente la expresión de citocinas específicas, tales como IL-6, IL-8 y TNF- α en diversos contextos biológicos, aunque generalmente esto ocurre bajo un estrés agudo (39).

En 2011, Freund y colaboradores publicaron un trabajo mostrando el papel de la p38MAPK en la secreción del SASP en una forma independiente a la DDR. Encontraron que en las células senescentes inducidas por estrés genotóxico (con radiación X) y en OIS existe una activación gradual y tardía de p38 que tiene su máximo entre 8 y 10 días después de la inducción de senescencia en fibroblastos humanos HCA2. Al inhibir la actividad de p38 con el inhibidor químico SB203580 se observó una disminución en la secreción de 25 factores del SASP en senescencia inducida por estrés genotóxico y de 34 factores en OIS. Entre los factores controlados por p38 destacan IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, MCP-2, MCP-3, GRO, GM-CSF, TNF α y TNF β , por otro lado, componentes característicos del SASP tales como MMPs no se vieron afectados significativamente al inhibir a p38. La proteína p38 regula la actividad de diversos factores de transcripción; en el caso de la expresión de los factores del SASP, se observó que se lleva a cabo por medio de la activación del miembro Rel-A de la familia de NF- κ B; esta subunidad es bien conocida por su función en la transcripción de genes asociados a citocinas proinflamatorias (40). La importancia de la proteína p38 en la secreción del SASP ha sido probada

recientemente, ya que al utilizar inhibidores químicos de p38, se consigue suprimir el SASP (3).

Estudios recientes han demostrado el papel de otras moléculas en el control del SASP. En 2013, Alexander y colaboradores, encontraron que un inhibidor poco común de NF κ B, I κ B ζ , juega un papel importante en el control del SASP. I κ B ζ puede actuar como un represor, pero también se ha reportado que puede actuar como un activador de un conjunto de genes blanco de NF κ B. Por sí mismo, I κ B ζ es un producto de respuesta primaria y, en asociación con la subunidad p50 de NF κ B, ejerce su actividad de mejorar la transcripción de genes de respuesta secundaria principalmente a nivel de remodelación de la cromatina. En este estudio se encontró que I κ B ζ aumenta su expresión en diversos modelos de senescencia, además de que es requerido para la expresión de IL-6, IL-8, IL-15, MCP-1, MCP-2, TIMP1, TIMP2 y fibronectina, entre otros, en senescencia inducida por daño al ADN y en OIS (2). Se ha observado que al inhibir la expresión de IL-1 α o de su receptor, se disminuye también la expresión de IL-6 e IL-8. También al inhibir la señalización de IL-1 α disminuye la actividad transcripcional tanto de NF- κ B como de C/EBP (39).

Por otro lado, se ha reportado recientemente que la inhibición de la vía JAK/STAT disminuye también la secreción de algunos factores del SASP, sugiriendo que esta vía de señalización puede contribuir también a la secreción del SASP (104).

La Senescencia Celular es un proceso común a lo largo de la vida de los individuos.

Cuando se descubrió la senescencia en la década de 1960, se le asoció principalmente al proceso de envejecimiento del individuo. Sin embargo, las investigaciones realizadas, durante ya más de medio siglo, han demostrado que la SC ocurre en distintos contextos biológicos y en distintas etapas de la vida.

En 2013, Muñoz-Espín y cols. y por otro lado Storer y cols. publicaron de manera independiente dos trabajos en los que demostraban la presencia de células senescentes durante etapas específicas del desarrollo embrionario de ratones (72,93). Los autores de ambos trabajos sugieren que la SC que ocurre en el desarrollo embrionario es un evento programado y tiene como principal función contribuir con la remodelación de tejidos, además de promover la proliferación de las células adyacentes en momentos específicos, para contribuir, por ejemplo, con el crecimiento y desarrollo de las extremidades (93), de los mesonefros y el saco endolinfático (72). La senescencia embrionaria es orquestada por p21 de un modo independiente a p53. Interesantemente, las células senescentes detectadas en estos trabajos se encuentran en sitios específicos del embrión y aparecen durante ciertos periodos del desarrollo siendo eliminados por macrófagos también durante momentos específicos del desarrollo. Además, los autores sugieren que la senescencia programada durante el desarrollo embrionario podría ser el origen evolutivo de la OIS.

En ratones jóvenes y adultos se ha observado la presencia de células senescentes en distintos contextos. Por ejemplo, en ratones, después de sufrir una herida cutánea los fibroblastos y células endoteliales adyacentes a la herida se vuelven senescentes y

contribuyen a la cicatrización a través de la secreción del factor de crecimiento derivado de plaquetas AA (PDGF-AA) (30). En otro trabajo, se observó que en células madre mesenquimales de la esponjosa primaria de huesos largos de ratón ocurre una senescencia programada que regula el crecimiento de los huesos durante la pubertad tardía (58). Además, existe evidencia de que células T PD-1⁺ y CD153⁺ y CD44^{alto} presentan marcadores de senescencia como resultado de una división celular exhaustiva durante la involución del timo de ratones CD45.2 C57BL/6 (89). Finalmente, existe evidencia de que las células senescentes pueden ser eliminadas por acción del sistema inmunológico en distintos contextos (55,106). Estos trabajos dan evidencias de que la SC es un proceso fisiológico importante durante la vida de los organismos.

Algunos de los estresores que inducen SC son también potenciales inductores de cáncer. Por esta razón, la SC fue inicialmente entendida como un mecanismo supresor de tumores natural. Ahora se sabe que la senescencia puede poseer un papel dual en la vida de los organismos. En etapas tempranas es benéfica, ya que al detener el ciclo celular de las células dañadas evita que se perpetúe dicho daño, por lo que funciona como un mecanismo supresor de tumores; sin embargo, a largo plazo, la acumulación de las células senescentes contribuye al deterioro asociado al envejecimiento, que también puede ser identificado como generador o inductor de varias enfermedades degenerativas, entre ellas el mismo cáncer, debido a que, a través del SASP, las células senescentes pueden contribuir a la malignización de las células vecinas (73). Ciertos factores del SASP estimulan fenotipos asociados con células de cáncer agresivas, como fibroblastos senescentes que secretan anfirregulina y GRO α , que en

cultivo estimulan la proliferación de células epiteliales premalignas, o la IL-6 e IL-8, que estimulan a las células epiteliales malignas y premalignas para que invadan la membrana basal. Otro factor presente en el SASP es VEGF, que estimula la angiogénesis y por lo tanto favorece la invasión y migración de células endoteliales (21).

En 2016, Loaiza y Demaria reportaron que la secreción crónica del SASP, la disminución de las funciones inmunes y la inestabilidad genómica, en conjunto, favorecerían la progresión del cáncer (60). En contraparte, el SASP también puede evitar el desarrollo del cáncer en algunos contextos. Por ejemplo, se ha reportado que queratinocitos senescentes secretan el factor antiangiogénico maspina (76). Además, se sabe que los melanocitos senescentes de humanos secretan IGFBP7 que induce senescencia en melanocitos no senescentes y apoptosis en algunas líneas celulares de melanoma (97).

Por otro lado, existe una relación exponencial entre el incremento de los marcadores de senescencia y la edad del individuo (48) que se ha asociado no solamente al incremento de su expresión, sino principalmente al número de células positivas a éstos, lo cual correlacionaría con la cantidad de células senescentes presentes en los tejidos (49,98). Se ha hipotetizado que esta acumulación es debida al declive del sistema inmunológico (73).

Mecanismos de intervención sobre las células senescentes

Como se ha mencionado antes, la acumulación de las células senescentes en los organismos en función de la edad favorece procesos deletéreos, como la progresión de tumores, la disrupción de tejidos y el envejecimiento. Por tal motivo, se hipotetizó durante años que eliminar a las células senescentes o bien, controlar o eliminar la secreción crónica del SASP podría revertir estos efectos. En 2011, Baker y cols. reportaron el diseño de un ratón transgén, INK-ATTAC, para la eliminación inducible de células positivas a p16 (10). Para el diseño de este transgén, los autores de dicho trabajo se basaron en un modelo previo en el que adipocitos son eliminados de forma selectiva por apoptosis luego de la administración de AP20187, que es un fármaco sintético que induce la dimerización de FKBP-Caspasa8 expresado específicamente en adipocitos vía el promotor de *FABP4*. Los autores remplazaron el promotor de *FABP4* con un fragmento de 2,617 pares de bases (pb) del gen promotor de *P16* que está transcripcionalmente activo en células senescentes, pero no en células no senescentes (101). El transgén INK-ATTAC fue utilizado en un modelo de ratón progeroide (BubR1) y al administrar el fármaco se consiguió la eliminación de células positivas a p16 en tejido adiposo, músculo esquelético y ojos, lo que conllevó a un retraso en el deterioro de estos tejidos en función de la edad (10). Al utilizar este mismo transgén en ratones que envejecen de forma natural, se alcanzó un incremento de más del 18% tanto de la esperanza de vida como del lapso de vida saludable (9). Además, como se mencionará más adelante, se ha utilizado también para la eliminación de células senescentes en el SNC

Debido al hecho que la eliminación de las células senescentes mejora la expectativa de un envejecimiento saludable, se ha emprendido la búsqueda de compuestos que puedan eliminarlas de forma selectiva. En las células senescentes se ha observado que algunas proteínas de señalización que confieren supervivencia a la célula se encuentran activadas, dentro de estas destacan PI3K/AKT, p53/p21/serpinas, tirosinacinasas dependientes de receptor, BCL-2/BCL-XL, FOXO4, entre otras (8,107,108). Los fármacos que actúan sobre estas vías de señalización y provocan que las células senescentes mueran por apoptosis intrínseca se conocen como senolíticos. Estos compuestos han despertado el interés de muchos investigadores para su estudio y posible uso clínico con la finalidad de eliminar a las células senescentes en distintos contextos y evitar su contribución en procesos deletéreos (54,108).

Otra vía alternativa dentro del campo de la senescencia ha sugerido no eliminar a las células senescentes, en vez de ellos se han hecho investigaciones en la búsqueda de compuestos que puedan inhibir o modular la secreción de factores del SASP y evitar así los efectos deletéreos de la SC. Uno de los primeros trabajos en este tenor fue publicado en 2012, en el que se observó que los glucocorticoides corticosterona y cortisol suprimieron la expresión de IL-6, IL-8, GM-CSF, MCP-2 y VEGF interfiriendo en la actividad transcripcional del NF- κ B en fibroblastos humanos (57). En 2013, se demostró que la metformina, fármaco utilizado en el tratamiento contra la diabetes, tenía un efecto similar en la inhibición de factores del SASP (69). Otras moléculas que han logrado inhibir la secreción de factores del SASP son la rapamicina (99,100) y los inhibidores de p38 MAPK SB203580, UR-13756 y BIRB 796 (3). El hecho de que

algunas moléculas puedan inhibir solamente algunos factores del SASP (dependiendo de su modo acción) abre la puerta a la posibilidad de poder modular solamente algunos de los efectos del SASP (los deletéreos) sin alterar los aspectos benéficos en los que la SC se encuentra implicada, aunque, para conseguirlo se requiere profundizar aún más en los mecanismos de control del SASP y en las condiciones bajo las cuales la SC celular es benéfica o dañina para los individuos. Tanto en las intervenciones que buscan eliminar a las células senescentes como en las que buscan controlar el SASP se requieren estudios que nos permitan conocer en qué momentos, con qué frecuencia y en qué contextos se pueden realizar sin alterar los aspectos benéficos de la SC.

ANTECEDENTES

En el SNC, los astrocitos son las células más abundantes. Dentro de sus funciones se encuentran el mantenimiento de la homeostasis de iones, agua y neurotransmisores; además de participar en la formación y mantenimiento de la barrera hematoencefálica (91).

En años recientes se han publicado algunos trabajos en los que se ha evidenciado la presencia de células senescentes en el SNC. Uno de los primeros trabajos mostró que los astrocitos provenientes de ratas de 2 meses de edad eran positivos a la tinción de β -galactosidasa después de 90 días *in vitro* (DIV). Estos astrocitos mostraban también cambios en su actividad mitocondrial, incremento en la producción de ERO y NO, aumento en el consumo de glutamato y decremento en la capacidad neuroprotectora (80). En otro trabajo, Bitto y cols. demostraron que astrocitos humanos y de roedores pueden ser inducidos a senescencia prematura por estrés oxidante o por inhibición del

proteosoma, además de que pueden alcanzar la senescencia replicativa alrededor de las 15 duplicaciones poblacionales (13). En 2012, Bhat y cols. publicaron un trabajo en el que se evidenció la acumulación de astrocitos senescentes en el cerebro en función de la edad. Además, se observó también una mayor cantidad de astrocitos senescentes en el cerebro de pacientes con Alzheimer y, en un experimento *in vitro*, se demostró que la exposición al péptido β -Amiloide₁₋₄₂ ($A\beta_{1-42}$) induce senescencia prematura en astrocitos (12). Otros inductores de senescencia que se han reportado en astrocitos son el 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (77) y el amoníaco (45); en ambos casos, los tratamientos produjeron ERO. Interesantemente, la senescencia inducida por TCDD fue regulada por la vía WNT- β -catenina, mientras que la inducida por amoníaco fue dependiente de la activación de p38MAPK y p53.

Existen pocos trabajos en los que se haya estudiado el SASP de astrocitos senescentes, en el trabajo realizado por Bhat y cols mencionado arriba, se analizó el SASP de astrocitos inducidos a senescencia prematura por exposición al péptido $A\beta_{1-42}$ y se encontró un incremento significativo en la secreción de IL-6, IL-8, ICAM-1, GM-CSF y RANTES, principalmente (12).

En 2016, Crowe y cols. publicaron un trabajo sobre los cambios transcripcionales en astrocitos humanos fetales al ser inducidos a SIPS. Genes relacionados a la inflamación, modificación de la matriz extracelular y de resistencia a la apoptosis se vieron sobreexpresados, sugiriendo que los cambios relacionados a la senescencia pueden tener un impacto en las enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad (24).

En este año, Chinta y cols. publicaron un trabajo en el que observaron que en tejido nervioso obtenido *Post Mortem* de pacientes con la enfermedad de Parkinson se encontraban sobreexpresados algunos marcadores de senescencia, como p16, y algunos componentes del SASP (IL-6, IL-1 α , IL-8 y MMP-3) a nivel del ARNm. Al analizar los tejidos observaron que estos marcadores eran más frecuentes en astrocitos que en otras células gliales. En un experimento *in vitro*, observaron que el tratamiento con el herbicida dicloruro de 1-1'dimetil-4-4-bipiridilo (Paraquat, PQ) induce SC en astrocitos humanos y que el SASP producido por los astrocitos senescentes tenían efectos adversos en células progenitoras neurales tales como disminución en la proliferación y en su capacidad de migración (28).

Por otro lado, en un ratón modelo de enfermedad neurodegenerativa dependiente de la proteína Tau, el MAPT^{P301S}PS19, se observó la presencia de astrocitos y microglía senescentes. En crías obtenidas al cruzar estos ratones con los transgénicos INK-ATTAC, en las que se puede eliminar las células senescentes, se previno la gliosis, la hiperfosforilación de la proteína tau, soluble e insoluble, y la degeneración de neuronas corticales y de hipocampo. Esto mantuvo las funciones cognitivas de los ratones. En ese mismo trabajo trataron los ratones MAPT^{P301S}PS19 con un senolítico de primera generación para eliminar a los astrocitos senescentes; esto evitó la agregación de la proteína tau y mejoró la salud de los ratones (16).

Con la finalidad de contribuir con el conocimiento relacionado al SASP y a su posible regulación, en este proyecto se evaluó el efecto de tres moléculas con efectos

antiinflamatorios en la secreción del SASP en astrocitos: el sulforafano (SFN), la dehidroepiandrosterona (DHEA) y el ácido acetilsalicílico (ASA):

El SFN es un inductor de la respuesta antioxidante modulada por el factor de transcripción Nrf2, que induce la expresión de enzimas antioxidantes tales como la Hemo-Oxigenasa-1 (HO-1), la NADPH-quinona oxidoreductasa-1 (NQO1) y la γ -glutamiltioestasa (γ -GCS), quienes regulan el estado redox intracelular (92). Existe evidencia de que la producción de IL-1 α es inducida por un incremento intracelular de H₂O₂ (66), y ya que la IL-1 α es por sí misma una citocina que induce la expresión de otros factores del SASP, hipotetizamos que inducir una respuesta antioxidante en las células senescentes puede disminuir la secreción de algunos factores del SASP.

La DHEA es una hormona esteroidea que se sintetiza en la zona reticular de la corteza suprarrenal. En la actualidad es comercializada como una “súper-hormona” con efectos anti-vejez, aunque existe controversia sobre los efectos reales que ésta molécula produce (88). Hay estudios en los que se ha observado que el tratamiento con DHEA en diversas líneas celulares disminuye la producción de citocinas tales como IL-6, IL-8, MDC, MCP-1 y TARC. Este efecto ocurre por un bloqueo de vías de señalización asociadas a la inflamación, tal como la controlada por p38MAPK, además de que el tratamiento con DHEA evita la translocación al núcleo del factor de transcripción del NF κ B (25).

En cuanto al ASA, componente activo de la aspirina, es un antiinflamatorio no esteroideo. A concentraciones altas, el ASA inhibe la actividad de diversas cinasas,

incluyendo a la familia de MAPK, cuya señalización desencadena la respuesta inflamatoria. Algunos factores de transcripción que están río abajo en la señalización de las MAPK se encuentran inactivos en modelos de estudio tratados con ASA, entre ellos destacan el NF- κ B y AP-1 que regulan la transcripción de genes asociados a la respuesta inflamatoria (4).

Justificación

De acuerdo a las estimaciones realizadas por el Consejo Nacional de Población (CONAPO), el porcentaje de adultos mayores en la población mexicana aumentará de un 6.2% en 2010 a un 22.6% en 2050 (CONAPO, 2002). El aumento en la proporción de adultos mayores en nuestra población provocará una incidencia mayor de enfermedades relacionadas con la edad, tales como enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y cáncer, entre otras; por lo que este aumento en la proporción de adultos mayores puede representar, a corto plazo, no sólo un fenómeno social, sino también un problema de salud pública que deberá ser atendido. El estudio del envejecimiento a nivel celular, estudiando la senescencia en astrocitos, particularmente el SASP, es importante para entender la relación que existe entre el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad, particularmente las neurodegenerativas. La investigación realizada para este trabajo contribuirá en la generación de conocimiento básico relacionado a la senescencia, la secreción del SASP y su posible regulación. Dicho conocimiento podrá ser utilizado a futuro para plantear y desarrollar nuevos proyectos que puedan verificar *in vivo* las conclusiones a las que llegamos aquí.

Hipótesis

Debido a que el SASP es una característica de las células senescentes que ocurre una vez establecida la detención de la proliferación, el uso de fármacos con acción antiinflamatoria permitirá modificar la secreción de citocinas del SASP sin afectar otras características de las células senescentes. Particularmente, el ácido acetilsalicílico, la dehidroepiandrosterona y el sulforafano han mostrado actividad antiinflamatoria por lo que se espera que puedan reducir el perfil proinflamatorio del SASP de astrocitos senescentes.

Objetivo general

Evaluar el efecto del tratamiento con ácido acetilsalicílico, dehidroepiandrosterona y sulforafano en la modificación de los componentes el SASP en astrocitos inducidos a senescencia celular prematura mediante distintos estímulos.

Objetivos particulares

1. Caracterizar la senescencia celular prematura inducida por estrés oxidante y por inhibición del proteosoma en astrocitos primarios de rata Wistar.
2. Comparar el perfil del SASP de los astrocitos primarios de rata inducidos a senescencia por diferentes estímulos (SIPS vs PIIPS).
3. Evaluar el efecto del tratamiento con ácido acetilsalicílico, dehidroepiandrosterona y sulforafano en los componentes del SASP de astrocitos primarios de rata.

4. Determinar si el SASP obtenido de los astrocitos tratados con los moduladores tiene algún efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial de neuronas corticales primarias de rata.

Material y Métodos

Reactivos

Todos los reactivos, a menos que se indique lo contrario, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich ® y fueron de grado analítico.

Animales

En este trabajo se utilizaron ratas neonatas de la cepa Wistar de entre 3 y 7 días de nacidas tanto para el cultivo primario de astrocitos y como para el de fibroblastos. Los animales provinieron de la colonia del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I). Para el cultivo primario de neuronas se utilizaron embriones de rata Wistar de 17 ó 18 días de gestación; las ratas preñadas de las que se obtuvieron los embriones provinieron de la colonia del bioterio del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Todos los procedimientos realizados con animales fueron llevados a cabo siguiendo las recomendaciones éticas de la guía de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, por sus siglas en inglés) para el Cuidado y uso de los Animales de Laboratorio y los principios de la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999.

Cultivo primario de astrocitos

Los astrocitos se aislaron utilizando la técnica descrita por McCarthy y cols. en 1980 (67). Todo el material empleado para el cultivo de astrocitos fue previamente esterilizado. Los cerebros disectados fueron sumergidos en PBS estéril frío (4°C) con 2% de antibiotico-antimicótico (Ab-Am). El material biológico fue llevado al interior de una campana de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad. Los cerebros fueron depositados en una caja de Petri, una por cada cerebro, lavados 3 veces con PBS estéril con 2% de Ab-Am y cortados en pequeños fragmentos con un bisturí. Posteriormente, se añadieron 5 mL de PBS estéril con 2% de Ab-Am en cada caja de Petri para re-suspender el tejido. La suspensión se resuspendió fuertemente 15 veces para disgregar el tejido y separar las células. La suspensión fue entonces centrifugada por 10 min a 3500 rpm a 4°C. El sobrenadante fue desechado y el botón se resuspendió en 8 mL de Medio de Cultivo de Astrocitos (MCA, Medio Esencial Mínimo suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino, SFB, 1% de Ab-Am, 1.1% de Glutamina y 1.5% de Glucosa). La suspensión se filtró en un separador de células (con poros de 100 μm de diámetro) y se depositó en cajas de Petri P100, una por cada cerebro. Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ por 24 h. Pasado ese tiempo, las células se lavaron con PBS estéril a 4°C para eliminar otras células gliales y neuronas, y se añadieron 8mL de MCA fresco a cada caja, la cual se volvió a incubar en las mismas condiciones. A partir de ese momento, cada tercer día se retiró el MCA y se sustituyó por MCA fresco. Los astrocitos comenzaron a adoptar una forma extendida una semana y media después del aislamiento. Cuando los cultivos

alcanzaron más del 75% de confluencia, se despegaron las células con tripsina 0.1% y se resembraron en nuevas cajas de Petri a una densidad de 10^4 células/cm² (Densidad normal). En cada ronda de resembrado se calcularon las Duplicaciones Poblacionales (PD, por sus siglas en inglés) utilizando la ecuación:

$$PD = \frac{\log(N_f/N_i)}{\log 2} \dots\dots\dots(1)$$

Donde:

PD = Duplicaciones Poblacionales

N_f = Número de células contadas al despegarlas

N_i = Número de células sembradas

Cultivo primario de neuronas corticales

Para el cultivo primario de neuronas corticales se utilizaron las siguientes soluciones:

- *Solución stock KRB 10X*: NaCl 7%, KCl 0.3%, K₂HPO₄ 0.16%, NaHCO₃ 2.14%, Glucosa 2.57%, Rojo Fenol 0.015% en agua desionizada.
- *Solución 1*: Albúmina Sérica Bovina (BSA, por sus siglas en inglés) 0.1%, Mg²⁺ 0.03% en KRB 1X.
- *Solución 2*: Tripsina-EDTA 1X en solución 1, la tripsina se añade en el momento del uso.
- *Solución 3*: DNAasa 0.08 mg/mL, inhibidor de tripsina SBT 0.52 mg/mL, Mg²⁺ 0.04% en solución 1.
- *Solución 4*: 10.5 mL de solución 1 + 2 mL de solución 3.

- *Solución 5:* CaCl₂ 0.0015%, Mg²⁺ 0.04% en solución 1.

Todas las soluciones fueron esterilizadas por filtración usando membranas de 0.22 μM de diámetro de poro y calentadas a 37°C antes de la disección de los cerebros.

Las neuronas corticales fueron aisladas como se describió previamente por Brewer y colaboradores (14). Los embriones de 17 ó 18 días de gestación fueron disectados con la placenta y depositados en una caja de Petri con 10 mL de solución 1, los siguientes pasos se llevaron a cabo dentro en condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar. Cada embrión fue sacado de la placenta y depositado en una segunda caja de Petri con 10 mL de solución 1. Luego, los cerebros de cada embrión fueron disectados y depositados en una tercera caja de Petri con 10 mL de solución 1. Las cortezas de cada cerebro fueron disectadas observando bajo un microscopio estereoscópico y depositadas en una cuarta caja de Petri con 10 mL de solución 1. Las cortezas fueron cortadas en trozos pequeños con un bisturí y la suspensión se depositó en un tubo de 10 mL y se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min. El sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en 7 mL de solución 2, se agitó vigorosamente, se añadieron 7 mL de solución 4 y se agitó vigorosamente de nuevo. La suspensión se centrifugó a 3000 rpm por 3 min. El sobrenadante se descartó y el botón se resuspendió en 5 mL de solución 5. La suspensión se filtró varias veces en un separador celular, el filtrado fue depositado en otro tubo con 5 mL de solución 5 y centrifugado a 3000 rpm por 3 min. El sobrenadante se descartó y el botón fue resuspendido en medio Neurobasal suplementado con 0.5 mM de L-Glutamina, 1% de suplemento B27 completo, 1% de suplemento B27 sin antioxidantes y 20 μg/ml de

gentamicina. Las neuronas se sembraron en cubreobjetos circulares, pretratados con Poli-L-Lisina durante al menos 2 h, a una densidad de 70×10^3 células por cubreobjetos. Los cubreobjetos se depositaron en cajas de 12 pozos y las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ con 1 mL de medio de cultivo por pozo. Cada 4 días después de la primera siembra, 300 µL del medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco.

Cultivo primario de fibroblastos de pulmón

Los pulmones fueron disectados y colocados en una caja Petri y lavados 3 veces con PBS estéril con 2% de Ab-Am. Posteriormente, los pulmones se cortaron con bisturí en fragmentos de aproximadamente 1 mm³ y se incubaron en 5 mL de solución de colagenasa tipo IA 3 mg/mL en PBS a 37 °C durante 45 min. La suspensión fue recolectada en un tubo de 15 mL y centrifugada a 3,500 rpm para eliminar la colagenasa. El sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en medio de cultivo mínimo esencial (MEM), suplementado con 10% de SFB y 1% de Ab-Am. El homogenado se filtró usando un separador de células para retirar los restos de tejido y el resto se colocó en 3 cajas de Petri. Cada 48 h se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS estéril y se añadió medio de cultivo fresco.

Caracterización celular

Los astrocitos fueron caracterizados e identificados mediante la expresión del marcador glial GFAP (*G*lial *F*ibrillary *A*cidic *P*rotein) y las neuronas fueron identificadas por la expresión del marcador neuronal Tubulina-βIII. Ambas proteínas fueron

identificadas por inmunocitoquímica siguiendo el protocolo que se describe más adelante.

Inducción de senescencia prematura en astrocitos

La inducción de senescencia prematura se llevó a cabo en astrocitos con menos de 5 PD para evitar la posibilidad de que algunas células alcanzaran la SR. Los astrocitos fueron despegados de la caja de Petri con tripsina 0.1% y sembrados a densidad normal en cajas de 24 pozos. Después de 72 h, las células se trataron con H₂O₂ para inducir SIPS o bien con el inhibidor del proteosoma (epoxomicina) para inducir PIIPS. Para determinar las condiciones óptimas de concentración y tiempo de exposición a los tratamientos tales que indujeran senescencia en los astrocitos primarios, se diseñaron los siguientes esquemas de tratamiento:

- *Senescencia Prematura Inducida por Estrés (SIPS)*: Las células fueron incubadas por 1 ó 2 h con 75 ó 150 μ M de H₂O₂ disuelto en MCA, a 37°C con 5% de CO₂. Pasando el tiempo establecido, el medio de cultivo se retiró, las células se lavaron con PBS estéril y se añadió MCA fresco. Posteriormente, se incubaron las células por 48 h para los siguientes experimentos.
- *Senescencia Prematura Inducida por Inhibición del Proteosoma (PIIPS)*: Las células se incubaron con 1, 5 ó 10 nM de epoxomicina disuelta en el MCA a partir de una solución stock de epoxomicina en DMSO. En cada cambio de medio de cultivo (cada 48 h), una nueva dosis de epoxomicina fue aplicada a las células como se describió previamente para inducir este tipo de senescencia (13,62,95).

Para determinar bajo qué tratamientos se obtenía el mayor porcentaje de células senescentes se llevó a cabo la tinción de Actividad de β -galactosidasa Asociada a la Senescencia (SA- β Gal).

Tinción de actividad de β -galactosidasa asociada a la senescencia

Se siguió el protocolo propuesto por Dimri y colaboradores (34). Las células se fijaron con una solución de formaldehído al 3% en PBS, incubándolas a 37°C con 5% de oxígeno durante 15 min. Después, las células fijadas se lavaron 3 veces con PBS y se cubrieron con la solución de ensayo (5mM de $K_3[Fe(CN)_6]$, 0.5 mM de $K_4[Fe(CN)_6]$, 150 mM de NaCl, 2mM de $MgCl_2$ en 40mM de buffer Ácido Cítrico/ H_3PO_4 a pH 6, y 0.1% del sustrato X-Gal). Las cajas se sellaron con parafilm para evitar la entrada de CO_2 , que inhibe a la enzima β -galactosidasa, e incubadas por 24 h a 37°C. Posteriormente se observaron las células al microscopio y se contaron al menos 100 células por pozo de campos aleatorios para representar el porcentaje de células positivas a la tinción.

Inmunocitoquímica

Las células fueron sembradas en cubreobjetos a densidad normal y se indujo senescencia 48 ó 72 h después de la siembra como se describió anteriormente. El día correspondiente a las determinaciones, las células se fijaron en formaldehído al 3% como se describe en el apartado anterior. Una vez fijadas las células, los cubreobjetos se lavaron dos veces con Tween al 20% en PBS (PBS-Tween) y se incubaron con

200 μ L de bloqueador universal de proteínas por 10 min. Los anticuerpos utilizados para todas las determinaciones por inmunocitoquímica fueron los siguientes:

- Anti-GFAP (Santa Cruz ®), para caracterización e identificación de astrocitos, se utilizó a dilución 1:200. Anticuerpo secundario Alexa Fluor ® 488 en dilución 1:500.
- Anti-Tubulina β -III (Abcam ®), para caracterización de identificación de neuronas, se utilizó a dilución 1:1000. Anticuerpo secundario Alexa Fluor ® 488 en dilución 1:500.
- Anti-p16 (Santa Cruz ®), como marcador de senescencia en astrocitos, se utilizó en dilución 1:200. Anticuerpo secundario Alexa Fluor ® 488 en dilución 1:500.
- Anti- β -galactosidasa (Abcam ®), como marcador de senescencia en astrocitos, se utilizó en dilución 1:1000, en las mismas muestras que fueron marcadas con p16. El anticuerpo secundario utilizado fue Alexa Fluor ® 594 en dilución 1:500.
- Anti- γ H2AX (Abcam ®), como marcador de daño al ADN en astrocitos senescentes, se utilizó en diución 1:1000. Anticuerpo secundario Alexa Fluor ® 488 en dilución 1:500.

Cada anticuerpo se incubó durante 1 h y se realizaron 3 lavados con 2 mL de PBS-tween entre la incubación con un anticuerpo y otro. Después de la última incubación con el anticuerpo secundario correspondiente, todas las preparaciones fueron lavadas 3 veces con PBS-tween y montadas con 0.01% de DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) en solución de montaje (DakoCytomation ®) sobre sendos portaobjetos. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio de epifluorescencia y analizadas utilizando el software ImageJ.

Tratamiento de los astrocitos con los posibles inhibidores del SASP

El ácido acetilsalicílico (ASA), la dehidroepiandrosterona (DHEA) y el sulforafano (SFN) se disolvieron en DMSO a 100mM, 10mM y 1mM, respectivamente y se mantuvieron a -20°C hasta su uso. Las alícuotas de las soluciones stock se diluyeron en el MCA a las concentraciones deseadas y la solución resultante se añadió a los astrocitos en cultivo. Para los astrocitos inducidos a SIPS y el grupo control, los posibles moduladores fueron añadidos a las células en el MCA cada 48 h. Debido a que la epoxomicina debe estar presente en el medio de cultivo durante todo el experimento, para los astrocitos inducidos a PIIPS, el MCA con los posibles moduladores disueltos se añadió durante 1 h antes de añadir el MCA con epoxomicina. Este proceso se repitió cada 48 h.

Viabilidad y proliferación de astrocitos tratados con los posibles inhibidores del SASP

La Viabilidad y proliferación de los astrocitos se evaluó por un método colorimétrico utilizando el kit comercial CCK8 (*Cell Counting Kit 8*) Dojingo ®. Se siguieron las instrucciones del fabricante y las determinaciones colorimétricas se obtuvieron en un lector de ELISA H-Reader 1 (HLAB ®).

Determinación del SASP en los medios condicionados de astrocitos senescentes

Para evaluar el SASP se utilizó el medio de cultivo MCDB105 suplementado con 1% de SFB, 1.1% de L-Glutamina, 1.5% de Glucosa y 1% de Ab-Am. Este medio se añadió

al día 6 o al día 12 después de inducir la senescencia, para SIPS y PIIPS, o 6 y 12 días después de sembrar las células para el grupo control. Cuarenta y ocho horas después, el medio condicionado (MC) fue recolectado y centrifugado a 3400 rfc para descartar restos celulares. El MC se concentró 10 veces utilizando tubos con filtro concentrador Millipore® Amicon® (Tamaño de poro 3kDa) y fue congelado a -80°C hasta su uso.

Se evaluaron 14 citocinas y 8 quimiocinas por medio de un inmunoensayo de Multiplex ProcartaPex®. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del manual incluido en el Kit. Los datos fueron obtenidos en un equipo Luminex y la concentración de los analitos se determinó siguiendo las recomendaciones e instrucciones del fabricante.

Cuantificación de IL-6

La IL-6 fue medida en el medio condicionado, tanto de astrocitos como de fibroblastos de pulmón, utilizando la técnica de ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) con un kit comercial fabricado por BioLegend®. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del manual incluido en el Kit. Los datos fueron obtenidos leyendo la absorbancia de las muestras a 450 nm en un lector de ELISA H-Reader 1 (HLAB®).

Exposición de neuronas al medio condicionado de astrocitos senescentes

El MC de astrocitos no senescentes y senescentes, así como tratados o no tratados con los posibles moduladores fue mantenido a -80°C hasta su uso. Cuando las neuronas cumplieron 6 días en cultivo, se les retiró 300µl de su medio de cultivo que

fue reemplazado por 150 μ l de medio neurobasal fresco y 150 μ l de MC. Tres días después se repitió el procedimiento (Día 9 en cultivo) y a los 10 días en cultivo se llevaron a cabo las determinaciones del potencial de membrana mitocondrial.

Potencial de membrana mitocondrial

Para evaluar el potencial de membrana mitocondrial se añadió 1 μ L del colorante catiónico JC-1 a una concentración de 1mg/ml en cada pozo que contenía 1mL de medio de cultivo y las neuronas fueron incubadas por 30 min a 37°C. Después, cada cubreobjetos fue inmerso en solución Lockey (NaCl 154 mM, KCl 5.6mM, NaHCO₃ 3.6 mM, CaCl₂ 2.6mM, HEPES 5mM, Glucosa 5.6mM a pH 7.4). La preparación se observó en un microscopio confocal Leica TCS-SPS con un objetivo de inmersión. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 488nm. La señal de las mitocondrias polarizadas fue detectada a una emisión de 590 nm y la de las mitocondrias despolarizadas a 525 nm. Ambas señales fueron cuantificadas utilizando el software ImageJ.

Análisis estadístico

Los datos presentados están reportados como la media aritmética \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes por triplicado utilizando células de distintos especímenes. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con los datos, seguido de una prueba de Tukey-Kramer o t-Student parida para comparar los datos. Se utilizó el valor $p < 0.05$ como nivel de significancia.

Para todos los experimentos en que se analizó el SASP, se llevó a cabo una normalización llevando los datos de las cuantificaciones a una escala que corresponde a una función del tipo $f(x) = \frac{1-e^{-x}}{1+e^{-x}}$, que es de tipo sigmoïdal. Los datos normalizados fueron promediados, para cada analito, para obtener una línea base y se calculó la diferencia de cada dato con respecto a la línea base. Esos valores se utilizaron para construir los mapas de calor que se muestran como el perfil global de secreción. Posteriormente se realizó un análisis de componentes principales para obtener las matrices de correlación entre los perfiles de secreción.

Resultados

Caracterización del cultivo primario de astrocitos de rata

La pureza del cultivo de astrocitos fue evaluada mediante inmunocitoquímica para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, *G*lial *F*ibrillary *A*cidic *P*rotein); La Figura 4A muestra una imagen representativa de microscopia de epifluorescencia para dicho marcador. Más del 95% de las células fueron positivas al marcador, confirmando que las células obtenidas fueron astrocitos. Por otro lado, se permitió el crecimiento del cultivo de astrocitos resembrando las células cada vez que alcanzaban una confluencia por arriba del 80%; en cada resiembra se calculó el número de duplicaciones poblacionales (PD, *P*opulation *D*oublings). La Figura 4B muestra una gráfica de proliferación de las CDP en función de los días en cultivo. Cabe destacar que los astrocitos no detuvieron su proliferación en el tiempo evaluado, 80 días, sugiriendo que no alcanzan la SR, al menos dentro de este periodo de tiempo.

El estrés oxidante y la inhibición del proteosoma inducen senescencia prematura

Los astrocitos de rata fueron expuestos a distintos tratamientos de H₂O₂ y el inhibidor del proteosoma epoxomicina y se llevó a cabo la tinción SA-β-galactosidasa 4 días después de iniciar los tratamientos para evaluar la inducción de senescencia prematura (Figura 5). En el caso del H₂O₂, se evaluaron cuatro esquemas distintos de

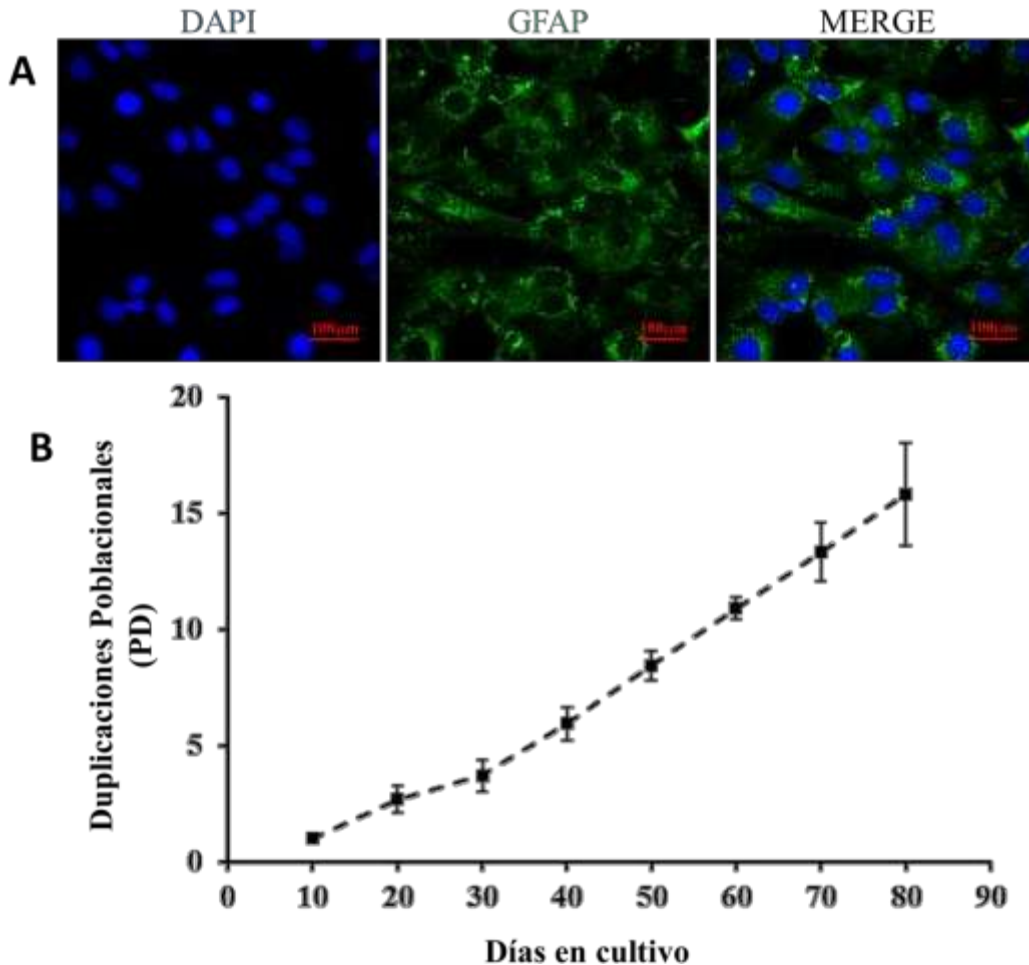


Figura 4. Caracterización del cultivo primario de astrocitos de rata Wistar

- A. Expresión de la proteína astrogliar GFAP. Los astrocitos fueron incubados con el anticuerpo contra GFAP como se describe en materiales y métodos y su expresión fue evidenciada mediante inmunocitoquímica. Más del 95% de las células fueron positivas al marcador.
- B. Curva de proliferación de astrocitos. Las PD se calcularon como se describe en materiales y métodos. La curva de astrocitos no alcanzó la meseta típica de un cultivo que experimenta Senescencia Replicativa. Cada punto representa la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos distintos realizados por triplicado.

tratamiento: 1) 75 μ M por 1 h, 2) 75 μ M por 2 h, 3) 150 μ M por 1 h y 3) 150 μ M por 2 h. La Figura 5A muestra micrografías representativas de todos los tratamientos; comparado con el control, el H₂O₂ produjo un incremento en la cantidad de células

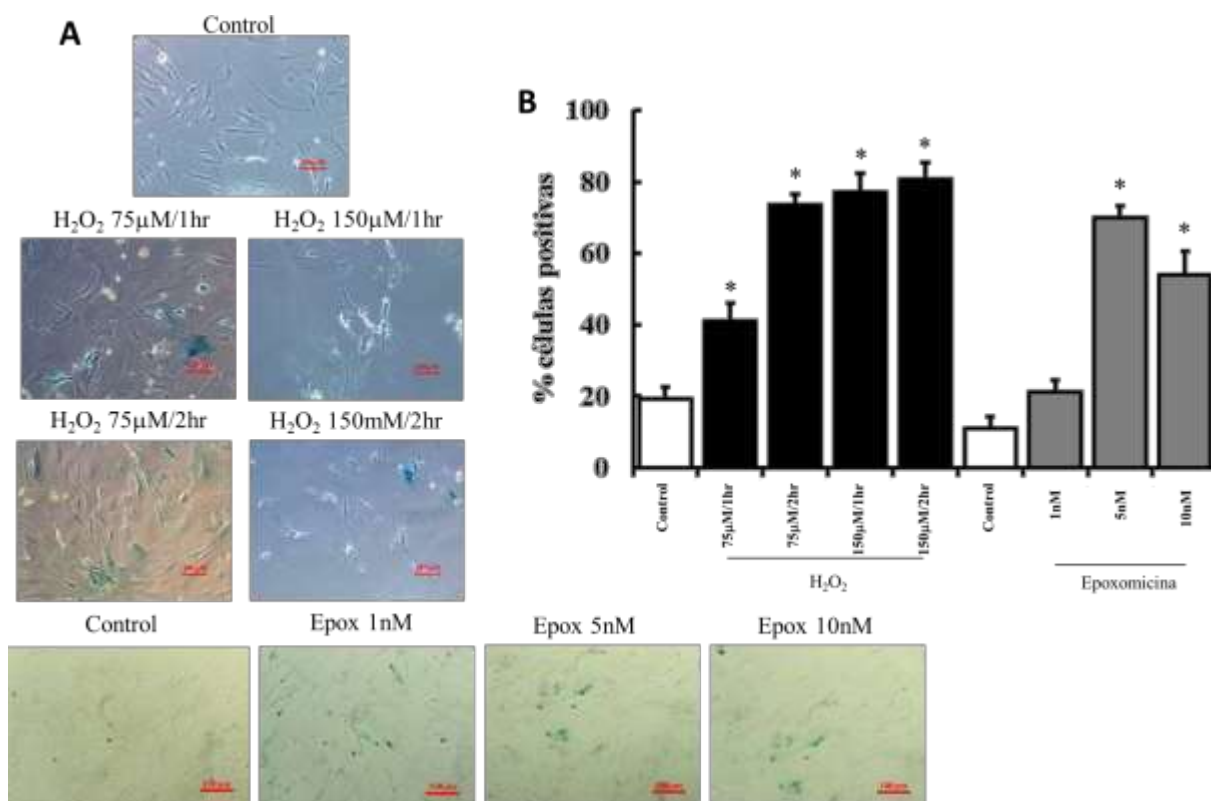


Figura 5. H₂O₂ y epoxomicina inducen SA-β-galactosidasa en función de la concentración en el cultivo primario de astrocitos

- A. Micrografías representativas de los astrocitos tratados con H₂O₂ o epoxomicina a distintas bajo distintos esquemas de tratamiento. Para el caso del H₂O₂, el tiempo de exposición fue de 1 o 2 horas y el ensayo de SA-β-galactosidasa se realizó 72 horas después del tratamiento con H₂O₂. Para el tratamiento con epoxomicina, las células fueron expuestas al inhibidor del proteosoma durante 96 horas, cambiando el medio de cultivo por medio fresco con epoxomicina a las 48 horas. El ensayo de SA-β-galactosidasa se llevó a cabo inmediatamente después de pasadas las 96 horas. Señala con flechas en el control un ejemplo de célula positiva a SA-Bgal, de las que te dan un 20% que muestras en la gráfica.
- B. Porcentaje de células positivas al ensayo de SA-β-galactosidasa, cada barra representa el promedio ± desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. *p<0.05 con respecto al control por la prueba de Tukey-Cramer.

positivas a esta tinción (Figura 5B), sin embargo, en los tratamientos con 150 μM de H₂O₂ la cantidad de células que sobrevivió al tratamiento fue muy baja, como se puede observar por la baja densidad de las micrografías, lo que impidió que fuese un

tratamiento viable para evaluar otros parámetros de la senescencia prematura. El tratamiento con 75 μM de H_2O_2 por 2 h produjo alrededor de 75% de células positivas al ensayo y no redujo significativamente la confluencia en el cultivo por lo que se eligió este tratamiento para evaluar este tipo de senescencia prematura, SIPS (Stress-Induced Premature Senescence).

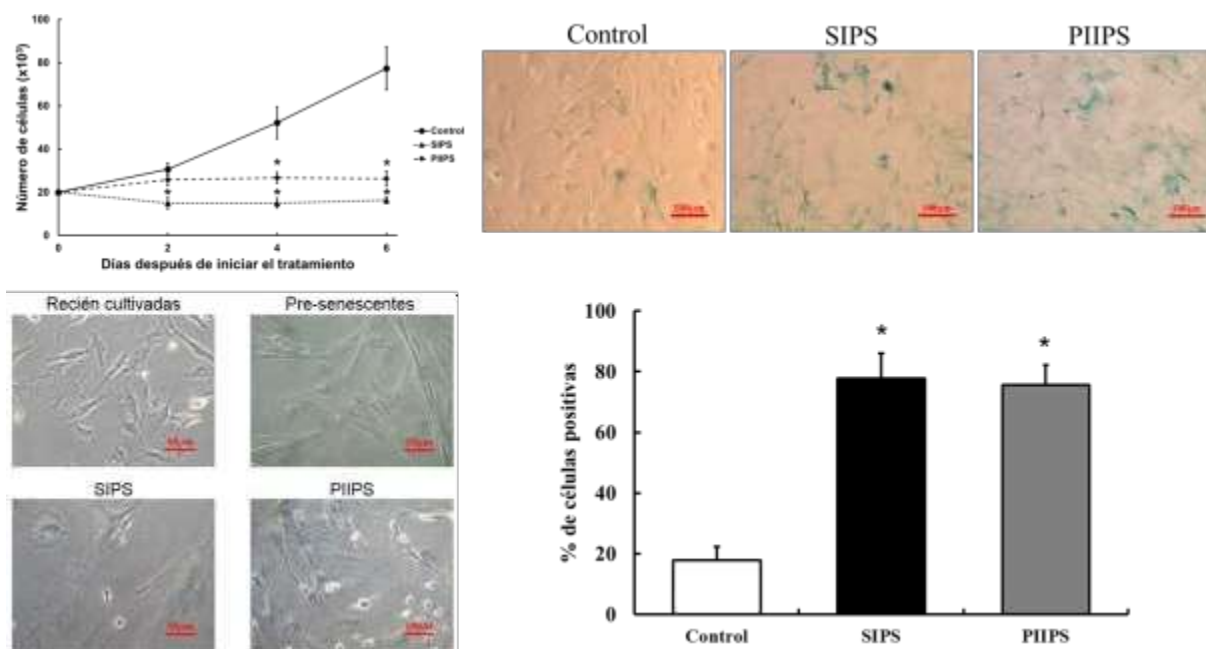


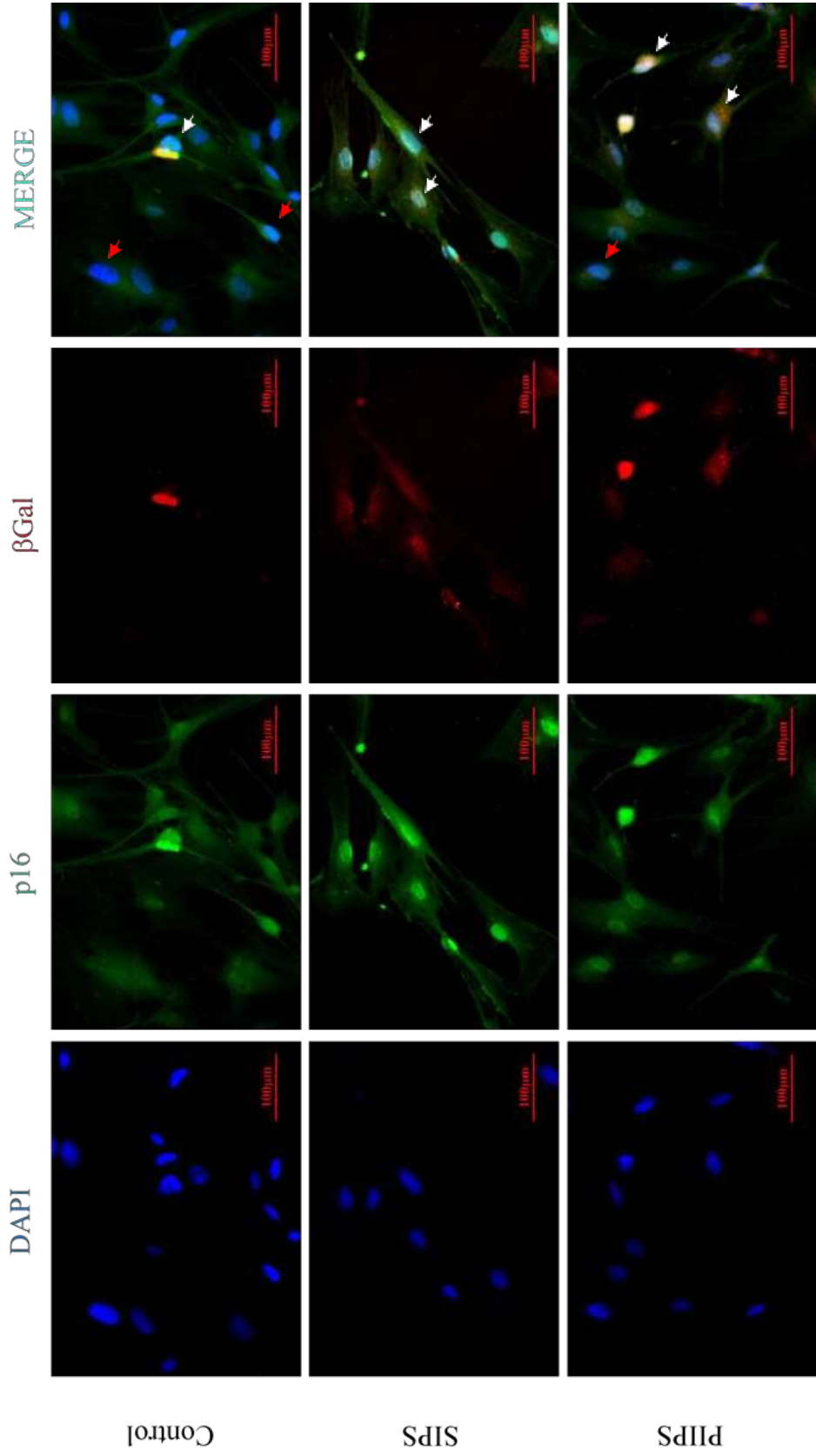
Figura 6. H_2O_2 y epoxomicina inducen fenotipo senescente en astrocitos de rata

Se eligieron los tratamientos de H_2O_2 75 μM por 2 horas y de epoxomicina 5nM para inducir SIPS y PIIPS, respectivamente y estudiar con más detalle la senescencia prematura inducida.

- Los astrocitos detienen su proliferación desde el inicio del tratamiento tanto con H_2O_2 como con epoxomicina.
- El tratamiento con H_2O_2 y epoxomicina induce cambios morfológicos en los astrocitos que son evidentes en las zonas de menor confluencia del cultivo. Los astrocitos inducidos a SIPS adoptaron una forma aplanada, mientras que los inducidos a PIIPS, una forma estelar. Indica con flecha la morfología que describes. Los astrocitos en proliferación mostraron una forma alargada en cultivo.
- Micrografías representativas del ensayo SA- β -galactosidasa
- Porcentaje de células positivas al ensayo SA- β -galactosidasa.

Los datos representan la media \pm desviación estándar, $n = e$, * $p < 0.05$ con respecto al control por la prueba de Tukey-Cramer

A



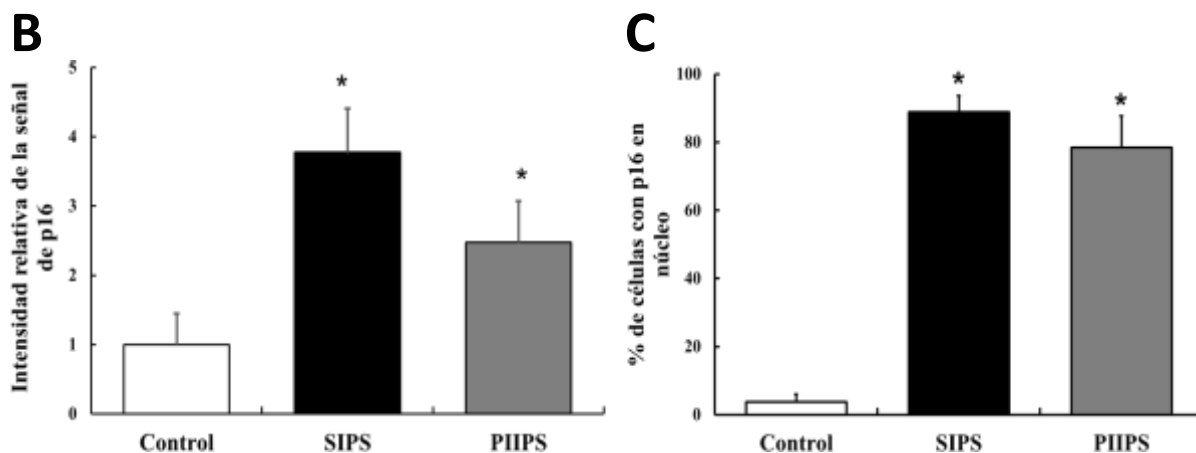


Figura 7. Los astrocitos inducidos tanto a SIPS como a PIIPS son positivos al marcador de senescencia p16

- A. (En la página anterior) Imágenes representativas de inmunocitoquímicas para p16 y β -galactosidasa. Se observa que tanto los astrocitos inducidos a SIPS como los inducidos a PIIPS incrementan la expresión del marcador p16 nuclear (Canal verde). La expresión de β -galactosidasa se observa ligeramente incrementada en SIPS y PIIPS (Señales en forma de puntos en el canal Rojo). Las flechas blancas indican ejemplos de células que fueron consideradas como positivas a p16. Las flechas rojas indican ejemplos de células que fueron consideradas como negativas a p16.
- B. Expresión relativa total de p16. Se cuantificó la intensidad de la señal debida a p16 utilizando el software ImageJ.
- C. Porcentaje de células con p16 nuclear. Se contaron células de 5 campos aleatorios de cada muestra y se obtuvo la proporción de células con p16 en el núcleo, las cuales fueron consideradas como senescentes.

Los datos muestran el promedio \pm desviación estándar, $n = 3$ experimentos independientes por triplicado. $p < 0.05$ con respecto al control por la prueba de Tukey-Cramer.

En el caso de la epoxomicina, se evaluaron tres concentraciones distintas, 1nM, 5nM y 10nM. Los tres tratamientos mostraron un aumento en la cantidad de células positivas a la tinción SA- β -galactosidasa (Figura 5A), y al realizar el conteo de células positivas a la tinción observamos un mayor porcentaje (~75%) de células positivas en el tratamiento con 5nM del inhibidor del proteosoma (Figura 5B). Así, decidimos utilizar

el tratamiento con 5nM para inducir la Senescencia Prematura Inducida por Inhibición del Proteosoma, PIIPS (*Proteasome Inhibition Induced Premature Senescence*).

Con los tratamientos elegidos para inducir la SIPS y la PIIPS se evaluaron otros marcadores de senescencia: detención de la proliferación, cambios morfológicos, aumento en la expresión de p16 y presencia de la γ H2AX. En la Figura 6A se observa que desde el inicio de los tratamientos con H₂O₂ o con epoxomicina los astrocitos detienen su proliferación, teniendo una cantidad de células significativamente más baja que el control a partir del segundo día después del tratamiento para la SIPS y a partir del cuarto día para el caso de la PIIPS. De manera interesante, se observaron diferencias morfológicas entre los astrocitos inducidos a SIPS, que adquirieron una forma aplanada y alargada, y los inducidos a PIIPS, que adoptaron una forma estelar, y los astrocitos no senescentes (Figura 6B). Bajo estas condiciones de inducción de senescencia, se realizó otro ensayo de tinción de actividad de SA- β -galactosidasa (Figura 6C), obteniéndose valores similares de células positivas a la tinción de las que se habían obtenido con diferentes esquemas de tratamiento (Figura 6D). Posteriormente, se evaluó la expresión y localización del inhibidor del ciclo celular p16 y de la enzima β -galactosidasa por inmunocitoquímica; en la Figura 7A se observan las imágenes representativas de microscopía confocal de este experimento. La señal correspondiente a p16 (verde) mostró un incremento en la intensidad en los astrocitos inducidos a SIPS y PIIPS que co-localiza con la señal del marcador nuclear 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, por sus siglas en inglés). En la Figura 7B se presenta una gráfica que muestra la cuantificación de la señal de p16 obtenida en las imágenes

analizadas, en la cual se observa que la intensidad de la señal aumentó casi 4 veces en los astrocitos inducidos a SIPS y alrededor de 2.5 veces en los inducidos a PIIPS, lo cual sugiere un incremento en la expresión de p16. Además, en la Figura 7C se muestra una gráfica con el porcentaje de células con p16 localizado en el núcleo, observándose alrededor del 90% de células con p16 nuclear en los astrocitos inducidos a SIPS y alrededor del 80% en los inducidos a PIIPS. Para el caso de la enzima β -galactosidasa se observa una señal muy baja en el grupo control y un incremento de la señal en los astrocitos inducidos a senescencia, para esta enzima no se realizó cuantificación de la señal, debido a que el incremento de la actividad de β -galactosidasa evaluado mediante la tinción SA- β -galactosidasa, y no un aumento en su expresión, es lo que se asocia con el fenómeno de senescencia celular (Figura 6C-D).

Ya que la senescencia celular se caracteriza por una respuesta sostenida de daño al ADN, particularmente de la señalización debida a rupturas de doble cadena, se evaluó la presencia de la histona modificada γ H2AX por inmunocitoquímica. La Figura 8A muestra imágenes representativas de este ensayo, en las que se observan algunas células con foci de γ H2AX en los astrocitos inducidos a SIPS y a PIIPS. Entre el 10 y el 15% de las células inducidas a senescencia prematura contenían más de 5 foci de γ H2AX, comparado con el 2% de las células control (Figura 8B). En las gráficas de la derecha de la Figura 8B se muestra la distribución del porcentaje de células con determinados números de foci de γ H2AX encontrados en cada grupo y puede observarse que en los astrocitos inducidos a senescencia prematura el número de foci

presentes aumenta, sugiriendo rompimientos de doble cadena en el ADN y su consecuente señalización para detener el ciclo celular.

Con estos resultados se demuestra que los tratamientos con H₂O₂ y epoxomicina elegidos inducen senescencia prematura en los astrocitos provenientes de ratas neonatas bajo los esquemas de tratamiento elegidos.

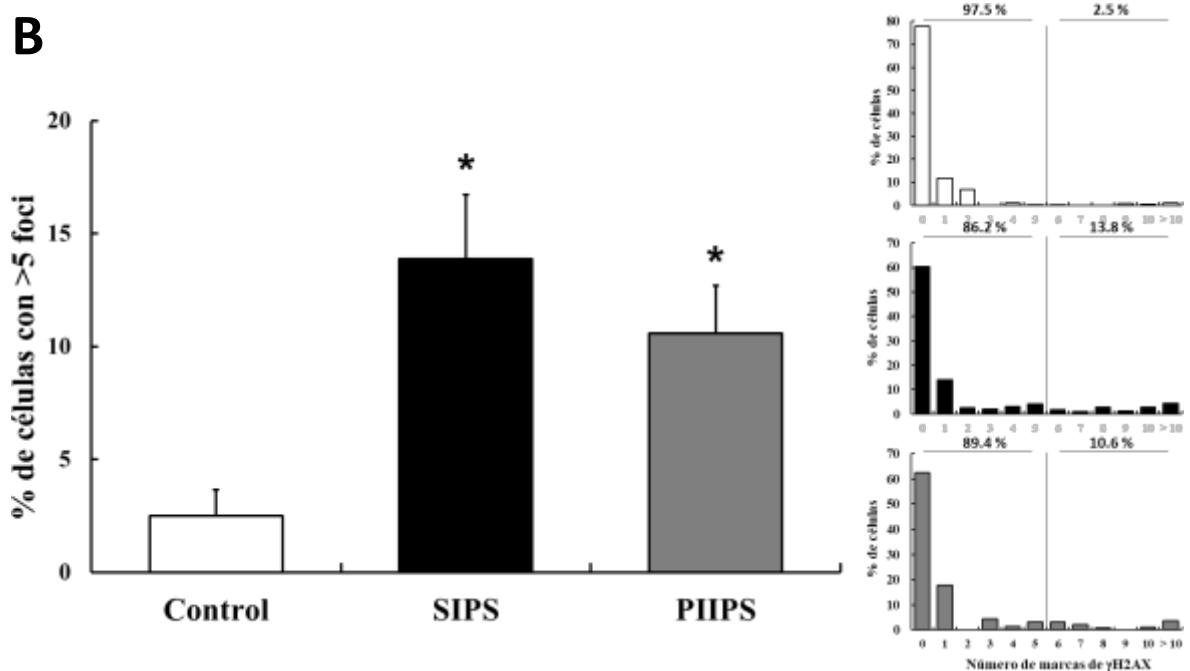


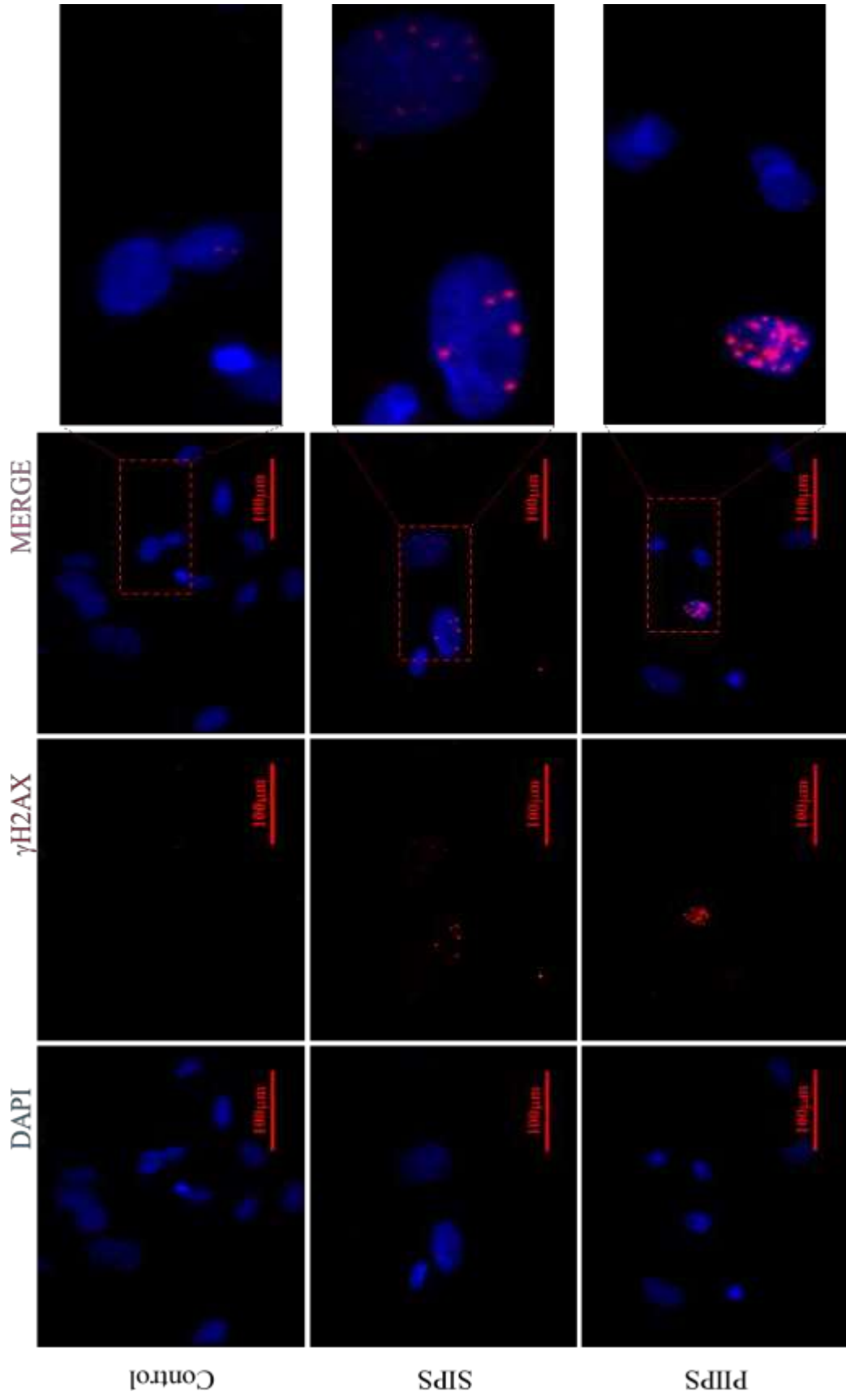
Figura 8. Los astrocitos inducidos a SIPS y PIIPS son positivos al marcador de daño al ADN, γ H2AX

A. (Página siguiente). Imágenes representativas de inmunocitoquímicas para el marcador de daño al ADN, γ H2AX. Se observa que las células inducidas a SIPS y a PIIPS presentan un incremento en el número de marcas nucleares de la histona.

B. Porcentaje de células con más de 5 marcas de γ H2AX a partir del conteo de 5 campos aleatorios de cada muestra. En las gráficas insertadas se observan histogramas con el promedio de marcas encontradas por célula y el porcentaje total tanto para < 5 marcas como > 5 marcas.

Los datos representan el promedio \pm desviación estándar, $n = 3$, * $p < 0.05$ con respecto al control por la prueba de Tukey-Cramer.

A



El Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia de astrocitos difiere del perfil clásico de secreción

Una vez evaluados los marcadores de senescencia que ocurren a tiempos cortos, se realizó un análisis del SASP de astrocitos. Como el SASP es una característica que varía en función del tiempo y que tarda varios días en establecerse (64), decidimos evaluarlo a 2 tiempos distintos: 6 y 12 días después de la inducción de senescencia. En total fueron evaluados 22 analitos, 14 citocinas y 8 quimiocinas, utilizando un kit de Multiplex. La Figura 9A muestra en forma de mapas de calor, el perfil de secreción de astrocitos no senescentes y de astrocitos inducidos a SIPS o PIIPS luego de 6 ó 12 días de la inducción de senescencia. Inesperadamente, fueron pocas las citocinas que aumentaron o cambiaron sus niveles de secreción en los astrocitos senescentes, incluso al día 12. Las citocinas que aumentaron su secreción fueron el factor de crecimiento G-CSF (CSF3), la citocina proinflamatoria IL-1 α y las quimiocinas GRO- α e IP-10, tanto para SIPS como para PIIPS, y MCP-1, MIP-1 y RANTES solamente para PIIPS. Algunas citocinas cambiaron su secreción dentro del mismo grupo de senescencia, pero comparando los días en que se evaluó, por ejemplo, GRO- α , IP-10, MCP-1 y RANTES aumentaron su secreción en PIIPS al día 6, pero al día 12 su secreción fue similar al de las no senescentes, lo cual refuerza la idea de cambios en el perfil de secreción de las células senescentes en función del tiempo.

Para analizar los perfiles de secreción se realizó una matriz de correlación entre los distintos grupos (Tabla 1); los coeficientes de correlación obtenidos para SIPS al día 6

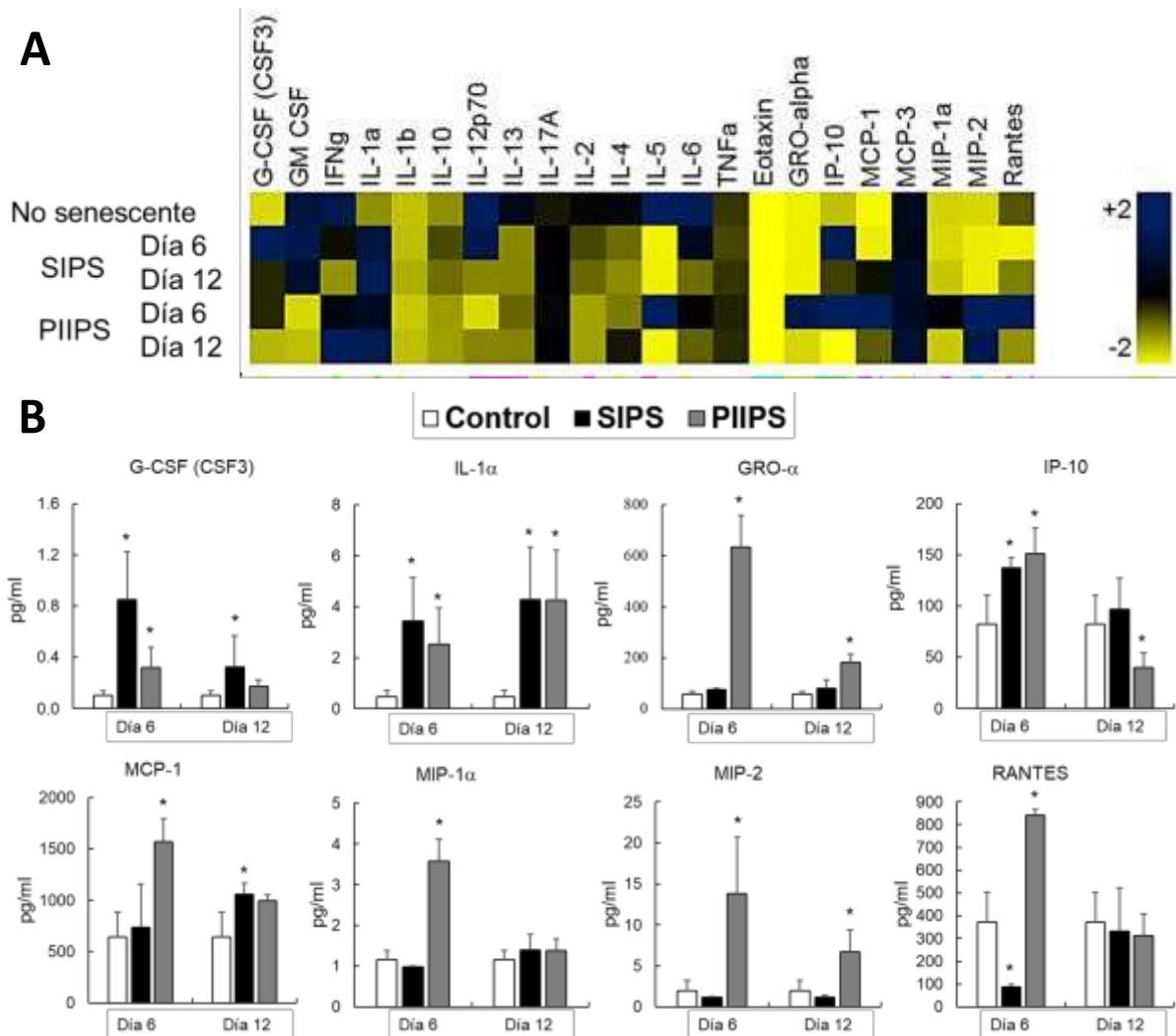


Figura 9. Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia de astrocitos inducidos a SIPS y a PIIPS

A. Perfil de secreción global de astrocitos no senescentes e inducidos a SIPS y PIIPS. Los valores cuantitativos obtenidos del análisis fueron promediados para obtener una línea base y posteriormente normalizados utilizando una función sigmoideal (ver material y método para más detalle). La escala de -2 a +2 es una escala relativa arbitraria de la secreción de cada citocina.

B. Análisis cuantitativo de citocinas seleccionadas del panel A. Las citocinas mostradas fueron en las que se observaron cambios significativos en su secreción con respecto al control (no senescentes).

Los datos representan el promedio \pm desviación estándar, $n = 3$, $*p < 0.05$ con respecto al control por la prueba de Tukey-Cramer.

y al día 12 con respecto al grupo de no senescentes fueron $r = 0.31$ y $r = 0.11$, respectivamente, lo cual sugiere que el perfil del SASP de los astrocitos inducidos a SIPS se diferencia más del perfil de secreción de los astrocitos no senescentes

conforme va pasando el tiempo. Para PIIPS, el coeficiente de correlación con respecto a los astrocitos no senescentes fue de $r = -0.18$ al día 6 y $r = 0.15$ al día 12, indicando que para PIIPS, desde el día 6 se diferencia el perfil del SASP con respecto a los astrocitos no senescentes; el valor negativo de r al día 6 indica que los valores de los 2 grupos comparados se encuentran en lados opuestos de la línea base. Interesantemente, los coeficientes de correlación entre SIPS al día 6 y al día 12 fue $r = 0.65$, indicando una variación pequeña en el perfil de secreción del SASP en función del tiempo cuando la senescencia es inducida por estrés oxidante. En contraste, el coeficiente de correlación entre PIIPS al día 6 y al día 12 fue de $r = 0.23$, indicando una mayor variación en el perfil de secreción con respecto al tiempo cuando la senescencia es inducida por inhibición del proteosoma con epoxomicina. Al comparar los perfiles del SASP entre SIPS y PIIPS al día 6, el coeficiente de correlación fue $r = -0.21$, indicando que los perfiles de secreción se encuentran alejados entre sí, pero al día 12 el coeficiente de relación obtenido entre los 2 grupos de astrocitos senescentes fue de $r = 0.37$, lo cual implica que los perfiles de secreción al día 12 tienen algunos componentes compartidos. Tomando estos datos en conjunto, nuestro análisis sugiere que conforme pasa el tiempo el perfil del SASP de las células senescentes se aleja

Tabla 1. Matriz de correlación del perfil de secreción de astrocitos no senescentes vs astrocitos inducidos a SIPS y PIIPS

	No Senescente	SIPS D6	SIPS D12	PIIPS D6	PIIPS D12
No senescente	1				
SIPS D6	0.31592692	1			
SIPS D12	0.113301772	0.656605645	1		
PIIPS D6	-0.187768622	-0.21058917	-0.017219075	1	
PIIPS D12	0.157920547	0.1302669	0.374024879	0.234201628	1

progresivamente del perfil de secreción de las células no senescentes, además, que el perfil de secreción de los 2 tipos de senescencia estudiados, SIPS y PIIPS, convergen hacia un mismo perfil varios días después de inducir la senescencia.

En la figura 9B se muestra el análisis cuantitativo de las citocinas en las que se observó un mayor cambio en el perfil de secreción en las células senescentes. En primer lugar, cabe destacar la diferencia en los órdenes de magnitud de las concentraciones detectadas de las citocinas y las quimiocinas, mientras que las primeras fueron detectadas en ordenes de 10^{-1} a 10 pg/mL, las quimiocinas se detectaron en ordenes de 10 a 10^3 pg/mL, sugiriendo que las quimiocinas podrían jugar un rol importante en el papel fisiológico del SASP. Una de las citocinas más conservadas en el SASP es la IL- 1α , la cual incrementó, tanto al día 6 como al 12, alrededor de 4 veces su secreción en los modelos de senescencia aquí estudiados en comparación con la secreción de los astrocitos no senescentes. El factor de crecimiento G-CSF (CSF3) se incrementó significativamente al día 6 en ambos tipos de senescencia, pero sólo se mantuvo en niveles significativamente mayores en la SIPS al día 12. GRO- α aumentó significativamente sólo en la PIIPS en los dos días analizados. Para IP-10 se observó un incremento significativo en ambos tipos de senescencia, pero únicamente al día 6, mientras que al día 12 decreció significativamente en el caso de la PIIPS.

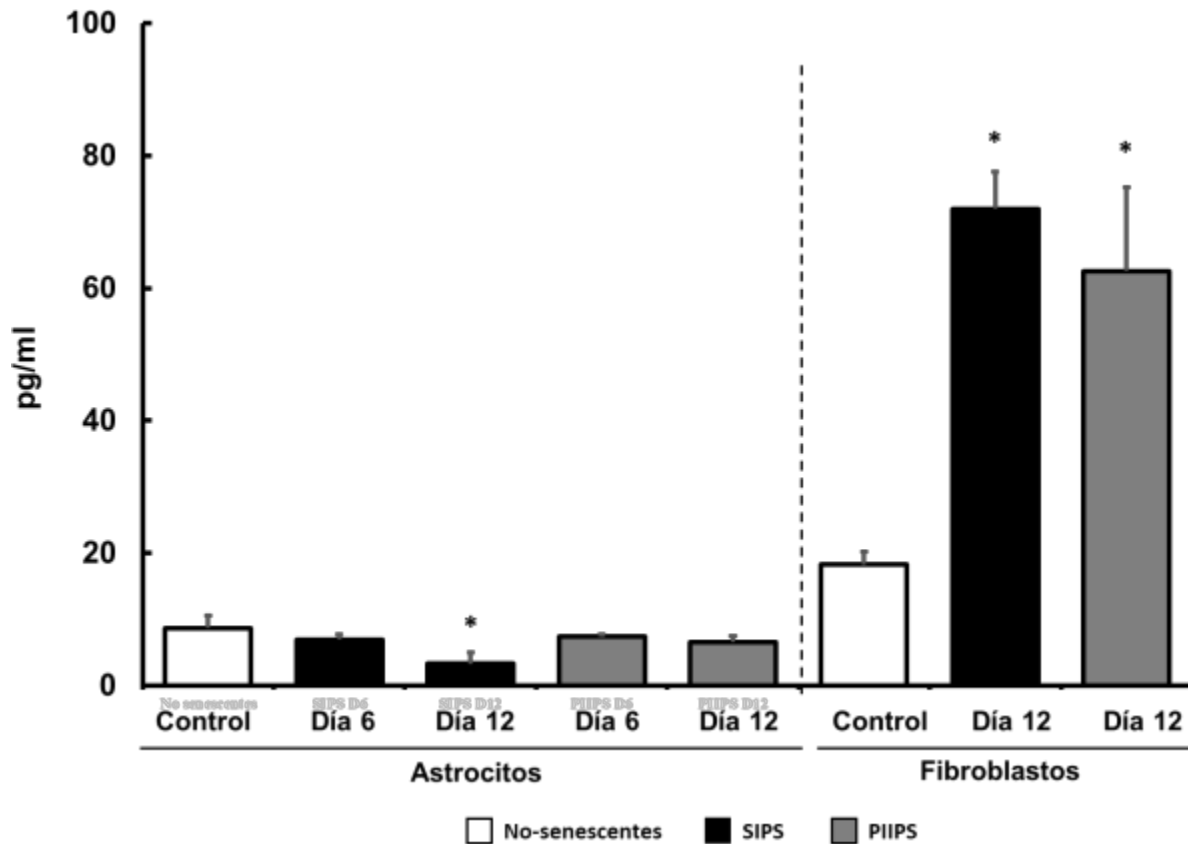


Figura 10. El SASP de astrocitos inducidos a SIPS o a PIIPS no incluye a la IL-6 como factor principal.

La presencia de IL-6 no fue detectada en el medio condicionado de astrocitos inducidos a SIPS o a PIIPS (panel izquierdo), pero sí en fibroblastos de pulmón senescentes (panel derecho), en un ensayo de ELISA.

Las barras muestran el promedio \pm desviación estándar, $n = 3$, $*p < 0.05$ con respecto al control por la prueba de Tukey-Cramer.

Sorprendentemente, la citocina más conservada en el SASP, la IL-6, no mostró incremento en su secreción en nuestros modelos de senescencia, inclusive, la IL-6 no fue detectada en varias de las muestras analizadas. Para confirmar este dato inesperado, diseñamos un experimento en el que comparamos la secreción de IL-6 de los astrocitos senescentes y de fibroblastos de pulmón de rata inducidos a senescencia

por medio de un kit de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). En la Figura 10 se muestra la gráfica de dicho experimento, en la que se puede observar que los fibroblastos secretan más IL-6 que los astrocitos, incluso cuando no han sido inducidos a senescencia, ~10 pg/mL y ~20pg/mL para astrocitos y fibroblastos, respectivamente. En el caso de los astrocitos, la secreción de IL-6 incluso disminuyó al día 12, cuando fueron inducidos a SIPS, los otros grupos de senescencia mantuvieron una secreción de IL-6 similar al grupo de no senescentes. En los fibroblastos senescentes (evaluado únicamente al día 12) la secreción de IL-6 aumento 4 veces en SIPS y 3 veces en PIIPS (~80 pg/mL y ~60 pg/mL, respectivamente). Esto confirma que en nuestro modelo de astrocitos senescentes la IL-6 no es un componente principal del SASP, como si lo es para otros modelos celulares, como los fibroblastos.

Tomando en conjunto todos estos datos, nuestros resultados sugieren que el SASP de astrocitos de rata Wistar tiene menos componentes que el SASP de otros tipos celulares, además, la IL-1 α , pero no la IL-6, es el marcador principal del SASP. Por otro lado, las quimiocinas parecen jugar un rol más importante que las citocinas en este modelo de senescencia. Aun así, el SASP de los astrocitos mantiene un perfil proinflamatorio, tomando en cuenta los factores que se vieron aumentados en la senescencia (G-CSF (CSF3), IL-1 α , GRO- α , MCP-1, MIP-1 α , MIP-2 y RANTES).

Efecto de los posibles moduladores en la secreción del SASP

Se ha sugerido que el perfil proinflamatorio del SASP, cuando ocurre de forma crónica por acumulación de las células senescentes, puede promover fenómenos biológicos como la proliferación de células transformadas, la angiogénesis y la disfunción de los

tejidos; particularmente, en el sistema nervioso central se ha asociado con neuroinflamación y con enfermedades asociadas a la edad, particularmente el Alzheimer (12). Por esta razón decidimos evaluar si 3 fármacos con actividad antiinflamatoria, el ácido acetilsalicílico (ASA), componente activo de la aspirina, el sulforafano (SFN), activador de la respuesta antioxidante mediada por Nrf2, y la hormona dehidroepiandrosterona (DHEA), podrían cambiar el perfil de secreción del SASP de astrocitos senescentes.

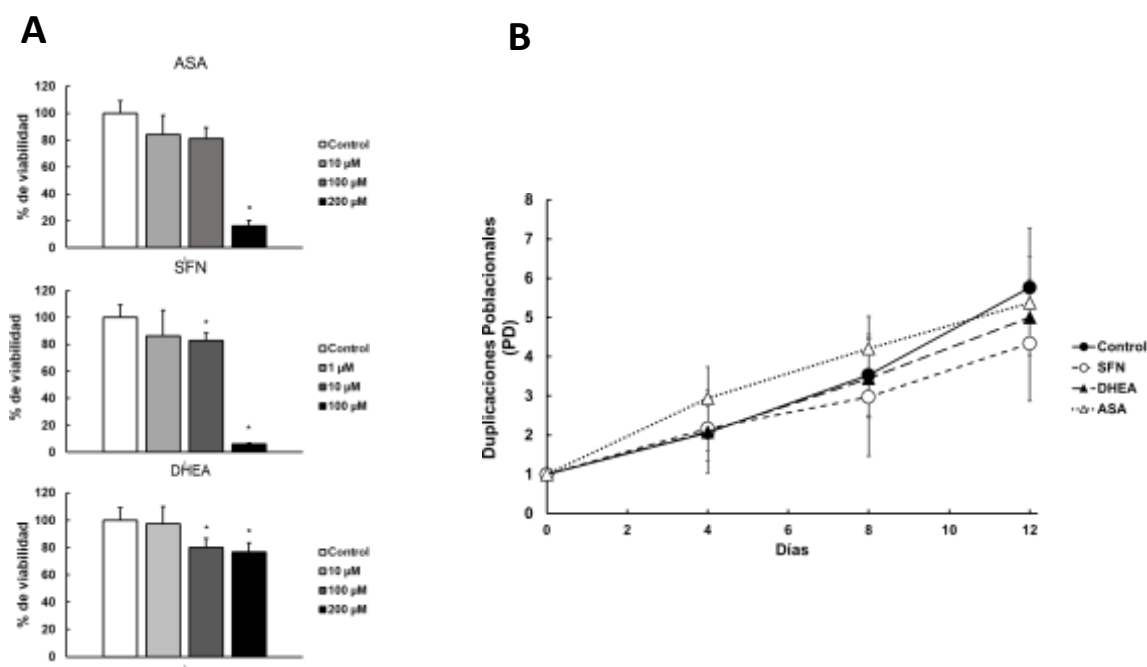


Figura 11. Dosis-respuesta de los posibles moduladores del SASP, ácido acetilsalicílico, sulforafano y dehidroepiandrosterona

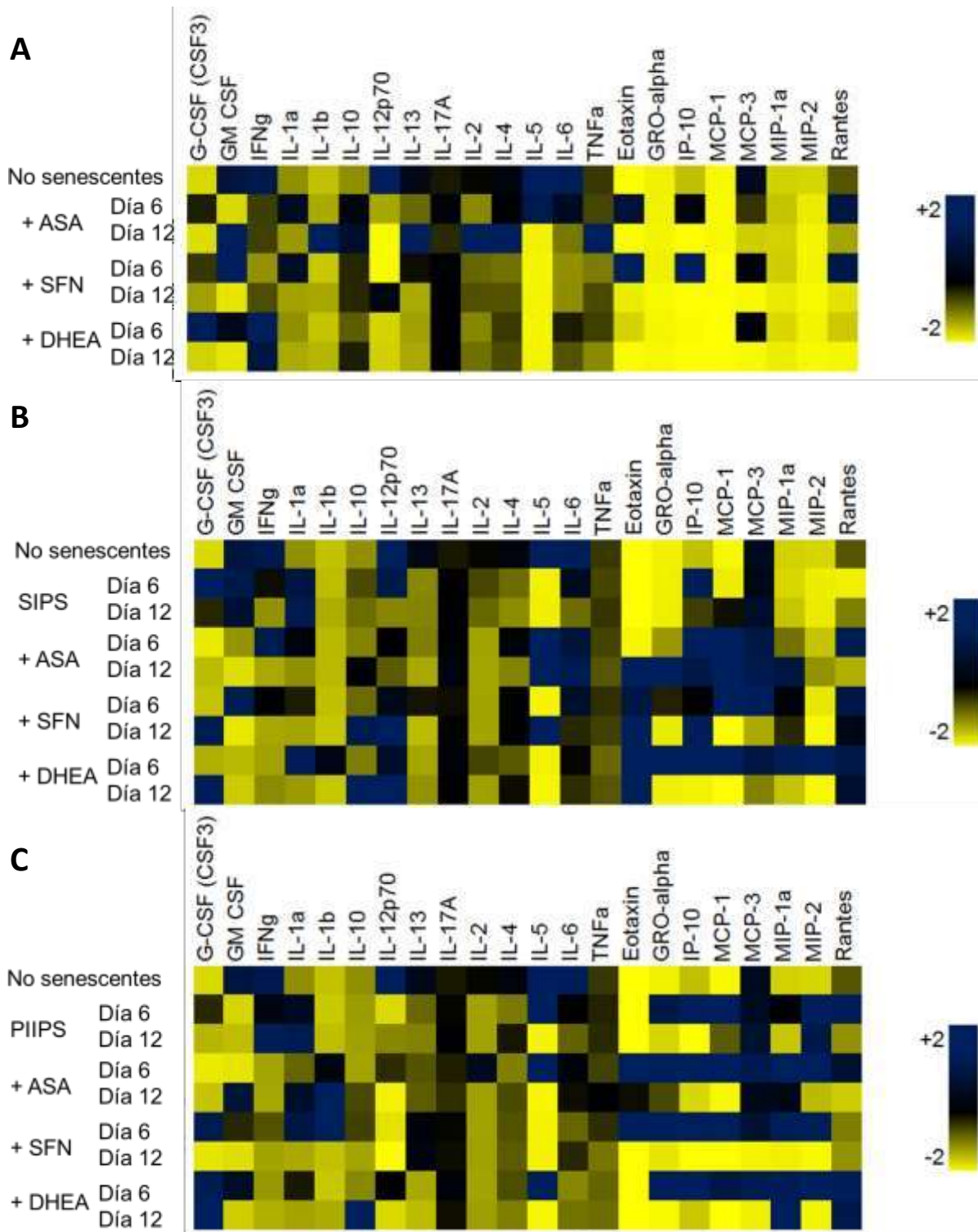
- A. Porcentaje de viabilidad de los astrocitos al ser tratados con distintas concentraciones de los posibles moduladores. Las determinaciones se llevaron a cabo después de 48 horas de exposición a los fármacos.
- B. Curvas de proliferación de astrocitos tratados con las dosis elegidas de los posibles moduladores, 100, 10 y 1 μ M para ácido acetil salicílico, dehidroepiandrosterona y sulforafano, respectivamente

Los datos muestran el promedio \pm desviación estándar, $n = 3$, $*p < 0.05$ con respecto al control por la prueba de Tukey-Cramer.

Para tal fin, primero evaluamos distintas concentraciones de cada uno de los fármacos, considerando rangos de concentraciones farmacológicas y fisiológicas según lo reportado previamente para su uso a nivel celular (4,35,88). La Figura 11A muestra el efecto del tratamiento con distintas concentraciones de los fármacos a probar en la viabilidad celular con 48 h de exposición al fármaco. En el caso del ASA se utilizaron concentraciones de 10, 100 y 200 μM , los tratamientos con 10 y 100 μM mantuvieron la viabilidad celular en valores similares al control. En el caso del SFN, se probaron las concentraciones de 1, 10 y 100 μM y solamente en el tratamiento con 1 μM se mantuvo la viabilidad celular. En caso de la DHEA, se probaron concentraciones de 10, 100 y 200 μM y únicamente la de 10 μM mantuvo la viabilidad celular. Utilizando las concentraciones más altas que mantuvieron la viabilidad celular, 100 μM (ASA), 1 μM (SFN) y 10 μM (DHEA), se verificó que la viabilidad celular no se viera afectada durante 12 días de exposición a los tratamientos (con dosis repetidas cada 48 h), ni que se indujera o retrasara la entrada a la senescencia. En la Figura 11B se observa que la proliferación celular se mantuvo igual que las células control durante este periodo de tiempo; por consiguiente, estas concentraciones de los fármacos fueron utilizadas para evaluar su efecto en la secreción del SASP.

En la Figura 12 se muestran los mapas de calor con el perfil de secreción de los astrocitos no senescentes, inducidos a SIPS y a PIIPS y posteriormente tratados con ASA, SFN o DHEA. En los astrocitos no senescentes (Figura 12A, Tabla 2), el ASA redujo la secreción basal de $\text{IFN}\gamma$ e IL-12, inesperadamente, este fármaco incrementó la secreción de GM-CSF, IL-1 β , IL-13, IL-12, IL-4, $\text{TNF}\alpha$ y RANTES, especialmente al

día 12 en el que se observa un perfil más proinflamatorio. La idea de que el ASA



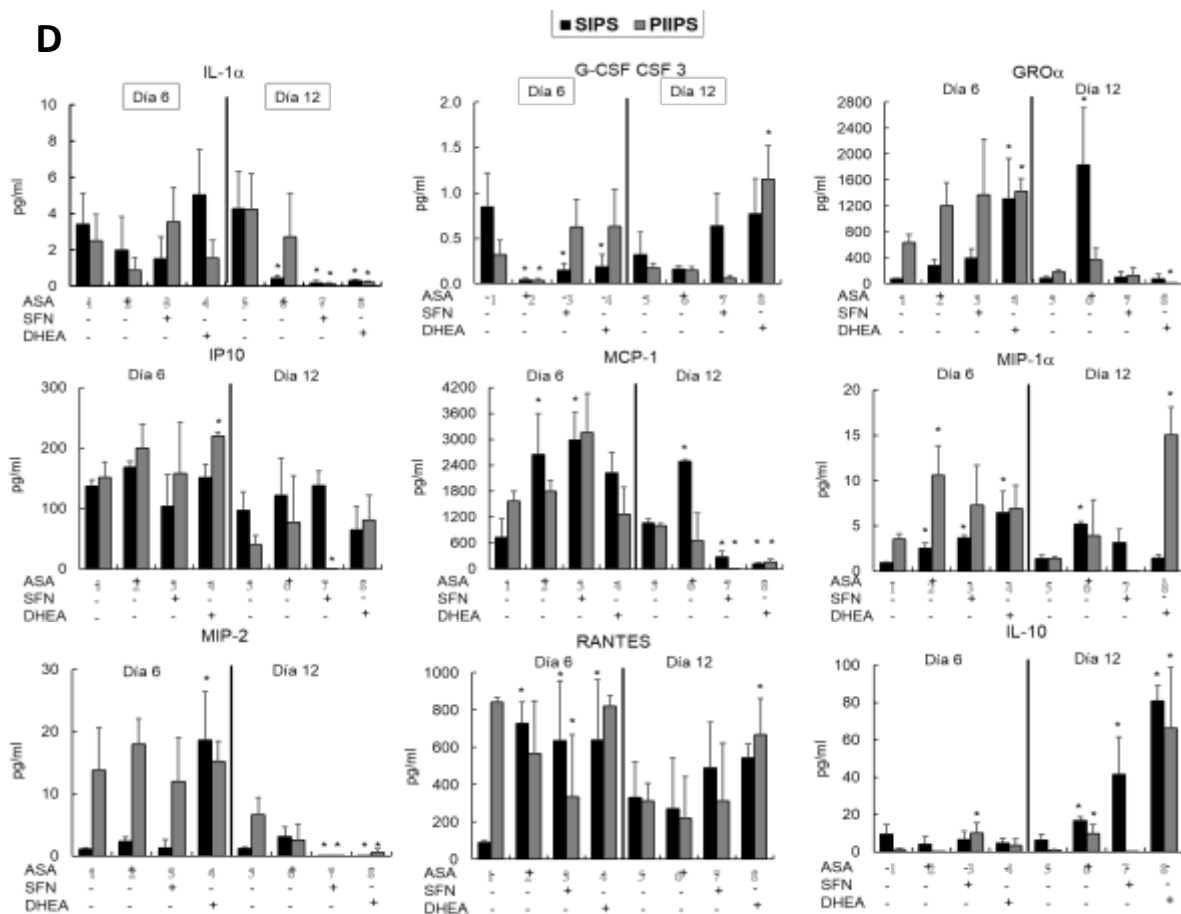


Figura 12. Efecto del ácido acetilsalicílico, dehidroepiandrosterona y sulforafano en el perfil de secreción de astrocitos senescente.

- A. (Página anterior) Perfil global de secreción de astrocitos no senescentes tratados con ASA, DHEA ó SFN durante 6 ó 12 días.
- B. (Página anterior) Perfil global de secreción de astrocitos inducidos a SIPS y tratados con ASA, DHEA ó SFN durante 6 ó 12 días.
- C. (Página anterior) Perfil global de secreción de astrocitos inducidos a PIIPS y tratados con ASA, DHEA ó SFN durante 6 ó 12 días.
- D. (Arriba) Análisis cuantitativo de citocinas seleccionadas de astrocitos inducidos a SIPS o PIIPS y tratados con ASA, DHEA o SFN durante 6 ó 12 días. Se muestran las citocinas en las que se encontraron diferencias significativas en su secreción con respecto al control.

Los datos representan el promedio \pm desviación estándar, $n = 3$, $*p < 0.05$ con respecto al control por la prueba de Tukey-Cramer.

cambio el perfil de secreción de los astrocitos senescentes se sustenta con los bajos valores en los coeficientes de correlación encontrados entre la secreción basal de los astrocitos no senescentes y los tratados con ASA, $r = 0.18$ al día 6 y $r = 0.19$ al día 12.

El SFN también cambio el perfil de secreción de los astrocitos no senescentes al día 12, con un coeficiente de correlación de $r = -0.10$, con respecto a los astrocitos no senescentes sin tratamiento, reduciendo la secreción de $IFN\gamma$, IL-12 e IL-6, pero incrementando la secreción de IL-1 α , eotaxina, IP-10 y RANTES. Sin embargo, al día 12 el coeficiente de correlación con astrocitos no tratados incremento a $r = 0.37$, lo cual sugiere que el efecto del SFN en astrocitos no senescentes se observa principalmente a tiempos cortos. Para el caso de la DHEA, el coeficiente de correlación con los astrocitos no senescentes sin tratamiento se mantuvo en ambos días, $r = 0.34$ al día 6 y $r = 0.36$ al día 12. La DHEA redujo la secreción basal de GM-CSF, IL-12, IL-5 e IL-6 e incrementó únicamente la secreción de G-CSF (CSF3) al día 6. Juntos, estos datos indican que el ASA tiene un mayor impacto que el SFN y la DHEA en la secreción basal de los astrocitos no senescentes.

Por otro lado, los tres fármacos evaluados tuvieron un coeficiente de correlación negativo con respecto a la secreción de astrocitos inducidos a SIPS al día 12 (Figura 12B, Tabla 3) con $r = -0.20$, $r = -0.25$ y $r = -0.07$ para ASA, SFN y DHEA, respectivamente. Estos valores negativos del coeficiente de correlación, aunque son

Tabla 2. Matriz de correlación del perfil de secreción de astrocitos no senescentes vs astrocitos no senescentes tratados con ASA, SFN o DHEA por 6 o 12 días

	No senescentes	NS ASA D6	NS ASA D12	NS SFN D6	NS SFN D12	NS DHEA D6	NS DHEA D12
No senescentes	1						
NS ASA D6	0.185269628	1					
NS ASA D12	0.198924584	-0.166561883	1				
NS SFN D6	-0.105634209	0.454409124	0.060010569	1			
NS SFN D12	0.374650124	0.041457151	0.385894037	-0.194006919	1		
NS DHEA D6	0.348116507	0.050519733	0.229425852	0.139902454	0.329447441	1	
NS DHEA D12	0.369867579	0.133995881	0.387947032	-0.123316163	0.68499336	0.59095432	1

Tabla 3. Matriz de correlación del perfil de secreción de astrocitos no senescentes vs astrocitos inducidos a SIPS tratados con ASA, SFN o DHEA por 6 o 12 días

No senescentes	No senescentes	SIPS D6	SIPS D12	SIPS ASA D6	SIPS ASA D12	SIPS SFN D6	SIPS SFN D12	SIPS DHEA D6	SIPS DHEA D12
No senescentes	1								
SIPS D6	0.31562692	1							
SIPS D12	0.113301772	0.658605845	1						
SIPS ASA D6	0.39562855	0.097914608	0.203242508	1					
SIPS ASA D12	-0.130292417	-0.249490597	-0.209313016	0.342852785	1				
SIPS SFN D6	0.134852423	0.117241834	0.386690707	0.370891025	0.282978647	1			
SIPS SFN D12	0.0573955	0.209018458	-0.255664682	0.085385942	0.222438945	-0.117564888	1		
SIPS DHEA D6	-0.573557564	-0.195932177	-0.021099683	0.066823918	0.412392784	0.341778007	-0.130234469	1	
SIPS DHEA D12	0.005025371	0.204219788	-0.078470471	-0.242133474	-0.147401604	0.10299145	0.670158587	-0.130413391	1

bajos, indican comportamientos opuestos de algunos componentes del SASP; en de un contexto biológico, esto significa que mientras algunos componentes del SASP se encuentran incrementados en astrocitos inducidos a SIPS, decrecen después del tratamiento con los fármacos, y viceversa.

Interesantemente, la secreción de la citocina proinflamatoria IL-1 α disminuyó con los tres tratamientos, mientras que la IL-10, una citocina antiinflamatoria, aumentó su secreción con SFN y DHEA, pero no con ASA. Este dato es importante, ya que la IL-10 es una de las principales reguladoras negativas de las citocinas proinflamatorias. De la misma manera, los tres tratamientos provocaron una disminución en la secreción de diversas quimiocinas, incluyendo la eotaxina, GRO- α , MCP-1, MCP-3, MIP-1a, MIP-2 y RANTES, en al menos uno de los dos tiempos evaluados. Los coeficientes de correlación entre los astrocitos no senescentes y los astrocitos inducidos a SIPS, pero tratados con los fármacos tienen valores muy pequeños e incluso negativos (excepto

Tabla 4. Matriz de correlación del perfil de secreción de astrocitos no senescentes vs astrocitos inducidos a PIIPS tratados con ASA, SFN o DHEA por 6 o 12 días

Non-senescent	Non-senescent	PIIPS D6	PIIPS D12	PIIPS ASA D6	PIIPS ASA D12	PIIPS SFN D6	PIIPS SFN D12	PIIPS DHEA D6	PIIPS DHEA D12
Non-senescent	1								
PIIPS D6	-0.187768622	1							
PIIPS D12	0.157920547	0.234201628	1						
PIIPS ASA D6	-0.341882671	0.560473988	-0.204522547	1					
PIIPS ASA D12	-0.086306904	-0.440674895	0.075173328	-0.21487549	1				
PIIPS SFN D6	-0.812547168	0.227184982	0.01693312	0.377932187	0.274427975	1			
PIIPS SFN D12	0.307740582	-0.226130941	0.162990317	-0.449596639	0.129236172	-0.376884487	1		
PIIPS DHEA D6	-0.194926783	0.739741045	-0.057098573	0.456434526	-0.330890727	0.28869165	-0.504942526	1	
PIIPS DHEA D12	-0.255850585	-0.082239673	-0.189243839	-0.291307732	-0.015204331	-0.047404612	0.139178641	0.122951529	1

para ASA al día 6) indicando que los fármacos cambian el perfil de secreción de los astrocitos inducidos a SIPS, pero no lo dirigen hacia el perfil basal de los astrocitos no senescentes.

En el caso de los astrocitos inducidos a PIIPS (Figura 12C, Tabla 4), se obtuvieron coeficientes de correlación altos al día 6, $r = 0.56$ para ASA y $r = 0.73$ para DHEA, comparados con los astrocitos inducidos a PIIPS. Esto sugiere que los fármacos posiblemente no tienen efecto en la secreción de los astrocitos inducidos a PIIPS a tiempos cortos. Por otro lado, el SFN tuvo un coeficiente de correlación bajo con su contraparte no tratada al día 6, $r = 0.22$, sugiriendo algunos cambios sutiles con respecto a la secreción de los astrocitos inducidos a PIIPS a tiempos cortos. En contraste, al día 12, los tres tratamientos tuvieron coeficientes de correlación bajos, incluso negativos, $r = 0.07$, $r = 0.16$ y $r = -0.18$ para ASA, SFN y DHEA, respectivamente, lo cual sugiere que los tres fármacos tuvieron un efecto en el perfil de secreción de los astrocitos inducidos a PIIPS. Al analizar citocinas particulares, se observa que la secreción de la IL-1 α decreció con los 3 tratamientos, especialmente al día 12. Además, la IL-10 incremento solamente con el tratamiento con DHEA al día 12. Nuevamente, los tratamientos con los fármacos no restauraron el perfil basal de secreción de los astrocitos no senescentes como lo indican los coeficientes de correlación negativos entre el perfil de los astrocitos no senescentes y los astrocitos inducidos a PIIPS y tratados con los fármacos, a excepción del tratamiento con SFN al día 12, que tuvo un coeficiente de correlación de $r = 0.30$.

El análisis cuantitativo de citocinas específicas y quimiocinas después del tratamiento con ASA, SFN y DHEA en los astrocitos inducidos a SIPS y PIIPS confirma las observaciones previas. La Figura 12D muestra las gráficas con las citocinas en las que se observaron los principales cambios con los tratamientos de los fármacos. El efecto más evidente fue el decremento en la secreción de IL-1 α con 12 días de tratamiento y el incremento de la IL-10, también a los 12 días del tratamiento con los fármacos evaluados, lo cual sugiere un cambio en el perfil de secreción, de uno proinflamatorio hacia uno anti-inflamatorio. Algunos otros cambios importantes que se encontraron fue el decremento de la secreción de G-CSF (CSF-3) al día 6 con ASA en ambos tipos de senescencia y el decremento de GRO- α , MCP-1 y MIP2 al día 12 con los tratamientos con SFN y DHEA.

Juntos, estos datos indican que el ASA, el SFN y la DHEA modifican el SASP secretado por astrocitos inducidos a SIPS o PIIPS, pero estos fármacos no son capaces de restaurar los niveles basales de secreción producidos por los astrocitos no senescentes. Además, los tres fármacos evaluados tienen también efectos en la secreción de astrocitos no senescentes.

Efecto del SASP de Astrocitos en el potencial de membrana mitocondrial de neuronas corticales

A pesar de que el SASP encontrado en los astrocitos senescentes fue menos complejo que el SASP clásico reportado en otros modelos, éste conservó su carácter

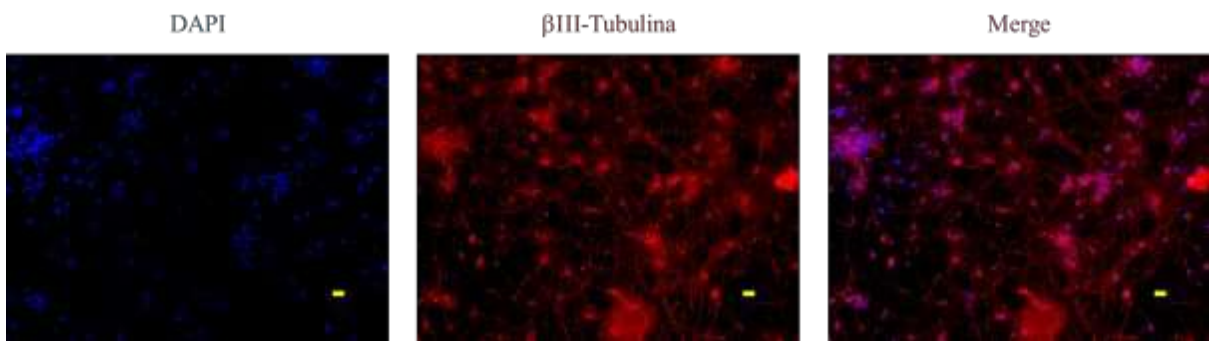
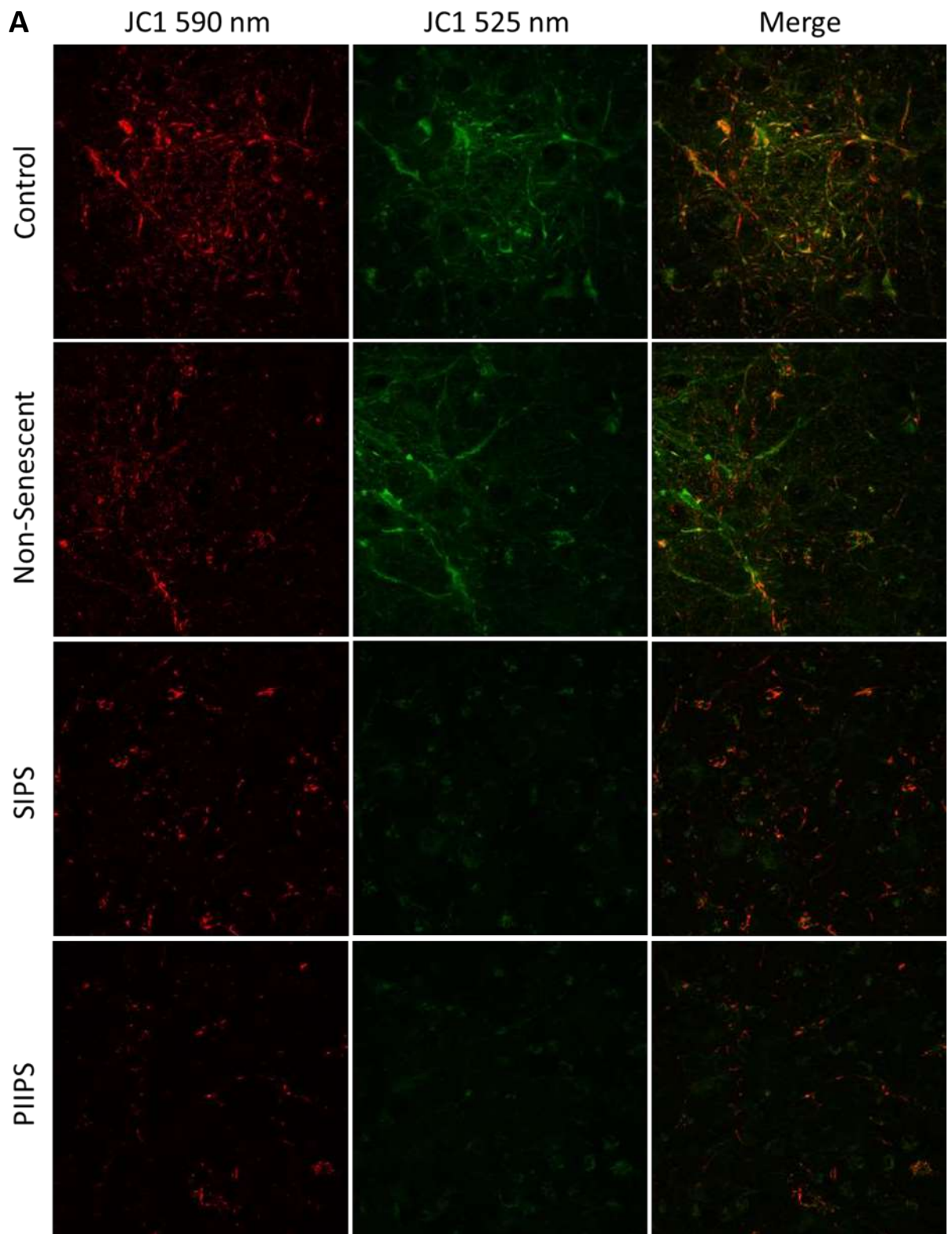


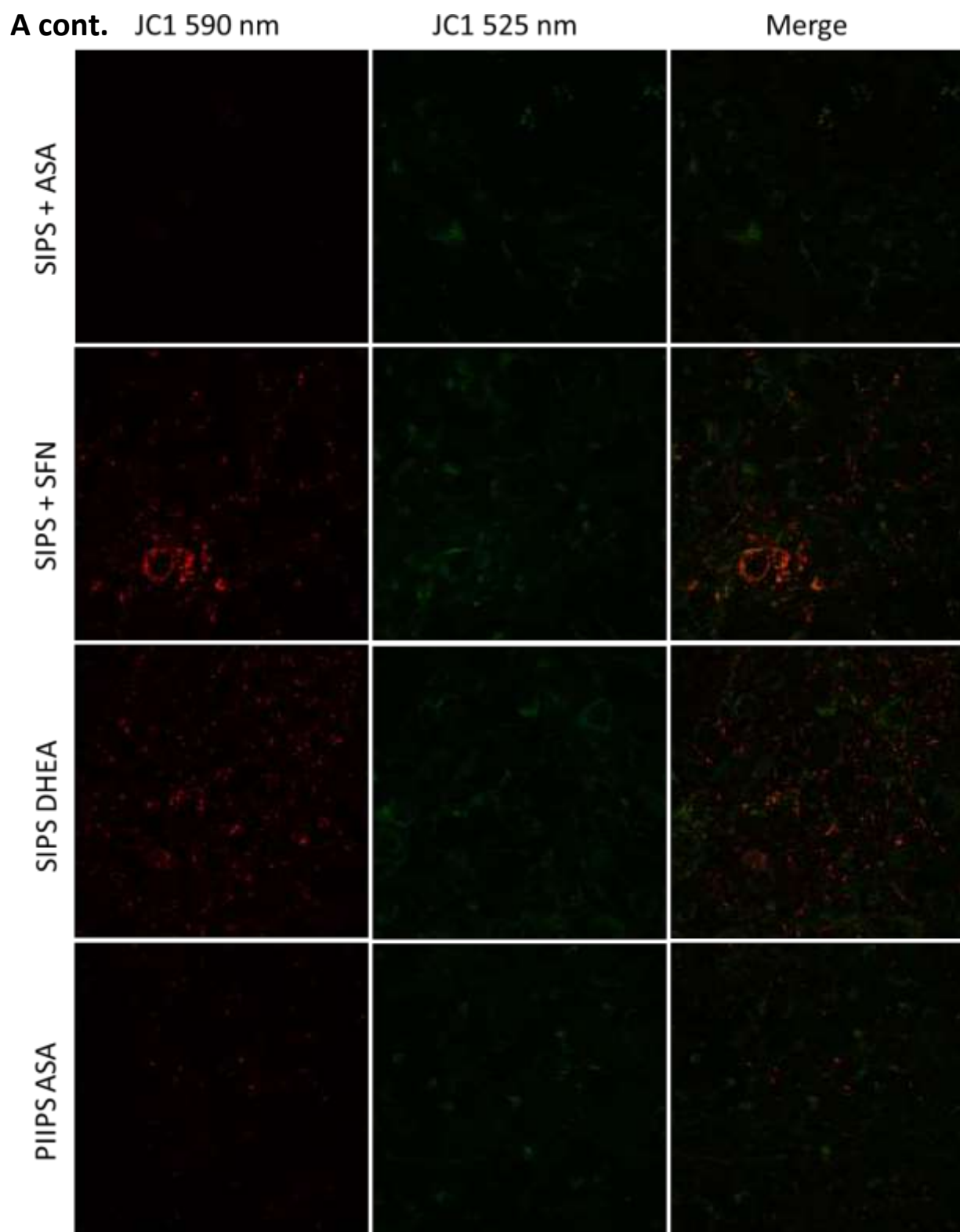
Figura 13. Caracterización del cultivo primario de neuronas corticales

Imágenes representativas de inmunocitoquímicas contra el marcador neuronal β -III Tubulina. Se puede observar que las células fueron positivas al marcador. La marca amarilla corresponde a $100\mu\text{m}$

proinflamatorio, el cual disminuyó con algunos de los tratamientos farmacológicos experimentados. Por lo que decidimos evaluar el efecto que esta secreción podría ejercer sobre un cultivo primario de neuronas corticales. Las neuronas se obtuvieron de embriones de rata Wistar de 17-18 días de gestación. El cultivo primario de neuronas fue caracterizado por inmunocitoquímica utilizando el marcador neuronal Tubulina β -III, la Figura 13 muestra imágenes representativas de dichas inmunocitoquímicas, más del 95% de las células cultivadas fueron positivas al marcador Tubulina β -III, por lo que podemos considerar que el cultivo tuvo un alto grado de pureza. El cultivo primario de neuronas corticales fue tratado con Medio Condicionado (MC) obtenido de astrocitos senescentes o no senescentes que habían sido tratados o no con ASA, SFN o DHEA. El MC provenía de astrocitos con 12 días de cultivo después de la inducción de senescencia. Cada 48 horas se reemplazó un volumen de 150ml del medio neurobasal por 150 ml de MC durante 6 días, (tres reemplazos). El potencial de membrana mitocondrial fue evaluado utilizando el

colorante catiónico JC-1, este potencial suele evaluarse mediante los agregados que forma el colorante en las mitocondrias polarizadas emitiendo una señal a 590nm. En neuronas despolarizadas el colorante no se incorpora a la mitocondria y emite una señal a 535nm. La figura 14A muestra micrografías representativas de las neuronas tratadas y expuestas a JC-1, con rojo se muestra la señal emitida por los agregados que fueron incorporados por las mitocondrias polarizadas y en verde la señal debida al colorante que no fue incorporado. Para conocer la proporción entre las mitocondrias polarizadas y despolarizadas se realizó un cociente entre la intensidad de las señales obtenidas a 590nm y 535 nm (Figura 14B). Interesantemente, no se obtuvieron diferencias significativas en el potencial de neuronas tratadas con el MC proveniente de astrocitos inducidos a SIPS o PIIPS, comparado con el potencial del grupo control (neuronas no expuestas al MC). Esto sugiere que la exposición al SASP de astrocitos en tiempos cortos no produce un efecto inmediato en el potencial de membrana mitocondrial de las neuronas y por lo tanto éstas estarían llevar a cabo sus funciones energéticas de manera normal. Interesantemente, las neuronas que fueron expuestas al MC de astrocitos senescentes, pero tratados con ASA, mostraron un decremento en el cociente 590nm/535nm, indicando una reducción en el potencial de membrana mitocondrial, este efecto debe ser producto de los cambios que produce el ASA en el perfil de secreción de los astrocitos, pero no del SASP en sí mismo. Por otro lado, el MC de astrocitos senescentes tratados con SFN o DHEA mantuvo el potencial de membrana en los mismos valores que el grupo control.





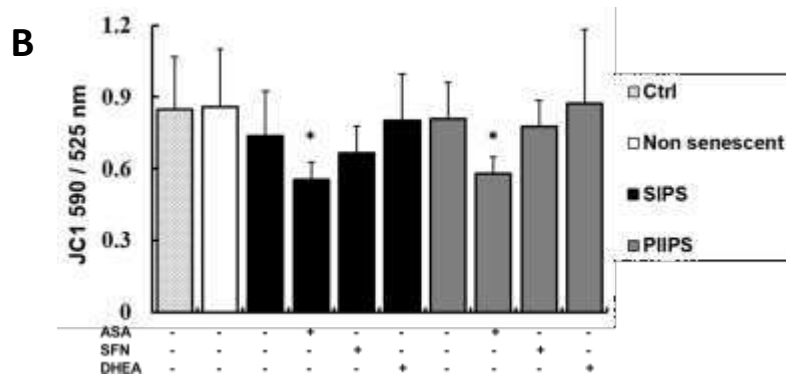
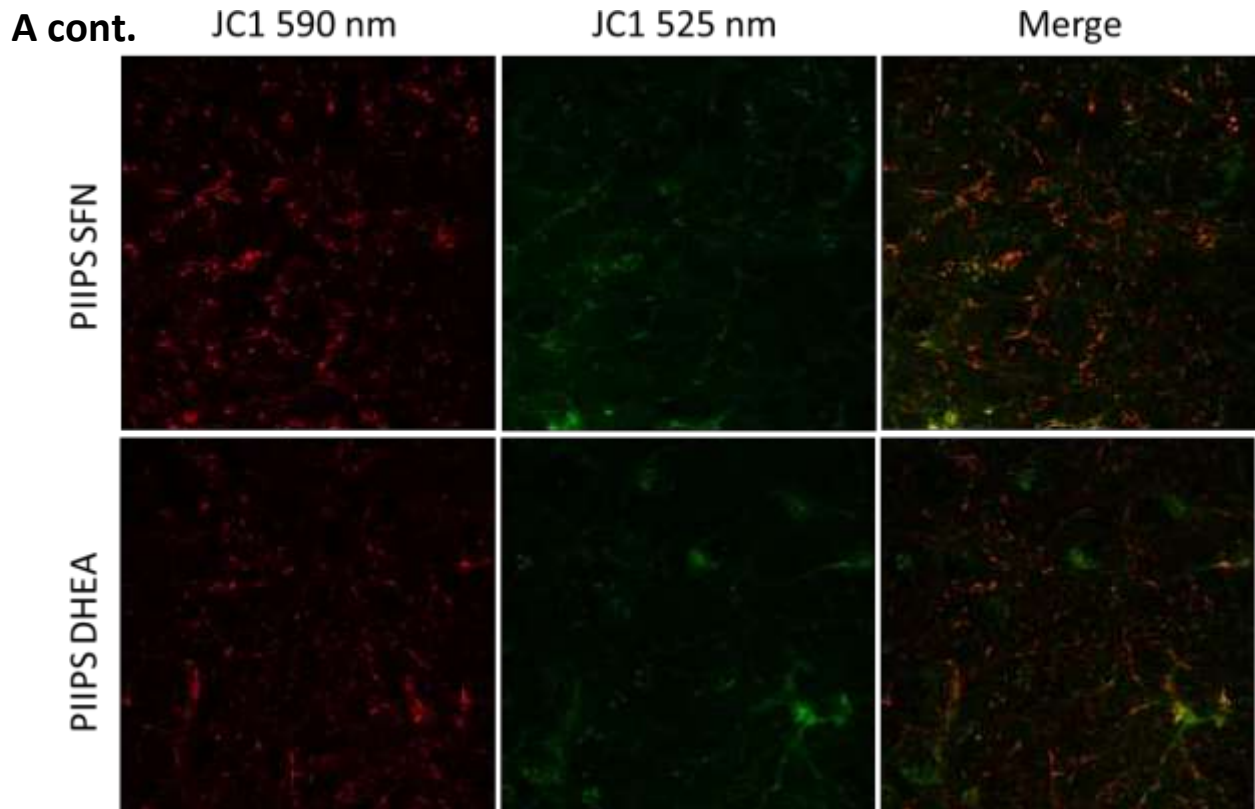


Figura 14. Efecto del SASP de astrocitos senescentes sobre el potencial de membrana de mitocondrias neuronales.

A. Imágenes representativas de inmunocitoquímicas del ensayo de potencial de membrana mitocondrial neuronal sobre neuronas corticales expuestas al medio condicionado de astrocitos senescentes. El canal rojo muestra la señal a 590 nm emitida por el colorante catiónico y corresponde a las mitocondrias polarizadas. El canal verde muestra la señal a 525 nm y corresponde al colorante que no fue incorporado por las mitocondrias y se asocia a la despolarización mitocondrial.

B. Cociente de la señal a 590nm y a 525nm del colorante catiónico JC1.

Las barras representan el promedio \pm desviación estándar, $n = 3$, $*p < 0.05$ con respecto al control por la prueba de Tukey-Cramer.

Discusión

La SC es reconocida como un marcador importante en el envejecimiento, la acumulación de células senescentes en organismos envejecidos es un hecho que ha sido demostrado en diversos trabajos. La SC puede ser inducida por diversos estímulos y en diversos tipos celulares. En este trabajo de investigación, nosotros indujimos senescencia prematura al exponer a un cultivo primario de astrocitos de rata a una dosis subletal de H₂O₂ para inducir SIPS y al inhibir de manera parcial al proteosoma utilizando el inhibidor químico epoxomicina para inducir PIIPS. Estos dos modelos de senescencia prematura ya han sido estudiados con anterioridad en fibroblastos (62,95) y astrocitos (13) de diferentes especies. Aun cuando los astrocitos inducidos a SIPS o PIIPS comparten la mayoría de los marcadores clásicos de senescencia (Figuras 5-8): Detención de la proliferación, tinción de SA-β-galactosidasa, sobreexpresión de p16 y presencia de foci de γH2AX, se observó una notoria diferencia en la morfología de los astrocitos inducidos a SIPS o PIIPS, mientras que los astrocitos inducidos a SIPS adoptaron una forma aplanada y alargada, los astrocitos inducidos a PIIPS mostraron una forma estelar (Figura 6B). Resultados similares han sido reportados en otros estudios en los que se ha comparado la SIPS y la PIIPS (13,95), en los que tanto fibroblastos como astrocitos inducidos a senescencia por inhibición del proteosoma no adoptan la clásica morfología aplanada de una célula inducida a senescencia por estrés oxidante. Aunque son pocos los estudios concernientes a la PIIPS, estos datos sugieren que estos dos tipos de senescencia prematura deben tener distintos mecanismos para establecer la senescencia celular y,

como consecuencia, distintos mecanismos de comunicación celular a través del SASP como nosotros reportamos en un trabajo previo (62).

La secreción del SASP ha sido propuesta como un mecanismo por el cual las células senescentes promueven distintos procesos biológicos en diversos estados de la vida de un organismo. El SASP exhibe efectos benéficos tales como remodelación de tejidos, cicatrización, atracción de células del sistema inmune y supresión de cáncer a través del reforzamiento de la senescencia. En contraparte, estos mismos efectos pueden considerarse deletéreos dependiendo del contexto, por ejemplo, se ha observado que el SASP también puede inducir proliferación en células cancerosas, angiogénesis en tumores y contribuye al deterioro de los tejidos en el proceso de envejecimiento (64). Aun cuando el SASP mantiene un perfil proinflamatorio, la secreción de componentes individuales puede variar dependiendo de diversos factores: el tipo de inducción de senescencia (62,102), el tiempo en que se evalúe después de haber inducido la senescencia (22) e incluso la presencia o ausencia de algún otro marcador de senescencia (23); esto hace al SASP una característica sumamente compleja. Aquí, nosotros encontramos que el SASP de astrocitos de rata Wistar contrasta con el perfil típico encontrado en fibroblastos y células epiteliales. Uno de nuestros resultados más interesantes fue la baja concentración de IL-6 encontrada en el SASP, debido a que esta citocina es uno de los componentes más conservados en el SASP y está asociada a inflamación. En nuestro trabajo, la IL-6 fue secretada en concentraciones similares tanto en células no senescentes como en células senescentes (Figuras 9 y 10). Sin embargo, cuando comparamos la secreción de IL-6

entre astrocitos y fibroblastos senescentes, estos últimos tuvieron niveles de secreción 8 veces más alto, confirmando que los astrocitos senescentes de rata Wistar no incrementan la secreción de esta citocina. Aunque se esperaba que la IL-6 fuese un componente importante en el SASP de nuestros astrocitos, como se ha observado anteriormente (12), ha habido otros trabajos en los cuales la IL-6 no ha incrementado significativamente tanto en astrocitos (18) como en otros tipos celulares (44). Incluso, Purcell y cols. compararon los perfiles de expresión en fibroblastos de un paciente con el Síndrome Li-Fraumeni inducidos a distintos tipos de senescencia: Senescencia replicativa, senescencia inducida por Adriamicina, por estrés oxidante y por 5-aza-2-desoxicitidina y no encontraron una sobreexpresión homogénea de IL-6 en todos los grupos (84). Por consiguiente, la IL-6 puede estar presente en el SASP de algunas células senescentes, pero no de otras; este es un punto importante porque la sobreexpresión de esta citocina podría depender el tipo celular o de la forma en que se induzca la senescencia. Consideramos que se requieren más estudios sobre los mecanismos moleculares que controlan el SASP para determinar en qué condiciones el SASP incluye o no a la IL-6.

En contraste, la IL-1 α fue altamente secretada en los astrocitos senescentes. En otros estudios se ha observado que esta citocina es un componente importante del SASP en distintos tipos de senescencia celular: senescencia replicativa (51), senescencia inducida por oncogenes (OIS) (1) o senescencia inducida por agentes químicos, como la bleomicina (79), H₂O₂ o adriamicina (84) y fármacos de terapia retroviral contra el VIH (18). Es bien sabido que esta citocina es secretada poco tiempo después de que

se induce senescencia y una de sus funciones es inducir la expresión de otros componentes del SASP en un mecanismo redox-dependiente (66). Con esto, nosotros proponemos a la IL-1 α como uno de los componentes principales y marcador del SASP de astrocitos de rata, en lugar de la IL-6.

Interesantemente, uno de los factores de crecimiento que incrementó en el SASP fue G-CSF (CSF-3) (Figuras 9A y 9B). En el SNC, se ha reportado que G-CSF (CSF-3) actúa como un factor neurotrófico al inducir neurogénesis, incrementar la neuroplasticidad y contrarrestar la apoptosis (81,90). El hecho de que este factor se encuentre aumentado en el SASP de astrocitos podría sugerir una acción protectora para las neuronas.

Por otro lado, el SASP de los astrocitos incluyó principalmente las quimiocinas GRO α , IP-10, MCP-1 α , MIP-2 y RANTES (Figuras 9A y 9B). Las quimiocinas son moléculas cuya función es atraer a las células del sistema inmune para eliminar patógenos o células dañadas. GRO α ha sido reportado como un factor atrayente de oligodendrocitos en el SNC (78), IP-10 atrae monocitos, macrófagos, células T, NK y dendríticas; además se ha reportado que puede tener actividad antitumoral e inhibitoria de angiogénesis (5,36). MCP-1 regula la migración e infiltración de monocitos teniendo una acción redundante con IP-10. Adicionalmente, la secreción de MCP-1 se ha asociado con algunas enfermedades tales como esclerosis múltiple, cáncer o enfermedades cardiovasculares (31). Del mismo modo, aunque MIP-1 α , MIP-2 y RANTES son potentes quimio-atrayentes, también se han asociado con enfermedades e inflamación crónica (41), y, en contraparte, que pueden suprimir la

actividad del VIH (42,103). Los resultados obtenidos y lo reportado en la literatura acerca de las actividades que llevan a cabo las citocinas aquí analizadas nos sugieren que el SASP de astrocitos podría tener como principal función la atracción de células fagocíticas, como macrófagos y microglía, para eliminar células senescentes, como se ha hipotetizado por otros autores, y que los posibles efectos deletéreos del SASP dependerían de la capacidad del sistema inmune de eliminar o no a las células senescentes.

En un trabajo previo, nuestro grupo de trabajo reportó que fibroblastos inducidos a SIPS, PIIPS o SR producen un perfil del SASP distinto (62). Los fibroblastos inducidos a PIIPS produjeron un SASP menos robusto que los inducidos a SIPS o SR; sin embargo, esas mediciones se realizaron únicamente 6 días después de inducir senescencia prematura. Aquí, nosotros encontramos diferencias en el perfil de secreción del SASP de astrocitos entre SIPS y PIIPS a los días 6 y 12. El SASP de los astrocitos inducidos a PIIPS incluyó quimiocinas como $GRO\alpha$, $MIP-1\alpha$, $MIP-2$ y $RANTES$, mientras que estas quimiocinas estuvieron ausentes en el SASP de astrocitos inducidos a SIPS, al menos al día 6 de estudio. Sin embargo, al día 12 los perfiles de secreción entre SIPS y PIIPS fueron más parecidos entre sí, como se observa en la matriz de correlación de la Tabla 1. Así, es posible que las diferencias en el perfil del SASP entre distintos tipos de senescencia puedan ser más evidentes a tiempos cortos después de la inducción, dependiendo de las vías de señalización que se activen de manera particular en cada tipo de senescencia, pero, cuando la senescencia celular está totalmente establecida, las vías de señalización que controlan

el SASP podrían hacerlo converger hacia un perfil común. La variación dependiente del tiempo del SASP ha sido discutida por el grupo de Rodier (64), pero las variaciones en el SASP en función de los estímulos que induzcan senescencia han sido poco estudiadas hasta ahora.

Uno de los principales retos en el campo de la senescencia es suprimir o eliminar los efectos deletéreos causados por el SASP (64). Este objetivo se ha enfocado en dos líneas principales: 1) Eliminando a las células senescentes o 2) inhibiendo (o reduciendo) o modulando la secreción del SASP sin eliminar a las células senescentes. Ambas líneas han logrado resultados prometedores, sin embargo, la ausencia de un marcador único y universal de senescencia limita estos hallazgos y sus aplicaciones. Más aún, no está aún claro en qué momento de la vida de un organismo es más seguro o recomendable realizar estas intervenciones. En este trabajo, nosotros evaluamos tres fármacos, ASA, SFN y DHEA, que en la actualidad son consumidos por las personas sin control o prescripción médica y que han sido asociados con efectos anti-inflamatorios o anti-vejez. De manera interesante, estos fármacos tuvieron efecto en el perfil de secreción tanto de células senescentes como de no senescentes (Figura 12). El SFN y la DHEA redujeron la secreción de algunas citocinas proinflamatorias que se secretaban en células no senescentes, mientras que el ASA aumento dicha secreción. Por otro lado, tanto en SIPS como en PIIPS, el SFN y la DHEA incrementaron la secreción de la citocina anti-inflamatoria IL-10, efecto que no fue observado con el ASA. El ASA mostró un efecto inesperado en las células no senescentes, incrementando la secreción de las quimiocinas eotaxina y RANTES al

día 6 y también la de las citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-13, IL-2, IL-4 y TNF- α al día 12. El ASA tuvo también un efecto distinto en la secreción de las células inducidas a SIPS, comparadas con las inducidas a PIIPS; por ejemplo, el SASP de las células inducidas a SIPS y tratadas con ASA secretaron menos IL-1 α , pero las inducidas a PIIPS no, sugiriendo una respuesta distinta al tratamiento en ambos tipos de senescencia. Se sabe que el efecto anti-inflamatorio del ASA depende de la inhibición de la enzima COX2, la cual previene la expresión de prostaglandinas. En astrocitos, la expresión de COX2 no es homogénea y puede ser modulada por TGF- β (46) e IL-1 β (70), por lo que una posible explicación es que los astrocitos senescentes podrían no estar expresando COX2 de forma constitutiva y como consecuencia el ASA no sería capaz de inducir su efecto anti-inflamatorio. Al mismo tiempo, podría ser posible que alguna otra vía proinflamatoria, como las reguladas por p38MAPK o NF κ B podrían estar activadas para producir las citocinas proinflamatorias en los astrocitos senescentes y que el ASA no tenga un efecto sobre éstas.

En contraparte, el SFN y la DHEA redujeron la secreción de las citocinas que se secretaron mayoritariamente en los astrocitos no senescentes, GM-CSF, IL-12, IL-5, IL-6 y MCP-3, especialmente al día 12, promoviendo un perfil antiinflamatorio. Interesantemente, en los astrocitos inducidos a SIPS y a PIIPS el SFN y la DHEA incrementaron la secreción de la IL-10 al tiempo que redujeron la de IL-1 α cambiando el perfil del SASP hacia un perfil menos inflamatorio. Sin embargo, tanto el SFN como la DHEA incrementaron la secreción de otras quimiocinas, tales como eotaxina, GRO-

α , MIP-1 α y RANTES, reforzando las señales para atraer a las células del sistema inmune.

Se ha reportado que la producción del SASP está mediada por la acción de la IL-1 α en un mecanismo redox dependiente (66) y ya que el SFN es capaz de modificar el estado redox (75), esta molécula podría ser capaz de prevenir la secreción de los componentes del SASP dependientes de IL-1 α . Además, la acción del SFN podría tener un impacto en otras vías de señalización, también moduladas por el estado redox, involucradas en la producción de citocinas, tales como la vía de NF- κ B y NLRP3, las cuales están directamente involucradas en la producción de IL-1 α (35). Por otro lado, se ha reportado un efecto anti-inflamatorio de la DHEA en distintos modelos y condiciones (88). Por ejemplo, la DHEA puede controlar el balance entre las poblaciones de linfocitos Th1 y Th2 (83), modular la inflamación inducida en un modelo de fractura bilateral del eje femoral (59) y regular la producción de IL-2, IL-10, IL-1 β , IL-6 y TNF α (59), sin embargo el mecanismo de acción por el que actuaría ha sido poco estudiado y no se sabe si es la DHEA la que tiene este efecto o alguno de sus metabolitos (37). Independientemente del metabolito que lleve a cabo la acción anti-inflamatoria, existe consenso de que el tratamiento con la DHEA reduce las citocinas reguladas por p38MAPK y NF κ B tales como la IL-6 y la IL-8 (88). Así pues, es posible que la DHEA ejerza su efecto anti-inflamatorio inhibiendo p38MAPK y NF κ B. Es importante notar que en las células senescentes ni el SFN ni la DHEA restauraron el perfil de secreción original de los astrocitos no senescentes, pero si consiguieron cambiar el perfil hacia uno menos inflamatorio, principalmente al disminuir la secreción

de la IL-1 α e incrementar el de la IL-10. Este efecto podría tener un efecto fisiológico importante al disminuir los efectos proinflamatorios del SASP, del cual se ha hipotetizado que contribuye a la neurodegeneración (12). Además, la producción de quimiocinas se conservó en los astrocitos senescentes tratados con SFN o DHEA, extrapolando este resultado al nivel fisiológico, los astrocitos senescentes podrían mantener la función de promover la infiltración de células del sistema inmune aún con el SASP modulado.

La mayoría de los estudios diseñados para evaluar el efecto del SASP en células del mismo microambiente se han diseñado en fibroblastos o células endoteliales, por lo que los ensayos más comunes están enfocados en evaluar si inducen la proliferación celular, migración o inducción de senescencia. Sin embargo, al evaluar el efecto sobre las neuronas algunos de estos parámetros resultan irrelevantes. Nosotros decidimos evaluar la función mitocondrial, particularmente el potencial de membrana mitocondrial, como un primer acercamiento a la fisiología de la neurona al ser expuesta al SASP de astrocitos senescentes (Figura 14). En nuestros experimentos no encontramos diferencias significativas en ninguno de los grupos estudiados, a excepción de los grupos tratados con ASA, donde el potencial de membrana decreció. Como se mencionó antes, el ASA incrementó la producción de factores proinflamatorios cuando se compararon con el control y el resto de los tratamientos, sugiriendo que los cambios en el SASP inducidos por el ASA pudieron haber tenido un efecto en la función mitocondrial de las neuronas. El hecho de que el SASP de astrocitos senescentes no haya tenido efectos sobre el potencial de membrana no

descarta que pueda jugar un papel deletéreo *in vivo*, ya que los experimentos aquí diseñados abarcan solamente una ventana de tiempo corta (6 días de exposición al SASP) y es posible que, por la acumulación de células senescentes en el envejecimiento, el SASP de los astrocitos puedan tener un efecto deletéreo sobre las neuronas al exponerlas de forma crónica a éste. Además, es importante que a futuro se diseñen experimentos que puedan evaluar otros parámetros fisiológicos que puedan ser afectados por el SASP sobre las neuronas, tales como generación de ERO, la respuesta excitatoria de las neuronas o su metabolismo; además de diseñar experimentos en co-cultivo para someter a las neuronas a una exposición constante al SASP de astrocitos.

Conclusiones y perspectivas

Desde su descubrimiento, en la década de los 1960's, el estudio de la senescencia celular ha ido cobrando relevancia como un tema central relacionado tanto al envejecimiento como a las enfermedades asociadas a la edad. Hoy en día, sabemos sobre su contribución a enfermedades asociadas a la edad y al proceso de envejecimiento en sí mismo. En este trabajo, obtuvimos 2 resultados importantes: 1) Demostramos que el perfil de secreción de astrocitos senescentes es distinto al perfil clásico que se ha estudiado en otros tipos celulares y 2) aportamos datos sobre el efecto que pueden tener 3 fármacos, que hoy en día se comercializan, sobre el perfil de secreción de astrocitos senescentes. Estos datos sugieren, que cada tipo celular podría tener un perfil de secreción que pueda inducir actividades acordes a su

microambiente y que ese perfil de secreción podría ser manipulado, inhibido o modulado para reducir las actividades deletéreas inducidas por el SASP.

Aunque existe gran evidencia de que la eliminación de las células senescentes retrasa el envejecimiento y la aparición de enfermedades crónicas, consideramos que es importante entender mejor el papel fisiológico que juegan las células senescentes dentro del organismo para poder elegir el momento idóneo en el que se pueda realizar una intervención de eliminación o control de la secreción de las células senescentes sin afectar los aspectos benéficos de la senescencia. Un aspecto importante a estudiar debe ser el descubrir la razón por la que el sistema inmunológico deja de eliminar a las células senescentes, el hecho de entender si es el sistema inmune quien se vuelve incapaz de reconocer y eliminar a las células senescentes o, en contraparte, son las células senescentes las que sufren cambios en las proteínas que expresan en su membrana que imposibilita al sistema inmunológico a eliminarlas, ¿a partir de qué momento ocurriría?, ¿ocurre al mismo tiempo en todos los tejidos?, ¿en algún tejido comienzan a acumularse las células senescentes antes que en otros?. Diversos investigadores están hoy en día estudiando algunos de estos aspectos, por lo que estos nuevos conocimientos que se generen en un futuro junto con los concernientes a otros aspectos importantes sobre el envejecimiento contribuirán en un futuro, esperemos que no muy lejano, a alcanzar un envejecimiento más saludable.

Referencias

1. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, Athineos D, Kang TW, Lasitschka F, Andrulis M, Pascual G, Morris KJ, Khan S, Jin H, Dharmalingam G, Snijders AP, Carroll T, Capper D, Pritchard C, Inman GJ, Longerich T, Sansom OJ, Benitah SA, Zender L, Gil J. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* 15: 978-90, 2013.
2. Alexander E, Hildebrand DG, Kriebs A, Obermayer K, Manz M, Rothfuss O, Schulze-Osthoff K, Essmann F. IkappaBzeta is a regulator of the senescence-associated secretory phenotype in DNA damage- and oncogene-induced senescence. *J Cell Sci* 126: 3738-45, 2013.
3. Alimbetov D, Davis T, Brook AJ, Cox LS, Faragher RG, Nurgozhin T, Zhumadilov Z, Kipling D. Suppression of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in human fibroblasts using small molecule inhibitors of p38 MAP kinase and MK2. *Biogerontology* 17: 305-15, 2016.
4. Amann R, Peskar BA. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. *Eur J Pharmacol* 447: 1-9, 2002.
5. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 182: 155-62, 1995.
6. Aramillo Irizar P, Schauble S, Esser D, Groth M, Frahm C, Priebe S, Baumgart M, Hartmann N, Marthandan S, Menzel U, Muller J, Schmidt S, Ast V, Caliebe A, Konig R, Krawczak M, Ristow M, Schuster S, Cellerino A, Diekmann S, Englert C, Hemmerich P, Suhnel J, Guthke R, Witte OW, Platzer M, Ruppin E, Kaleta C. Transcriptomic alterations during ageing reflect the shift from cancer to degenerative diseases in the elderly. *Nat Commun* 9: 327, 2018.
7. Astle MV, Hannan KM, Ng PY, Lee RS, George AJ, Hsu AK, Haupt Y, Hannan RD, Pearson RB. AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the

- absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene* 31: 1949-62, 2012.
8. Baar MP, Brandt RMC, Putavet DA, Klein JDD, Derks KWJ, Bourgeois BRM, Stryeck S, Rijksen Y, van Willigenburg H, Feijtel DA, van der Pluijm I, Essers J, van Cappellen WA, van IWF, Houtsmuller AB, Pothof J, de Bruin RWF, Madl T, Hoeijmakers JHJ, Campisi J, de Keizer PLJ. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* 169: 132-147 e16, 2017.
 9. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, Saltness RA, Jeganathan KB, Verzosa GC, Pezeshki A, Khazaie K, Miller JD, van Deursen JM. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530: 184-9, 2016.
 10. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479: 232-6, 2011.
 11. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 22: 4212-22, 2003.
 12. Bhat R, Crowe EP, Bitto A, Moh M, Katsetos CD, Garcia FU, Johnson FB, Trojanowski JQ, Sell C, Torres C. Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One* 7: e45069, 2012.
 13. Bitto A, Sell C, Crowe E, Lorenzini A, Malaguti M, Hrelia S, Torres C. Stress-induced senescence in human and rodent astrocytes. *Exp Cell Res* 316: 2961-8, 2010.
 14. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 35: 567-76, 1993.
 15. Burch JB, Augustine AD, Frieden LA, Hadley E, Howcroft TK, Johnson R, Khalsa PS, Kohanski RA, Li XL, Macchiarini F, Niederehe G, Oh YS, Pawlyk AC, Rodriguez H, Rowland JH, Shen GL, Sierra F, Wise BC. Advances in geroscience:

- impact on healthspan and chronic disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69 Suppl 1: S1-3, 2014.
16. 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* 562: 578-582, 2018.
 17. Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, Melov S. Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol* 21: 354-9, 2011.
 18. Cohen J, D'Agostino L, Wilson J, Tuzer F, Torres C. Astrocyte Senescence and Metabolic Changes in Response to HIV Antiretroviral Therapy Drugs. *Front Aging Neurosci* 9: 281, 2017.
 19. CONAPO MCNDP. *Envejecimiento de la población de México: Reto del siglo XXI* México: México: CONAPO; 2004.
 20. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 5: 99-118, 2010.
 21. Coppe JP, Kauser K, Campisi J, Beausejour CM. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem* 281: 29568-74, 2006.
 22. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 6: 2853-68, 2008.
 23. Coppe JP, Rodier F, Patil CK, Freund A, Desprez PY, Campisi J. Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J Biol Chem* 286: 36396-403, 2011.
 24. Crowe EP, Tuzer F, Gregory BD, Donahue G, Gosai SJ, Cohen J, Leung YY, Yetkin E, Nativio R, Wang LS, Sell C, Bonini NM, Berger SL, Johnson FB, Torres C. Changes in the Transcriptome of Human Astrocytes Accompanying Oxidative Stress-Induced Senescence. *Front Aging Neurosci* 8: 208, 2016.

25. Chan CC, Liou CJ, Xu PY, Shen JJ, Kuo ML, Len WB, Chang LE, Huang WC. Effect of dehydroepiandrosterone on atopic dermatitis-like skin lesions induced by 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in mouse. *J Dermatol Sci* 72: 149-57, 2013.
26. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436: 725-30, 2005.
27. Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, Campisi J, van Deursen JM. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep* 15: 1139-53, 2014.
28. Chinta SJ, Woods G, Demaria M, Rane A, Zou Y, McQuade A, Rajagopalan S, Limbad C, Madden DT, Campisi J, Andersen JK. Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. *Cell Rep* 22: 930-940, 2018.
29. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426: 194-8, 2003.
30. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, Laberge RM, Vijg J, Van Steeg H, Dolle ME, Hoeijmakers JH, de Bruin A, Hara E, Campisi J. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* 31: 722-33, 2014.
31. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 29: 313-26, 2009.
32. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre M, Nuciforo PG, Bensimon A, Maestro R, Pelicci PG, d'Adda di Fagagna F. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444: 638-42, 2006.
33. Dimri GP, Itahana K, Acosta M, Campisi J. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 20: 273-85, 2000.

34. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9363-7, 1995.
35. Dong Z, Shang H, Chen YQ, Pan LL, Bhatia M, Sun J. Sulforaphane Protects Pancreatic Acinar Cell Injury by Modulating Nrf2-Mediated Oxidative Stress and NLRP3 Inflammatory Pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 7864150, 2016.
36. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol* 168: 3195-204, 2002.
37. El Kihel L. Oxidative metabolism of dehydroepiandrosterone (DHEA) and biologically active oxygenated metabolites of DHEA and epiandrosterone (EpiA)--recent reports. *Steroids* 77: 10-26, 2012.
38. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7: 606-19, 2006.
39. Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* 16: 238-46, 2010.
40. Freund A, Patil CK, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J* 30: 1536-48, 2011.
41. Gadani SP, Walsh JT, Lukens JR, Kipnis J. Dealing with Danger in the CNS: The Response of the Immune System to Injury. *Neuron* 87: 47-62, 2015.
42. Gaertner H, Lebeau O, Borlat I, Cerini F, Dufour B, Kuenzi G, Melotti A, Fish RJ, Offord R, Springael JY, Parmentier M, Hartley O. Highly potent HIV inhibition: engineering a key anti-HIV structure from PSC-RANTES into MIP-1 beta/CCL4. *Protein Eng Des Sel* 21: 65-72, 2008.
43. Giorgi C, Agnoletto C, Baldini C, Bononi A, Bonora M, Marchi S, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Zavan B, Pinton P. Redox control of protein kinase C: cell- and disease-specific aspects. *Antioxid Redox Signal* 13: 1051-85, 2010.

44. Gonzalez-Meljem JM, Haston S, Carreno G, Apps JR, Pozzi S, Stache C, Kaushal G, Virasami A, Panousopoulos L, Neda Mousavy-Gharavy S, Guerrero A, Rashid M, Jani N, Goding CR, Jacques TS, Adams DJ, Gil J, Andoniadou CL, Martinez-Barbera JP. Stem cell senescence drives age-attenuated induction of pituitary tumours in mouse models of paediatric craniopharyngioma. *Nat Commun* 8: 1819, 2017.
45. Gorg B, Karababa A, Shafigullina A, Bidmon HJ, Haussinger D. Ammonia-induced senescence in cultured rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. *Glia* 63: 37-50, 2015.
46. Hamby ME, Hewett JA, Hewett SJ. TGF-beta1 reduces the heterogeneity of astrocytic cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 gene expression in a stimulus-independent manner. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 85: 115-24, 2008.
47. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621, 1961.
48. He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. *Cell* 169: 1000-1011, 2017.
49. Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM. Cellular senescence in aging primates. *Science* 311: 1257, 2006.
50. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol* 28: 436-453, 2018.
51. Hubackova S, Krejcikova K, Bartek J, Hodny Z. IL1- and TGFbeta-Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine 'bystander senescence'. *Aging (Albany NY)* 4: 932-51, 2012.
52. Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* 5: 1-10, 2004.
53. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461: 1071-8, 2009.

54. Jeon OH, Kim C, Laberge RM, Demaria M, Rathod S, Vasserot AP, Chung JW, Kim DH, Poon Y, David N, Baker DJ, van Deursen JM, Campisi J, Elisseeff JH. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat Med* 23: 775-781, 2017.
55. Kang TW, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, Hohmeyer A, Gereke M, Rudalska R, Potapova A, Iken M, Vucur M, Weiss S, Heikenwalder M, Khan S, Gil J, Bruder D, Manns M, Schirmacher P, Tacke F, Ott M, Luedde T, Longerich T, Kubicka S, Zender L. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 479: 547-51, 2011.
56. Kolesnichenko M, Hong L, Liao R, Vogt PK, Sun P. Attenuation of TORC1 signaling delays replicative and oncogenic RAS-induced senescence. *Cell Cycle* 11: 2391-401, 2012.
57. Laberge RM, Zhou L, Sarantos MR, Rodier F, Freund A, de Keizer PL, Liu S, Demaria M, Cong YS, Kapahi P, Desprez PY, Hughes RE, Campisi J. Glucocorticoids suppress selected components of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging Cell* 11: 569-78, 2012.
58. Li C, Chai Y, Wang L, Gao B, Chen H, Gao P, Zhou FQ, Luo X, Crane JL, Yu B, Cao X, Wan M. Programmed cell senescence in skeleton during late puberty. *Nat Commun* 8: 1312, 2017.
59. Lichte P, Pfeifer R, Werner BE, Ewers P, Tohidnezhad M, Pufe T, Hildebrand F, Pape HC, Kobbe P. Dehydroepiandrosterone modulates the inflammatory response in a bilateral femoral shaft fracture model. *Eur J Med Res* 19: 27, 2014.
60. Loaiza N, Demaria M. Cellular senescence and tumor promotion: Is aging the key? *Biochim Biophys Acta* 1865: 155-67, 2016.
61. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 153: 1194-217, 2013.
62. Maciel-Baron LA, Morales-Rosales SL, Aquino-Cruz AA, Triana-Martinez F, Galvan-Arzate S, Luna-Lopez A, Gonzalez-Puertos VY, Lopez-Diazguerrero NE, Torres C, Konigsberg M. Senescence associated secretory phenotype profile from

- primary lung mice fibroblasts depends on the senescence induction stimuli. *Age (Dordr)* 38: 26, 2016.
63. Malaquin N, Carrier-Leclerc A, Dessureault M, Rodier F. DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Front Genet* 6: 94, 2015.
 64. Malaquin N, Martinez A, Rodier F. Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp Gerontol* 82: 39-49, 2016.
 65. Matjusaitis M, Chin G, Sarnoski EA, Stolzing A. Biomarkers to identify and isolate senescent cells. *Ageing Res Rev* 29: 1-12, 2016.
 66. McCarthy DA, Clark RR, Bartling TR, Trebak M, Melendez JA. Redox control of the senescence regulator interleukin-1alpha and the secretory phenotype. *J Biol Chem* 288: 32149-59, 2013.
 67. McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85: 890-902, 1980.
 68. Miyauchi H, Minamino T, Tateno K, Kunieda T, Toko H, Komuro I. Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *EMBO J* 23: 212-20, 2004.
 69. Moiseeva O, Deschenes-Simard X, St-Germain E, Igelmann S, Huot G, Cadar AE, Bourdeau V, Pollak MN, Ferbeyre G. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF-kappaB activation. *Aging Cell* 12: 489-98, 2013.
 70. Molina-Holgado E, Ortiz S, Molina-Holgado F, Guaza C. Induction of COX-2 and PGE(2) biosynthesis by IL-1beta is mediated by PKC and mitogen-activated protein kinases in murine astrocytes. *Br J Pharmacol* 131: 152-9, 2000.
 71. Muller M. Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations. *Antioxid Redox Signal* 11: 59-98, 2009.
 72. Munoz-Espin D, Canamero M, Maraver A, Gomez-Lopez G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, Rodriguez-Baeza A, Varela-Nieto I, Ruberte J, Collado M, Serrano M. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 155: 1104-18, 2013.

73. Munoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15: 482-+, 2014.
74. Nassour J, Martien S, Martin N, Deruy E, Tomellini E, Malaquin N, Bouali F, Sabatier L, Wernert N, Pinte S, Gilson E, Pourtier A, Pluquet O, Abbadie C. Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells. *Nat Commun* 7: 10399, 2016.
75. Negrette-Guzman M, Huerta-Yepez S, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. Modulation of mitochondrial functions by the indirect antioxidant sulforaphane: a seemingly contradictory dual role and an integrative hypothesis. *Free Radic Biol Med* 65: 1078-89, 2013.
76. Nickoloff BJ, Lingen MW, Chang BD, Shen M, Swift M, Curry J, Bacon P, Bodner B, Roninson IB. Tumor suppressor maspin is up-regulated during keratinocyte senescence, exerting a paracrine antiangiogenic activity. *Cancer Research* 64: 2956-2961, 2004.
77. Nie X, Liang L, Xi H, Jiang S, Jiang J, Tang C, Liu X, Liu S, Wan C, Zhao J, Yang J. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces premature senescence of astrocytes via WNT/beta-catenin signaling and ROS production. *J Appl Toxicol* 35: 851-60, 2015.
78. Omari KM, John G, Lango R, Raine CS. Role for CXCR2 and CXCL1 on glia in multiple sclerosis. *Glia* 53: 24-31, 2006.
79. Orjalo AV, Bhaumik D, Gengler BK, Scott GK, Campisi J. Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 17031-6, 2009.
80. Pertusa M, Garcia-Matas S, Rodriguez-Farre E, Sanfeliu C, Cristofol R. Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J Neurochem* 101: 794-805, 2007.
81. Pitzer C, Kruger C, Plaas C, Kirsch F, Dittgen T, Muller R, Laage R, Kastner S, Suess S, Spoelgen R, Henriques A, Ehrenreich H, Schabitz WR, Bach A, Schneider A. Granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 131: 3335-47, 2008.

82. Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids* 2010, 2010.
83. Pratschke S, von Dossow-Hanfstingl V, Dietz J, Schneider CP, Tufman A, Albertsmeier M, Winter H, Angele MK. Dehydroepiandrosterone modulates T-cell response after major abdominal surgery. *J Surg Res* 189: 117-25, 2014.
84. Purcell M, Kruger A, Tainsky MA. Gene expression profiling of replicative and induced senescence. *Cell Cycle* 13: 3927-37, 2014.
85. Richard Suzman JB. Global health and aging. *World Health Organization* 11: 1-26, 2011.
86. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 402-12, 2008.
87. Rodier F, Munoz DP, Teachenor R, Chu V, Le O, Bhaumik D, Coppe JP, Campeau E, Beausejour CM, Kim SH, Davalos AR, Campisi J. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci* 124: 68-81, 2011.
88. Rutkowski K, Sowa P, Rutkowska-Talipska J, Kuryliszyn-Moskal A, Rutkowski R. Dehydroepiandrosterone (DHEA): hypes and hopes. *Drugs* 74: 1195-207, 2014.
89. Sato K, Kato A, Sekai M, Hamazaki Y, Minato N. Physiologic Thymic Involution Underlies Age-Dependent Accumulation of Senescence-Associated CD4(+) T Cells. *J Immunol* 199: 138-148, 2017.
90. Schneider A, Kruger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, Aronowski J, Maurer MH, Gassler N, Mier W, Hasselblatt M, Kollmar R, Schwab S, Sommer C, Bach A, Kuhn HG, Schabitz WR. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest* 115: 2083-98, 2005.
91. Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS. Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 102, 2013.

92. Silva-Palacios A, Konigsberg M, Zazueta C. Nrf2 signaling and redox homeostasis in the aging heart: A potential target to prevent cardiovascular diseases? *Ageing Res Rev* 26: 81-95, 2016.
93. Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells MC, Di Giacomo V, Yosef R, Pilpel N, Krizhanovsky V, Sharpe J, Keyes WM. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 155: 1119-30, 2013.
94. Torres C, Francis MK, Lorenzini A, Tresini M, Cristofalo VJ. Metabolic stabilization of MAP kinase phosphatase-2 in senescence of human fibroblasts. *Exp Cell Res* 290: 195-206, 2003.
95. Torres C, Lewis L, Cristofalo VJ. Proteasome inhibitors shorten replicative life span and induce a senescent-like phenotype of human fibroblasts. *J Cell Physiol* 207: 845-53, 2006.
96. Tresini M, Lorenzini A, Torres C, Cristofalo VJ. Modulation of replicative senescence of diploid human cells by nuclear ERK signaling. *J Biol Chem* 282: 4136-51, 2007.
97. Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* 132: 363-374, 2008.
98. Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* 8: 311-23, 2009.
99. Wang R, Sunchu B, Perez VI. Rapamycin and the inhibition of the secretory phenotype. *Exp Gerontol* 94: 89-92, 2017.
100. Wang R, Yu Z, Sunchu B, Shoaf J, Dang I, Zhao S, Caples K, Bradley L, Beaver LM, Ho E, Lohr CV, Perez VI. Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism. *Aging Cell* 16: 564-574, 2017.
101. Wang W, Wu J, Zhang Z, Tong T. Characterization of regulatory elements on the promoter region of p16(INK4a) that contribute to overexpression of p16 in senescent fibroblasts. *J Biol Chem* 276: 48655-61, 2001.

102. Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, Liu S, Sarnoski EA, Freund A, Shirakawa K, Lim HW, Davis SS, Ramanathan A, Gerencser AA, Verdin E, Campisi J. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab* 23: 303-14, 2016.
103. Xiang J, George SL, Wunschmann S, Chang Q, Klinzman D, Stapleton JT. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta, and SDF-1. *Lancet* 363: 2040-6, 2004.
104. Xu M, Tchkonina T, Ding H, Ogrodnik M, Lubbers ER, Pirtskhalava T, White TA, Johnson KO, Stout MB, Mezera V, Giorgadze N, Jensen MD, LeBrasseur NK, Kirkland JL. JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E6301-10, 2015.
105. Xu Y, Li N, Xiang R, Sun P. Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence. *Trends Biochem Sci* 39: 268-76, 2014.
106. Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445: 656-60, 2007.
107. Zhu Y, Doornebal EJ, Pirtskhalava T, Giorgadze N, Wentworth M, Fuhrmann-Stroissnigg H, Niedernhofer LJ, Robbins PD, Tchkonina T, Kirkland JL. New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging (Albany NY)* 9: 955-963, 2017.
108. Zhu Y, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N, Palmer AK, Ikeno Y, Hubbard GB, Lenburg M, O'Hara SP, LaRusso NF, Miller JD, Roos CM, Verzosa GC, LeBrasseur NK, Wren JD, Farr JN, Khosla S, Stout MB, McGowan SJ, Fuhrmann-Stroissnigg H, Gurkar AU, Zhao J, Colangelo D, Dorronsoro A, Ling YY, Barghouthy AS, Navarro DC, Sano T, Robbins PD, Niedernhofer LJ, Kirkland JL. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 14: 644-58, 2015.

The secretory phenotype of senescent astrocytes isolated from Wistar newborn rats changes with anti-inflammatory drugs, but does not have a short-term effect on neuronal mitochondrial potential

Luis Ángel Maciel-Barón · Sandra Lizbeth Morales-Rosales · Alejandro Silva-Palacios · Roxana Haydee Rodríguez-Barrera · Jorge Antonio García-Álvarez · Armando Luna-López · Viviana Isabel Pérez · Claudio Torres · Mina Königsberg

Received: 10 May 2018 / Accepted: 6 August 2018 / Published online: 10 August 2018
© Springer Nature B.V. 2018

Abstract In the central nervous system (CNS), senescent astrocytes have been associated with neurodegeneration. Senescent cells secrete a complex mixture of pro-inflammatory factors, which are collectively called Senescence Associated Secretory Phenotype (SASP). The SASP components can vary depending on the cell type, senescence inducer and time. The SASP has been mainly studied in fibroblasts and epithelial cells, but little is known in the context of

the CNS. Here, the SASP profile in senescent astrocytes isolated from Wistar newborn rats induced to senescence by oxidative stress or by proteasome inhibition was analyzed. Senescent astrocytes secreted predominantly chemokines and IL-1 α , but no IL-6. The effect of the anti-inflammatory drugs, sulforaphane (SFN) and dehydroepiandrosterone (DHEA), on the SASP profile was evaluated. Our results showed that SFN and DHEA decreased IL-1 α secretion while increasing IL-10, thus modifying the SASP to a less anti-inflammatory profile. Primary neurons were subjected to the conditioned media obtained from drug-treated senescent astrocytes, and

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10522-018-9767-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. A. Maciel-Barón · S. L. Morales-Rosales · A. Silva-Palacios · M. Königsberg (✉)
División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad
Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, A.P. 55-535,
C.P. 09340 Ciudad de México, Mexico
e-mail: mkf@xanum.uam.mx

R. H. Rodríguez-Barrera
Centro de Investigación en Ciencias de la Salud (CICSA),
Universidad Anáhuac México Campus Norte,
Huixquilucan, 52786 Naucalpan de Juárez,
Estado de México, Mexico

J. A. García-Álvarez
Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de
México, 04510 Ciudad de México, Mexico

A. Luna-López
Instituto Nacional de Geriátria, SSA,
10200 Ciudad de México, Mexico

V. I. Pérez
Linus Pauling Institute, Oregon State University,
Corvallis, OR 97331, USA

C. Torres
Department of Pathology and Laboratory Medicine,
Drexel University College of Medicine, Philadelphia,
PA 19102, USA

L. A. Maciel-Barón · S. L. Morales-Rosales · A. Silva-Palacios
Posgrado en Biología Experimental, Universidad
Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,
09340 Ciudad de México, Mexico

their mitochondrial membrane potential was evaluated.

Keywords Senescence · inflammation · central nervous system · Astrocytes · Neurons

Introduction

Cellular senescence (CS) is considered one of the aging hallmarks (Lopez-Otin et al. 2013), which can be induced by different stimuli, such as proliferation exhaustion like in replicative senescence (RS) or prematurely, in response to different types of stressors. The most studied induced-premature senescence are Oncogene Induced Senescence (OIS) (Courtois-Cox et al. 2008), Stress Induced Premature Senescence (SIPS) (Triana-Martinez et al. 2014) and Proteasome Inhibition-Induced Premature Senescence (PIPS) (Torres et al. 2006), and *in vivo* significance has been proposed for both RS and premature senescence (de Magalhaes and Passos 2018; Toussaint et al. 2002). Several time-dependent features characterize senescent cells, including proliferative arrest, augmented β -Galactosidase activity, DNA-SCARS (Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence), Senescence Associated Heterochromatin Segments (SAHF), that occur between few hours or some days after the senescence induction, and the Senescence Associated Secretory Phenotype (SASP) (Rodier and Campisi 2011; Triana-Martinez et al. 2016). The SASP is a complex set of cytokines, chemokines, proteases, and growth factors that senescent cells release to their microenvironment (Coppe et al. 2008). Interestingly, the SASP is a time dependent feature that acquires its proinflammatory sign at longer times after the senescent insult. The SASP has been measured 6–12 days after the senescence induction (Malaquin et al. 2016). The SASP is known to induce many biological effects in adjacent cells such as proliferation, senescence reinforcing, immune system activation, and migration (Malaquin et al. 2016). Depending on the context, the SASP might drive important events, both beneficial or detrimental, as tissue remodeling during puberty (Li et al. 2017) and embryonic development (Munoz-Espin et al. 2013; Storer et al. 2013), wound healing (Demaria et al.

2014), tumor suppression (Collado and Serrano 2010), as well as tumor promotion (Krtolica et al. 2001).

The SASP components can vary depending on the cell type, the senescence inducer, and time (Coppe et al. 2010; Maciel-Baron et al. 2016; Wu et al. 2015). The pro-inflammatory profile is normally maintained due to several conserved factors, like IL-6, IL-1 α , TNF α , MMP-1, and IFN γ (Freund et al. 2010). The modulation of the secretion of pro-inflammatory SASP components represents an interesting approach to intervene the harmful effects of the SASP in the context of illness and aging (Maciel-Baron et al. 2017; Tchkonja et al. 2013).

Recently, astrocytes have been recognized as an important cell type that is able to senesce *in vivo* (Bhat et al. 2012; Chinta et al. 2015; Maciel-Baron et al. 2017) (Bhat et al. 2012; Chinta et al. 2015; Maciel-Baron et al. 2017) since astrocytes expressing senescence markers have been found in post-mortem histological sections of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Turnquist et al. 2016), and neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's (Bhat et al. 2012) and Parkinson's (Chinta et al. 2013). Astrocytes senescence *in vitro* can also be induced with diverse drugs like paraquat (Chinta et al. 2018) or antiretroviral therapies during HIV treatments (Cohen et al. 2017; Yu et al. 2017). However, the contribution of the SASP to the age-related neuroinflammation is not well understood, and it is still being studied.

Hence, the aim of this work was to analyze the SASP components secreted by astrocytes induced to two types of premature senescence, SIPS and PIPS, and the ability of two drugs with anti-inflammatory potential to modulate them. The chosen drugs were Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Sulforaphane (SFN). DHEA is a steroid hormone with anti-aging properties (Rutkowski et al. 2014), which has shown to modulate chemokine and Th2 cytokines release in mice, contributing, thus, to inflammation reduction (Liou and Huang 2011). Meanwhile, SFN is a Nrf2 response activator that counteracts oxidative stress (Greaney et al. 2016). The redox state is important in the regulation of IL-1 α expression, that in turn, induces the expression of important SASP components, such as IL-6 and IL-8 (McCarthy et al. 2013).

Our results showed that, at day 6, the SASP profiles from SIPS and PIPS astrocytes are different from each other, but they become more alike over time, and they might even converge to produce a unique SASP

profile. IL-6 is not a principal component within the astrocytes SASP, while IL-1 α , together with several chemokines, might be important participants in the SASP. The treatment with either SFN or DHEA was not able to return the SASP profile from SIPS and PIPS astrocytes to their basal levels, but instead they turned it less pro-inflammatory by increasing IL-10 secretion, and at the same time decreasing IL-1 α secretion. When primary neurons were subjected to the conditioned media (CM) obtained from SFN or DHEA treated or non-treated senescent astrocytes, their mitochondrial membrane potential did not show notorious changes. This encourages to further study the effect of senescent astrocytes on neurons and other brain cellular types.

Materials and methods

Chemicals

All chemicals and reagents were of the highest analytical grade and, unless otherwise stated, the majority was purchased from Sigma (St. Louis MO).

Animals

The primary astrocytes were obtained from neonatal (3–7 days old) Wistar rats, while the primary neurons were isolated from embryonic Wistar rats (17–18 days of gestation). The animals were provided by the closely breeding colony of the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). All procedures with animals were strictly carried out according to the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the Principles of the Mexican Official Ethics Standard 062-ZOO-1999.

Astrocytes culture

Astrocytes were isolated as described previously (McCarthy and de Vellis 1980). Briefly, dissected brains were submerged in cold-sterile-PBS with 2% of antibiotic-antimycotic (Ab-Am), brought to the laminar hood and decanted in a Petri dish. Then, the brains were washed 3 times with sterile-PBS, cut in small fragments and re-suspended in 5 mL of sterile-PBS in a 15 mL-tube. With a 5 mL-micropipette, the suspension was strongly re-suspended 15 times to separate

the cells from the tissue. The suspension was centrifuged for 10 min at 4 °C and 3500 rpm. The pellet was recovered and re-suspended in 8 mL of Astrocyte Culture Media (ACM, Minimum Essential Medium/10% FBS/1% Ab-Am/1.1% Glutamine/1.5% Glucose). The suspension was filtered in a cell strainer (pore 100 μ m) and incubated for 24 h at 37 °C–5% CO₂. Finally, the cells were washed with cold-sterile-PBS to eliminate other cell types. Astrocytes were observable by optical microscope 1 or 2 weeks after the isolation. The ACM was changed twice a week; when cultures exceed > 75% of confluence, cells were trypsinized and reseeded at normal density (10⁴ cells/cm²). Populations Doublings (PD) were calculated using the equation $PD = \log(N/N_1)/\log 2$ in each reseeded process.

Cortical neuron culture

For the neuron culture, the following solutions were used: 10 \times KRB stock NaCl 7%/KCl 0.3%/KH₂PO₄ 0.16%/NaHCO₃ 2.14%/Glucose 2.57%/Phenol red 0.015% in water. Sol 1 0.3% BSA/0.03% Mg²⁺ in KRB 1 \times . Sol 2 Trypsin–EDTA 1 \times in sol 1. Sol 3 0.08 mg/mL DNase/0.52 mg/mL trypsin inhibitor SBT, 0.04% Mg²⁺ in Sol 1. Sol 4 10.5 mL Sol 1 + 2 mL Sol 3. Sol 5 0.0015% CaCl₂/0.04% Mg²⁺ in Sol 1. The solutions were filtered (0.22 μ m pore) and heated at 37 °C before the brain dissection. Cortical neurons were isolated as described by Brewer et al. (Brewer et al. 1993). Briefly, 17–18 gestational-days embryos were dissected with the placenta and placed in a Petri dish with 10 mL of Sol were resuspended in 5 mL of Sol 5. The suspension was filtered through a cell separator several times and the cells were placed in other tube with 5 mL of Sol 5 and centrifuged at 3000 rpm for 3 min. The pellets were then resuspended in 10 mL of Neurobasal medium with 0.5 mM of L-glutamine, 1% supplement B27 complete, 1% supplement B27 without antioxidants and 20 μ g/mL of gentamicin. The neurons were seeded in circular coverslips previously pre-treated with poly-L-lysine (2 h) at a cellular density of 70 \times 10³ cells per coverslip. The coverslips were placed into 12-wells dish and incubated for 24 h at 37 °C–5% CO₂ with 1 mL of supplemented neurobasal medium per well.

Senescence induction

For senescence induction non-senescent astrocytes were used at early PD (PD < 5) to avoid RS. Astrocytes were trypsinized and seeded at normal density on a 24-well multi-chamber (Corning, Acton MA, USA). After 72 h in culture, two different stressors were used to induce senescence, H₂O₂ (Sigma, St. Louis MO) for SIPS, and epoxomicin (Sigma, St. Louis MO) for PIIPS. To determine the optimal concentration and time to induce senescence the experiments were performed as follow:

Stress Induced Premature Senescence (SIPS)

The cells were incubated for 1 or 2 h with 75 or 150 μ M H₂O₂ dissolved in the ACM, at 37°C and 5% CO₂. H₂O₂ was removed by changing the medium, and the cells were allowed to recover in fresh ACM for 48 h before further measurements.

Proteasome Inhibition Induced Premature Senescence (PIIPS)

The cells were incubated with 1, 5 or 10 nM of epoxomicin from a stock solution in DMSO. Epoxomicin was added to the ACM throughout subsequent medium changes, as previously described (Bitto et al. 2010; Torres et al. 2006). SA- β -Gal Activity was determined to evaluate the best treatment to induce CS.

Senescence Associated- β -Galactosidase Staining (SA- β -Gal)

SA- β -Gal activity was determined as previously described (Dimri et al. 1995). The cells were fixed with 3% formaldehyde. Three wells were stained 4 days after the senescence induction, and the number of SA- β -Gal-positive cells was determined by counting at least 100 cells per well under a microscope. The number of cells positive for SA- β -Gal activity is reported as the percentage of the total scored cells.

Immunocytochemistry analysis

The cells were seeded on coverslips at regular density and senescence was induced 48–72 h after cell seeding, as described above. The cells were fixed in

3% formaldehyde/PBS for 15 min and washed twice with 2% PBS-Tween 20 (PBST), incubated with 200 μ L of protein blocker for 10 min, and washed again. Astrocytes were identified by incubation with anti-GFAP primary antibody (dilution 1:200, Company, City, State) for 1 h. Then the cells were washed three times with PBST and incubated for 1 h with the secondary antibody (1:500; Alexa Fluor[®] 488, Company, City, State). For p16 and β -Galactosidase analysis, the cells were incubated for 1 h with anti-p16 (dilution 1:200, Company, City, State), the cells were washed twice with PBST, and incubated for 1 h with anti- β -Galactosidase (1:200; Abcam, Cambridge, MA). After three extra washes with PBST, the cells were incubated for 1 h with anti-rabbit secondary antibody (1:500; Alexa Fluor[®] 488, Company, City, State), washed twice with PBST, and incubated for 1 h with anti-mouse secondary antibody (1:500; Alexa Fluor[®] 594). After the last incubation with the secondary antibody, all preparations were washed three times with PBST, and mounted with a fluorescent mounting medium (DakoCytomation, Glostrup Denmark) and 0.01% DAPI (4,6-diamino-2-phenylindol) on glass slides. Images were obtained from an epifluorescence microscope and the relative intensity for p16 signal was measured using ImageJ software.

Astrocytes treatment by the two SASP-modulators

Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Sulforaphane (SPN) were diluted in DMSO to 10 mM and 1 mM respectively, and maintained at -4 °C until use. Aliquots from the stock solutions were diluted in Astrocyte Culture Media (ACM) to the desired concentration and added to the cells. For the SIPS and control groups, modulators were added to the cells in the ACM each 48 h. Since epoxomicin must be in the media in order to sustain the senescent phenotype, for the PIIPS groups, the modulators were added to the cells 1 h prior to the ACM supplemented with epoxomicin. This process was repeated every 48 h.

Conditioned media collecting for SASP determinations

The conditioned media used to evaluate the SASP was collected 6 or 12 days after senescence induction in treated and non-treated astrocytes. Forty-eight hours before collecting the conditioned media, the cells were

washed and incubated with MCDDB105 media supplemented with 1.1% glutamine, 1.5% glucose with low serum (1% SFB). After that time, the conditioned media (CM) was recovered and centrifuged at 3500 rpm, to discard cell debris. The CM was 10-fold concentrated using Millipore® Amicon® Ultra Centrifuge Filters Concentrators following the manufacturer's instructions, and frozen at -80°C until use.

SASP analysis

A total of 14 cytokines and 8 chemokines were measured using a ProcartaPlex® Multiplex Immunoassay. The assay was performed following the manufacturer's instructions. Data were obtained in a Luminex Instrument and the analytes concentration was measured following the manufacturer's recommendations.

IL-6 quantification

IL-6 was measured using Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) Legend Max™ kit manufactured by BioLegend®. The assay was carried out following the manufacturer's instructions. Data were obtained reading the absorbance at 450 nm in a H-Reader 1 ELISA Reader (HLAB®).

Neurons exposure to CM obtained from astrocytes treated with the two possible SASP modulators

The CM was obtained from senescent (SA) or non-senescent astrocytes (NSA), that had been treated or not with SFN or DHEA, 12 days after senescence induction and was kept at -80°C until used. Neurons were isolated as described above, and 6 days after that they were exposed to the CM as follows: 300 μL of neurobasal medium was replaced with 150 μL of fresh neurobasal medium plus 150 μL of the CM obtained from SA and NSA treated or not with SFN or DHEA. The neurons' exposure to the CM was repeated after 3 days, i.e. 9 days after their isolation.

Mitochondrial membrane potential assay

One day after the last neuronal treatment, i.e. 10 days after their isolation, the mitochondrial membrane potential was assayed using the cationic colorant JC-1. Briefly, 1 μL of 1 mg/mL JC-1 solution was added

to each well containing 1 mL of medium and the neurons were incubated for 30 min at 37°C . After that, each coverslip was immersed into Lockey solution (NaCl 154 mM/KCl 5.6 mM/NaHCO₃ 3.6 mM CaCl₂ 2.6 mM/HEPES 5 mM/Glucose 5.6 mM, pH 7.4) and observed in a confocal microscope (Leica TCS-SPS) with an immersion objective (488 nm excitation wavelength). The signals obtained at 590 nm for polarized mitochondrion, and at 525 nm for depolarized mitochondrion were quantified with the ImageJ software.

Statistical analysis

Data are reported as the mean \pm SD for at least three independent experiments using cells from different donor animals. The ANOVA test was followed by the Tukey–Kramer variance analysis and paired Student's *t* test was used to compare the data. A $p < 0.05$ level of probability was used as minimum criterion of significance. For SASP analysis, a Principal Components Analysis was carried out to obtain the matrixes of correlation.

Results

H₂O₂ and epoxomicin induce premature senescence in rat astrocytes

Astrocytes were obtained from the neonatal rat brains and the purity of the cultures was confirmed by positive staining for the glial marker GFAP (> 95% of positive cells) (Fig. S1A). After following the astrocytes proliferation, a plateau was not observed at CDP 10–15 as previously reported for other cultured astrocytes models (Bitto et al. 2010) (Fig. S1B). For that reason, we decided only to study premature senescence, which was induced at early CPD (~ 5) by oxidative stress (SIPS) or proteasome inhibition (PIPS).

To induce SIPS, two different H₂O₂ concentrations (75 and 150 μM) were tested, both for 1 or 2 h. While, to induce PIPS, three different epoxomicin concentrations (1, 5 and 10 nM) were assessed. Epoxomicin was added into fresh culture media every 48 h. Astrocytes were positive to the SA- β -Gal assay for both treatments (Figs. S2A, S2B); the first approach was to choose the treatment where the highest

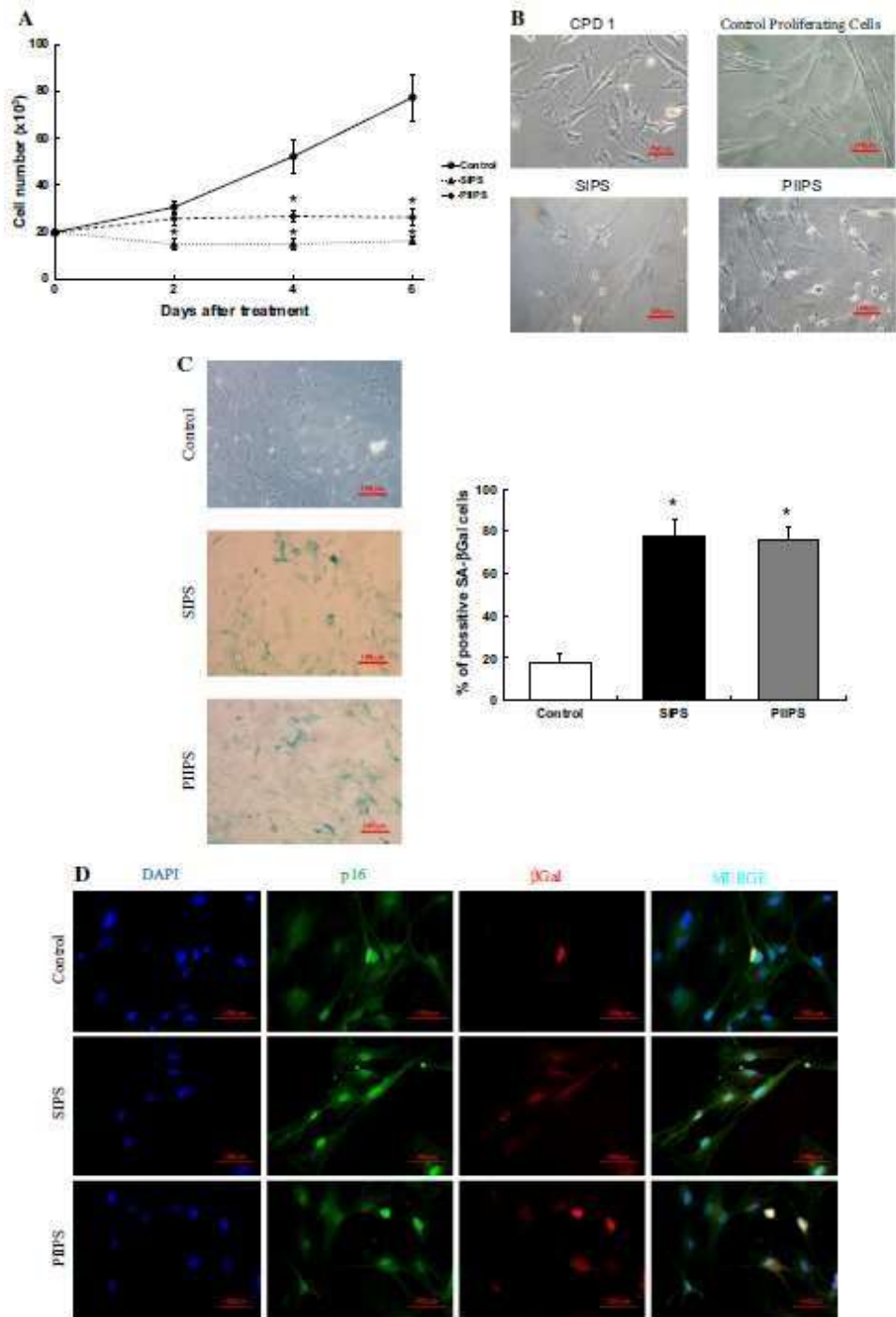


Fig. 1 H_2O_2 and epoxomicin treatments induce premature senescence in primary rat astrocytes. Primary rat astrocytes were treated with H_2O_2 75 μ M for 2 h or epoxomicin 5 nM (every 48 h) to induce premature senescence. SIPS and PIIPS respectively. **a** Proliferation curves show that H_2O_2 and epoxomicin cause proliferation arrest since the beginning of the treatments. **b** SIPS-induced astrocytes show a flattened and enlarged shape, while PIIPS-induced astrocytes adopted a stellar shape. **c** Both, SIPS and PIIPS induced astrocytes were positive to SA- β -Gal assay, percentages of positive cells are shown on the right graph. **d** Representative immunocytochemistry images showed overexpression of β -Galactosidase and p16, and nuclear localization of p16. **e** Quantification of the p16 signal from the immunocytochemistry images. **f** Quantification of the nuclear p16 positive astrocytes. **g** Representative immunocytochemistry images of γ H2AX nuclear foci showed DNA damage in SIPS and PIIPS induced astrocytes. **h** Percentages of cells with ≥ 5 γ H2AX foci and histograms showing the distribution of the number of γ H2AX foci. *Significant differences compared to non-senescent cells as tested by ANOVA and Tukey–Kramer test with $p < 0.05$, $n = 3$ for each group

percentage of SA- β -Gal positive cells was scored (Fig. S2C); however, although H_2O_2 150 μ M produced the highest number of SA- β -Gal positive cells, that treatment was discarded due to apparent cellular damage. The chosen treatments to induce premature senescence were: 75 μ M H_2O_2 for 2 h to induce SIPS, and 5 nM epoxomicin for PIIPS.

To better characterize our model, additional senescence hallmarks were evaluated. Astrocytes lost their proliferative capacity after SIPS and PIIPS treatments and stopped proliferating 4 days after the treatment started (Fig. 1a). Interestingly, SIPS and PIIPS-induced cells showed a different morphology; while SIPS-induced cells adopted a flattened and enlarged form, PIIPS-induced cells showed a stellar shape (Fig. 1b). Both, H_2O_2 and epoxomicin treatments induced CS in the primary astrocytes. The cultures showed almost 80% of positive cells to the SA- β -Gal assay (Fig. 1c). Treated astrocytes increased p16 and β -Galactosidase expression evaluated by immunocytochemistry 4 days after the beginning of the treatment (Fig. 1d–f), although p16 was expressed in non-senescent astrocytes, co-localization with the nucleus and a highly increased signal was observed only in senescent astrocytes. Moreover, SIPS and PIIPS induced astrocytes showed more γ H2AX-foci positive cells than non-senescent astrocytes (Fig. 1g, h). Altogether, these data confirmed that Wistar primary astrocytes are able to achieve premature senescence and are, therefore, a suitable model to study this feature.

The SASP from senescent astrocytes differs from the classical SASP-profile

Fourteen cytokines and eight chemokines were first quantified 2, 4 and 6 days after senescence induction, in order to analyze SASP-dependence at short times. Since most of the cytokines were not detected at those days (data not shown), we decided to compare the secretion at 6 and 12 days after senescence induction. The heat-map in Fig. 2a shows the SASP profile. Unexpectedly, only a few cytokines modified their secretion profile in SIPS and PIIPS astrocytes compared with non-senescent cells even at day 12. The cytokines that augmented their secretion levels were the growth factor G-CSF (CSF3), the pro-inflammatory IL-1 α and the chemokines GRO- α and IP-10, for both SIPS and PIIPS, and MCP-1 MIP-2 and RANTES only for PIIPS. Interestingly, some molecules changed their secretion profile at different days. For example, GRO- α , IP-10, MCP-1 and RANTES were prominently found in PIIPS at day 6, but not at day 12, supporting the idea that SASP changes along time. The correlation analysis in Table 1 shows that SASP secretion from SIPS astrocytes becomes increasingly different from non-senescent astrocytes as time passes. These data are corroborated by the multiple correlation coefficient variations, $r = 0.31$ to $r = 0.11$ at day 6 and 12, respectively. The multiple correlation coefficient (from here on referred as correlation coefficient) determined for the SASP secreted by PIIPS astrocytes was negative at day 6, $r = -0.18$, and positive but low at day 12, $r = 0.15$, pointing towards a greater difference. Interestingly, the correlation coefficient obtained for the SASP secretion of SIPS astrocytes at days 6 and 12 was $r = 0.65$, indicating very few variations in the SASP profile of SIPS astrocytes along time. In contrast, the correlation coefficient for the SASP secretion during PIIPS at days 6 and 12 was 0.23, denoting some variation in the SASP profile of PIIPS astrocytes during time. When comparing the SASP profile of SIPS and PIIPS astrocytes at day 6, the correlation coefficient obtained was $r = -0.21$, suggesting a small negative correlation between their secretions; but at day 12, the correlation coefficient value was high ($r = 0.379$), implying that their secretion profiles contained more shared components. Together, these analyses suggest that as time passes, the SASP secreted by senescent

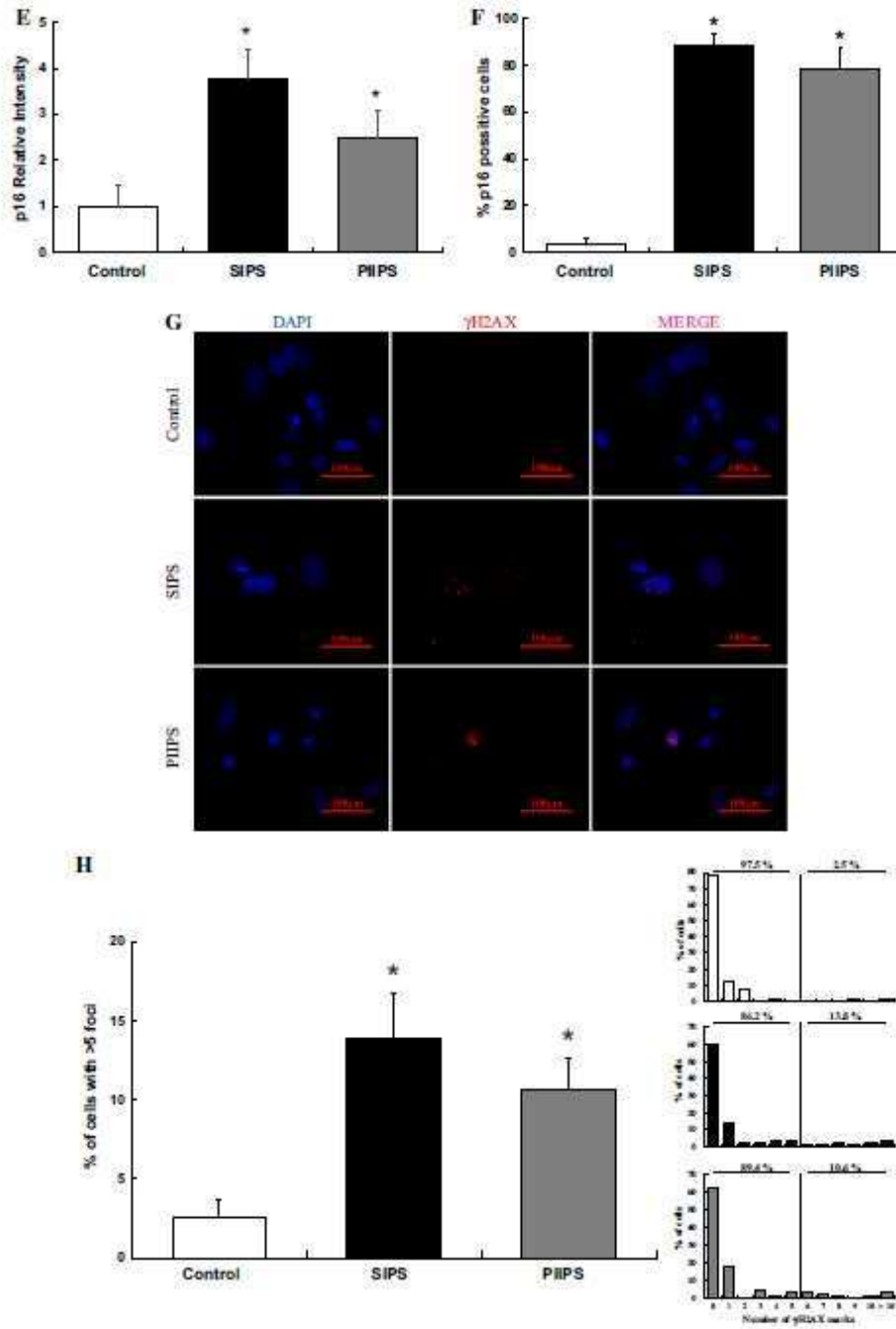


Fig. 1 continued

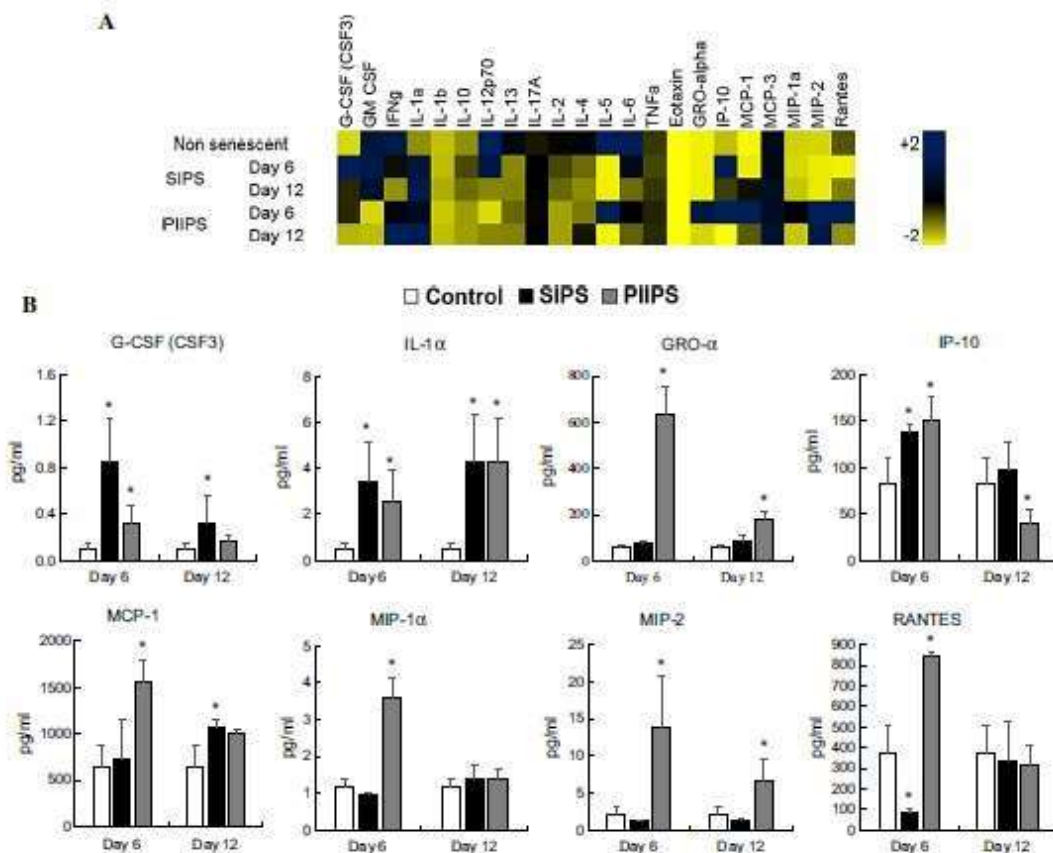


Fig. 2 Senescent astrocytes display a non-classical SASP. Conditioned media from senescent and non-senescent astrocytes was subjected to cytokine and chemokine multiplex assay to evaluate the SASP. Fourteen cytokines and eight chemokines were quantified. **a** Global secretory profile is showed as a heatmap (see Table 1 for correlation coefficients between

groups). **b** Quantitative analysis of selected cytokines and chemokines. SASP determinations were performed 12 days after the senescence induction since it is an attribute of senescent cells that is developed at long times. *Significant differences compared with non-senescent cells as tested by ANOVA and Tukey–Kramer test with $p < 0.05$, $n = 3$ for each group

Table 1 Correlation matrix of the secretion profile of non-senescent, SIPS and PIIPS astrocytes

	Non-senescent	SIPS D6	SIPS D12	PIIPS D6	PIIPS D12
Non-senescent	1				
SIPS D6	0.31592692	1			
SIPS D12	0.113301772	0.656605645	1		
PIIPS D6	-0.187768622	-0.21058917	-0.017219075	1	
PIIPS D12	0.157920547	0.1302669	0.374024879	0.234201628	1

cells (SIPS and PIIPS) becomes progressively different from the non-senescent astrocytes.

Remarkably, when the previous data were quantitatively analyzed (Fig. 2b), chemokines

concentrations levels were much higher than the cytokines ones. Cytokines were detected from 10^{-1} to 10 pg/mL, while chemokines from 10^1 to 10^3 pg/mL, suggesting a major role of the chemokines in the

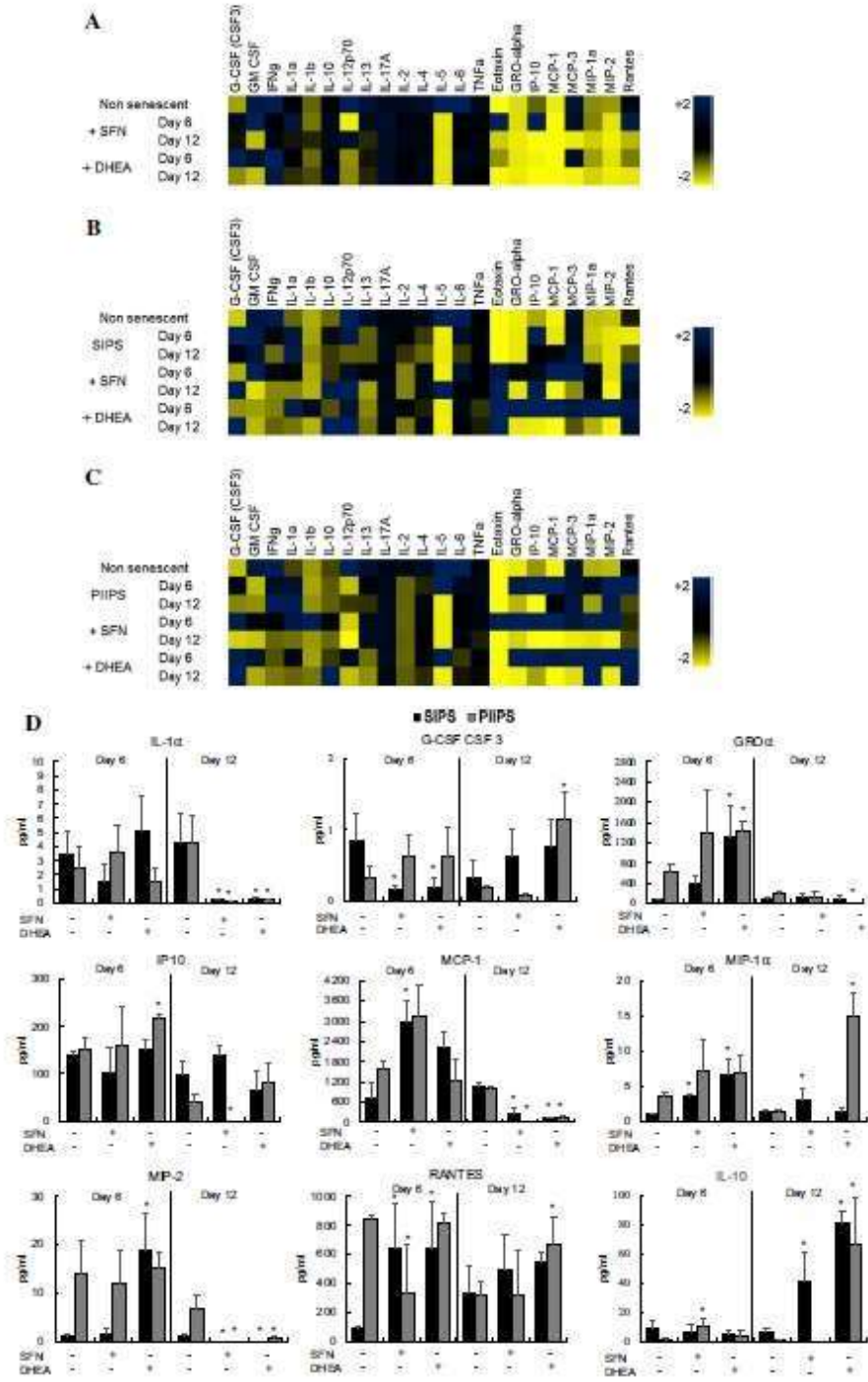


Fig. 3 Sulforaphane (SFN) and Dehydroepiandrosterone (DHEA) modify the SASP profile. SIPS and PIIPS induced astrocytes were treated with SFN 1 μ M or DHEA 10 μ M every 48 h starting 2 days after the senescence induction and finishing 12 days after the senescence induction. CM was collected and subjected to cytokine and chemokine multiplex assay. The image the effect of SFN and DHEA on the secretory profile with heatmaps in **a** Non-senescent astrocytes, **b** SIPS astrocytes and **c** PIIPS astrocytes. See Tables 2, 3 and 4 for correlation coefficients between groups. **d** Quantitative analysis of selected cytokines and chemokines. *Significant differences compared with non-senescent cells as tested by ANOVA and Tukey–Kramer test with $p < 0.05$, $n = 3$ for each group

SASP secreted from senescent astrocytes. It is important to notice that IL-1 α was conserved in both types of senescent cells and its secretion was 4-fold higher than in non-senescent astrocytes in both time points determined, 6 and 12 days. This suggests that IL-1 α is a major component within the senescent astrocytes SASP.

Surprisingly, IL-6, the main SASP marker commonly reported in other senescent models, did not increase in our senescent astrocytes. Moreover, IL-6 was barely detected (data not shown). To confirm this unexpected data, IL-6 secretion was assessed using an ELISA and was compared with the secretion of senescent lung fibroblasts, a senescence well-known model (Fig. S3). As expected, senescent fibroblasts secreted higher levels of IL-6, compared to non-senescent counterparts; but that was not the case for senescent astrocytes. This confirmed that IL-6 is not a principal component within the astrocytes SASP. Altogether, these data suggest that SASP from senescent Wistar astrocytes is different from the classical SASP found in other senescent models having IL-1 α as a principal marker, and that, in this model, the chemokines might be playing an important role.

Effect of the possible modulators in SASP secretion

Considering that all cells secrete molecules to communicate, and that adding exogenous agents will surely change both senescent and non-senescent cells secretions, before adding the molecules to be used as SASP modulators we wanted to be sure that they would not modify the senescent state. That is, that the concentrations used wouldn't not modify cellular proliferation (by increasing it or decreasing it),

wouldn't have an effect on cellular survival, nor induce or delay senescence induction. This was done to try to ensure that the effects of the drugs would be on the SASP and not on the senescence induction. Hence, we explored reported physiological concentrations (Dong et al. 2016; Rutkowski et al. 2014), in order to determine the optimal concentrations to use. A dose–response curve was performed in control-proliferating astrocytes (Fig. S4A). Three different concentrations were tested for each drug, and the one that had no effect on cellular survival after 48 h was chosen: 1 μ M for SFN and 10 μ M for DHEA. As control, the effect of DMSO alone was also checked (data not shown). Subsequently, the effect on cellular proliferation rate and on senescence induction of each drug at the chosen concentration was determined for 12 days. No effect was observed (Fig. S4B). Therefore, those concentrations were used to evaluate their effect on SASP secreted components.

Figure 3 shows the effect of SFN and DHEA in the secretion profile of non-senescent, SIPS and PIIPS astrocytes. In the case of non-senescent cells (Fig. 3a, Table 2), SFN changed the secretion profile of non-senescent astrocytes at day 6 ($r = -0.10$), reducing the secretion of IFN γ , IL-12, IL5 and IL-6 and increasing the secretion of IL-1 α , Eotaxin, IP-10 and RANTES. Nevertheless, at day 12 the correlation coefficient with non-treated astrocytes increased, $r = 0.37$, implying that SFN effects on non-senescent astrocytes secretion was observed mainly at short times. In the case of DHEA, the correlation coefficients were high at 6 and 12 days ($r = 0.34$ and $r = 0.36$, respectively). DHEA reduced the basal senescent astrocytes secretion of GM-CSF, IL-12, IL5 and IL6, and increased only G-CSF (CSF3) secretion at day 6.

The two tested modulators had a negative correlation coefficient with the SASP secretion of SIPS untreated astrocytes at day 12 (Fig. 3b, Table 3), $r = -0.25$ and $r = -0.07$ for SFN and DHEA, respectively. These negative correlation coefficients, even being low, indicate opposite behaviors of some SASP components. In a biological context, this might mean that, while some SASP components are higher in the SASP from SIPS-untreated astrocytes, they decreased after the drug treatment, and vice versa. Interestingly, the pro-inflammatory cytokine IL-1 α , that was highly secreted by senescent astrocytes, decreased after the modulators treatments. On the

Table 2 Correlation matrix of the secretion profile of non-senescent astrocytes and non-senescent astrocytes treated with SFN and DHEA

	Non-senescent	NS SFN D6	NS SFN D12	NS DHEA D6	NS DHEA D12
Non-senescent	1				
NS SFN D6	- 0.105634209	1			
NS SFN D12	0.374650124	- 0.194006919	1		
NS DHEA D6	0.348116507	0.139902454	0.329447441	1	
NS DHEA D12	0.369867579	- 0.123316163	0.68499336	0.59095432	1

Table 3 Correlation matrix of the secretion profile of SIPS-induced astrocytes and SIPS-induced astrocytes treated with SFN and DHEA

	Non-senescent	SIPS D6	SIPS D12	SIPS SFN D6	SIPS SFN D12	SIPS DHEA D6	SIPS DHEA D12
Non-senescent	1						
SIPS D6	0.31592692	1					
SIPS D12	0.113301772	0.656605645	1				
SIPS SFN D6	0.134852423	0.117241834	0.366690707	1			
SIPS SFN D12	0.0573955	0.209018458	- 0.255664682	- 0.117564888	1		
SIPS DHEA D6	- 0.573557564	- 0.195932177	- 0.021099663	0.341778007	- 0.130234469	1	
SIPS DHEA D12	0.005025371	0.204219788	- 0.078470471	0.10299145	0.670158587	- 0.130413391	1

opposite, IL-10 secretion augmented after SFN and DHEA treatments. This result is very motivating because IL-10 is one of the major pro-inflammatory cytokines negative regulators. Likewise, both treatments increased the secretion of several chemokines, including Eotaxin, GRO- α , MCP-1, MCP-3, MIP-1 α , MIP-2 and RANTES, in at least one of the two evaluated time points. The correlation coefficients between non-senescent and SIPS astrocytes treated with the possible modulators are very low, or even negative, indicating that the used drugs changed the secretion profile of SIPS-astrocytes, but they did not restore the basal secretion of non-senescent cells.

For PIIPS-astrocytes (Fig. 3c, Table 4), the correlation coefficients showed higher values at day 6, $r = 0.73$ for DHEA, suggesting that this drug had no effect in the secretion of PIIPS-astrocytes at short time. On the other hand, SFN had a low correlation

coefficient at day 6, $r = 0.22$, suggesting at least subtle changes with the basal secretion of PIIPS untreated astrocytes at short time. In contrast, at day 12, the two treatments had low correlation coefficients, $r = 0.16$ and $r = -0.18$ for SFN and DHEA, respectively, implying an effect on the SASP from PIIPS-astrocytes. When analyzing particular cytokines, IL1- α secretion decreased again after the treatments, especially at day 12, and the anti-inflammatory IL-10 increased only with DHEA treatment at day 12. Again, drug treatments did not restore the basal astrocytes secretion as confirmed by the negative correlation coefficients between non-senescent and PIIPS astrocytes treated with the possible modulators, except for SFN-treatment at day 12, when $r = 0.30$.

The quantitative analysis of specific cytokines and chemokines after the assessed modulators treatments (Fig. 3d) confirms the previous observations. The

Table 4 Correlation matrix of the secretion profile of PIIPS-induced astrocytes and PIIPS-induced astrocytes treated with SFN and DHEA

	Non-senescent	PIIPS D6	PIIPS D12	PIIPS SFN D6	PIIPS SFN D12	PIIPS DHEA D6	PIIPS DHEA D12
Non-senescent	1						
PIIPS D6	− 0.187768622	1					
PIIPS D12	0.157920547	0.234201628	1				
PIIPS SFN D6	− 0.812547168	0.227184982	0.01693312	1			
PIIPS SFN D12	0.307740582	− 0.226130941	0.162990317	− 0.376884487	1		
PIIPS DHEA D6	− 0.194926783	0.739741045	− 0.057098573	0.26869165	− 0.504942526	1	
PIIPS DHEA D12	− 0.255850565	− 0.082239973	− 0.189243839	− 0.047404612	0.139178641	0.122951529	1

most evident effect was the decrease in IL-1 α secretion in senescent astrocytes (SIPS and PIIPS) treated with the modulators, and the increase in IL-10 secretion. Together, these data indicate that SFN and DHEA modify the SASP secreted by SIPS and PIIPS-astrocytes, but they are not able to completely restore the basal secretion produced by non-senescent astrocytes. Moreover, as expected for cells treated with any kind of drugs, the modulators also had an effect in non-senescent cells secretion. However, SFN and DHEA treatment did not turn their SASP pro-inflammatory.

Effect of the astrocyte's SASP on neuronal mitochondrial membrane potential

Primary neurons, characterized by the neuronal marker Class III β -Tubulin (Fig. S5), were treated with the CM obtained from senescent or non-senescent astrocytes, that had been treated or not with SFN or DHEA. The mitochondrial membrane potential was evaluated using the cationic dye JC-1. Figure 4a shows representative micrographies of the treated neurons. JC-1 used to evaluate the mitochondrial membrane potential forms aggregates in the polarized mitochondria emitting a red signal at 590 nm, but in depolarized mitochondria due to not incorporated JC-1 aggregates, a green emission at 535 nm is detected. Figure 4b shows the 590/535 nm ratio obtained to evaluate the mitochondrial membrane potential in

neurons. Unexpectedly, no significant differences were observed in the neurons treated with the SIPS or PIIPS CM compared to controls. Moreover, neurons exposed to CM from astrocytes pretreated with SFN and DHEA maintained the membrane potential in the same values that the control group. Suggesting that this short-term exposure did not produce an immediate effect on their mitochondrial membrane potential.

Discussion

CS is recognized as a central hallmark of aging. This state can be achieved by multiple and diverse stimuli. Here, we induced premature senescence by exposing primary rat astrocytes to sub lethal oxidative stress with H₂O₂ (SIPS), and by inhibiting the proteasome activity using epoxomicin (PIIPS). These two models of premature senescence have been studied in fibroblasts by our group and others (Maciel-Baron et al. 2016; Torres et al. 2006), and in astrocytes (Bitto et al. 2010) from different species. Even though SIPS and PIIPS share the classical senescence trademarks (Figs. 1, S2), such as proliferation arrest, SA- β -Gal staining, p16 overexpression, and the presence of γ H2AX foci, a notorious different morphology was observed; while SIPS-induced astrocytes adopted an enlarged and flattened morphology, PIIPS-induced astrocytes adopted a stellate shape (Fig. 1b). Similar

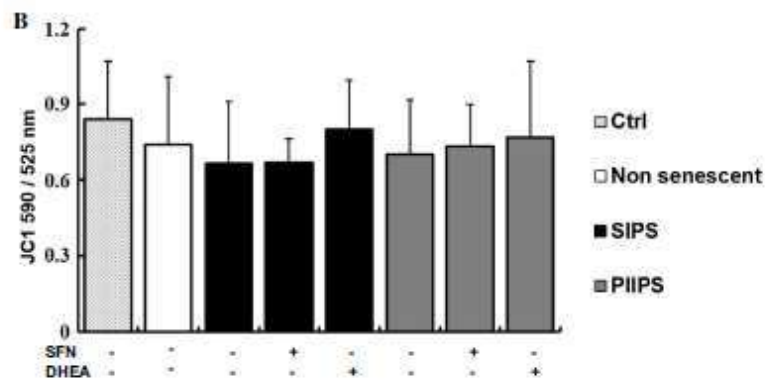
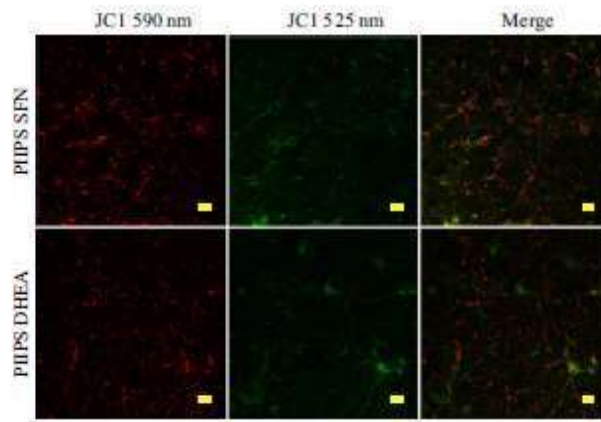
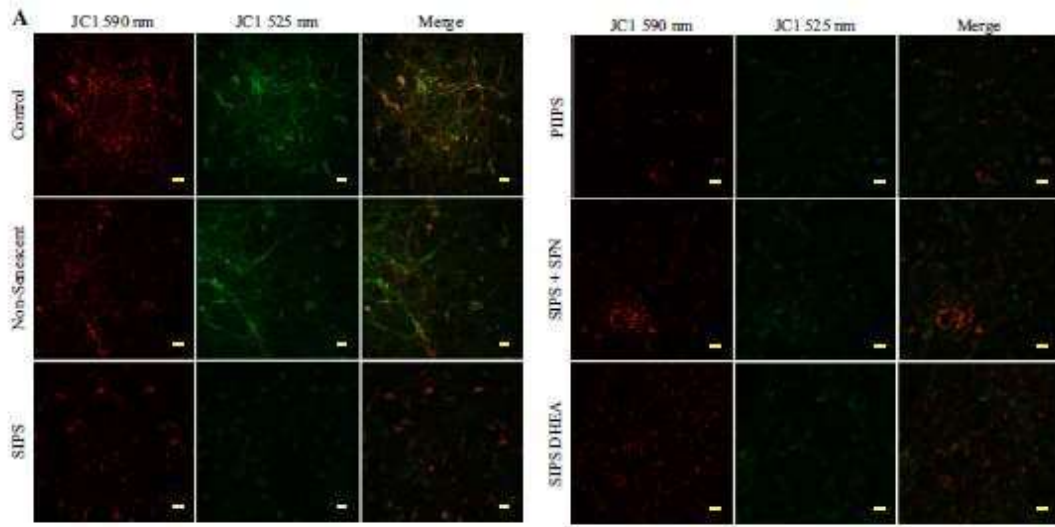


Fig. 4 Conditioned medium from senescent astrocytes does not affect neuron membrane potential, CM from senescent astrocytes treated or not with SFN or DHEA was diluted in neurobasal media and cultured primary neurons were exposed to it. The mitochondrial membrane potential was evaluated using the cationic colorant JC-1. **a** Representative micrographs of neurons and the fluorescence of the colorant JC-1 at 590 nm (green) and 525 nm (red). **b** Quantification of the 590/525 nm ratio of the signals. Control (*Ctrl*) refers to the neurons that were not exposed to CM, and “*non-senescent*” are neurons that were exposed to the CM obtained from non-senescent astrocytes. No statistical differences were found in this experiment, $n = 3$. Scale bar represents 100 μm

results have been seen in other studies comparing SIPS and PIIPS (Bitto et al. 2010; Torres et al. 2006), in which PIIPS-induced fibroblasts or astrocytes do not have the classical flattened morphology that do SIPS-induced cells. Although little has been studied concerning PIIPS, these data suggest that SIPS and PIIPS might have different mechanisms to establish senescence, and, as a consequence, different mechanism of cell communication through SASP, confirming what we reported previously (Maciel-Baron et al. 2016).

The SASP secretion has been proposed as a mechanism by which senescent cells drive different biological processes in diverse states of the organism life. The SASP displays beneficial effects, such as tissue patterning, wound healing, immune cell attraction, and cancer suppression, and also deleterious effects, as angiogenesis (although, angiogenesis is not always deleterious), and cancer promotion, by inducing proliferation, as well as contributing to the aging deterioration (Malaquin et al. 2016). Even though the SASP maintains a pro-inflammatory profile, the secretion of individual factors can vary depending on the senescence inducer (Maciel-Baron et al. 2016; Wiley et al. 2016), the time after senescence induction (Coppe et al. 2008), and even the presence of some senescent markers (Coppe et al. 2011), which makes the SASP a very complex attribute of senescent cells. Here, we found that the SASP from Wistar senescent astrocytes, contrasts with the typical profile commonly found in fibroblasts and epithelial senescent cells. One of the interesting results was the low concentration of IL-6, since this cytokine is one of the most conserved SASP factors, and it is associated with inflammation. In our study, IL-6 was similarly released in non-senescent and senescent astrocytes (Figs. 2, S3). However, when the IL-6 secretion was compared

between senescent astrocytes and fibroblasts, IL-6 secretion by the senescent fibroblasts was almost 8-fold higher than the one determined for senescent astrocytes, confirming that Wistar senescent astrocytes do not increase that interleukin secretion. There have been other reports in which IL-6 did not increase in senescent cells, both in astrocytes (Cohen et al. 2017) and in other cell types (Gonzalez-Meljem et al. 2017). Moreover, Purcell and coworkers performed gene expression profiling through RNA-seq in fibroblasts from a patient with Li-Fraumeni Syndrome in different types of senescent cells: RS, Adriamycin-induced senescence, H_2O_2 -induced senescence, and 5-aza-2-deoxycytidine-induced senescence, and did not find an equal IL-6 up-regulation in all of them (Purcell et al. 2014). Hence, IL-6 might be present in the SASP of some cells and not in others; this is an important point because this cytokine up-regulation might depend on the cellular type and on the senescent induction pathway. More mechanistic studies are needed to determine in which cases SASP includes or not IL-6.

In contrast, IL-1 α was highly secreted in Wistar senescent astrocytes. Other studies have also shown that IL-1 α secretion is increased in different cell types during RS (Hubackova et al. 2012), oncogene-induced senescence (Acosta et al. 2013), or senescence induced by different agents such as bleomycin (Orjalo et al. 2009), H_2O_2 , or Adriamycin (Purcell et al. 2014) and HIV retroviral therapy drugs (Cohen et al. 2017). This cytokine is known to be secreted short time after senescent induction and it is responsible for inducing the production of other SASP components in a redox-dependent manner (McCarthy et al. 2013). Therefore, we propose IL-1 α as a major component and marker of astrocyte's SASP instead of IL-6. Interestingly, one of the increased growth factors in Wistar senescent cells was G-CSF (CSF-3) (Fig. 2a, b). In the CNS, G-CSF has been reported to act as a neurotrophic factor, since it can induce neurogenesis, increase neuroplasticity and counteract apoptotic cell death (Pitzer et al. 2008; Schneider et al. 2005). The fact that G-CSF (CSF-3) is increased in the SASP from astrocytes points towards a protective action.

On the other hand, the SASP from senescent astrocytes included mainly the chemokines GRO α , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-2 and RANTES (Fig. 2a, b). Chemokines attract immune cells to eliminate pathogens or damaged cells. GRO α has been reported

to attract oligodendrocytes in the CNS (Omari et al. 2006). IP-10 attracts monocytes, macrophages, T cells, NK, and dendritic cells; and it has been reported to have an antitumoral activity and to inhibit angiogenesis (Angiolillo et al. 1995; Dufour et al. 2002). MCP-1 regulates migration and infiltration of monocytes, T cells and NK cells, having a redundant action with IP-10. Additionally, MCP-1 secretion has been also associated with some diseases, such as multiple sclerosis, cancer or cardiovascular disease (Deshmane et al. 2009). In the same way, although MIP-1 α , MIP-2 and RANTES are potent chemoattractants and have been associated with disease and chronic inflammation (Gadani et al. 2015), it has been also found that they suppress HIV activity (Gaertner et al. 2008; Xiang et al. 2004). With these results, we hypothesize that the SASP in senescent astrocytes might have as its major goal to attract immune cells to eliminate senescent cells as reported for other cells, and that the possible deleterious effect of the SASP would depend on the ability of immune cells to eliminate or not the senescent cells.

We have previously reported that SIPS and PIIPS in fibroblasts produce a different SASP profile (Maciel-Baron et al. 2016). PIIPS produced a less robust SASP than SIPS. However, those measurements were performed only at day 6. Here, we also found differences in the SASP profile between PIIPS and SIPS at days 6 and 12. PIIPS-SASP included chemokines, such as GRO- α , MIP1 α , MIP2, and RANTES, while these chemokines were absent in SIPS-SASP, at least at day 6. Nevertheless, at day 12 the SASP profiles from SIPS and PIIPS looked more alike. This was confirmed by the positive correlation between them (Table 1). Thus, it is possible that the differences in the SASP profile might be more evident at short times, depending on the cell-specific senescence program. But when CS is well established, the SASP controlling pathways converge to produce a unique profile. The time-dependence of the SASP variability has been well reviewed by Rodier's group (Malaquin et al. 2016), but the induction stimuli-dependent SASP has been poorly studied.

One of the principal aims in the field of senescence research is to suppress or eliminate the deleterious effects caused by the SASP (Malaquin et al. 2016). This has been attempted by two main lines: 1) eliminating senescent cells or 2) trying to reduce or modulate the SASP without eliminating senescent

cells. Both have obtained promising results (de Keizer 2017; Jeon et al. 2017; Laberge et al. 2012; Moiseeva et al. 2013; Wang et al. 2017). However, the absence of a unique and universal senescence hallmark limits these approaches. Moreover, it is not yet clear in which moment of the life of an organism it is safe or recommendable to eliminate senescent cells. Others have reported that molecules such as rapamycin (Laberge et al. 2015), metformin (Moiseeva et al. 2013), and glucocorticoids (Laberge et al. 2012), that modulate the redox state, are able to modify the SASP components. Nevertheless, all those experiments were done in fibroblasts. Here, we tested two drugs, SFN and DHEA, that are currently consumed by people without medical control, and that have been associated with anti-inflammatory or anti-aging effects (Amann and Peskar 2002; Greaney et al. 2016; Rutkowski et al. 2014).

As expected, these drugs had effects on the secretion from both, non-senescent and senescent cells. However, in a very interesting way, the effects were very different (Fig. 3). While SFN and DHEA reduced the non-senescent secretion of some pro-inflammatory cytokines, in both SIPS and PIIPS SASP profiles, the drugs increased the secretion of the anti-inflammatory IL-10, and reduced the secretion of the cytokines previously observed in the non-senescent astrocytes profile, namely GM-CSF, IL-12, IL-5, IL-6, and MCP-3, especially at day 12, promoting an anti-inflammatory profile. Excitingly, in SIPS and PIIPS astrocytes, SFN and DHEA increased IL-10 secretion, and at the same time decreased IL-1 α secretion, turning the SASP profile less pro-inflammatory. Nevertheless, SFN and DHEA increased the secretion of other chemokines, such as Eotaxin, GRO- α , MIP- α and RANTES, reinforcing the signals to attract immune cell for senescent cells elimination.

It is known that SASP production is mediated by IL-1 α action in a redox dependent manner (McCarthy et al. 2013), and since SFN is able to modify the redox state (Negrette-Guzman et al. 2013), this molecule might be able to abrogate IL-1 α -participation, and in this way prevent the formation of IL-1 α -induced components of the SASP. Moreover, it is known that SFN modifies redox-dependent pathways involved in cytokine production by activating Nrf2 and inhibiting NF- κ B (Dong et al. 2016). On the other hand, DHEA has been reported as an inflammatory mediator in various models and conditions (Rutkowski et al.

2014). For example, DHEA can control the balance between Th1 and Th2 lymphocyte populations (Pratschke et al. 2014), modulate the inflammation induced by bilateral femoral shaft fracture (Lichte et al. 2014), and regulate the production of IL-2, IL-10, IL-1 β , IL-6 and TNF (Rutkowski et al. 2014). However, its mechanism of action is still poorly understood due to the high number of metabolites produced from DHEA. It has even been suggested that another metabolite, different from DHEA, is the one who exerts the anti-inflammatory effect (El Kihel 2012). Independently of the metabolite that could carry out the anti-inflammatory action, there is a consensus that DHEA treatment reduces p38MAPK and NF κ B regulated cytokines, such as IL-6 and IL-8 (Rutkowski et al. 2014). Therefore, in order to verify the DHEA and SFN direct effect on SASP modulation, the participation of molecules such as Nrf2, p38MAPK and NF κ B has to be addressed.

It is important to notice that the two modulators did not return the SASP profile to the basal levels observed in non-senescent astrocytes, but they turned it less inflammatory, mainly by decreasing IL-1 α and increasing IL-10. This effect might have an important physiological effect by decreasing the SASP inflammatory profile, which is thought to contribute to brain neurodegeneration (Bhat et al. 2012). Moreover, the chemokines production conserved in PIIPS and SIPS senescent astrocytes treated with either SFN or DHEA suggests that, in the brain, senescent astrocytes could promote immune cells infiltration without increasing the inflammatory response.

As mentioned before, most of the studies performed to evaluate the SASP effect on adjacent cells are performed in fibroblasts or endothelial cells and are related to cancer induction or wound healing. Normally, cellular proliferation, migration, senescence induction or epithelial mesenchymal transition, are measured. But, since neurons have a limited proliferative capacity, none of the former studies are relevant. Therefore we searched for other physiological features and we chose mitochondrial membrane potential, since mitochondria have a central role in cellular physiology.

In our case, the SASP obtained from senescent astrocytes did not increase the number of SA- β -Gal positive neurons (data not shown). Likewise, no significant changes were observed in our study groups in regards to the mitochondrial membrane potential.

To our knowledge, this is the first approach to evaluate the SASP effects on neurons, and the negative finding is a good starting point to improve the experimental procedures. It is important to remark that the SASP secreted by senescent astrocytes during brain aging might be a constant low grade chronic effect, which in our model was difficult to reproduce, so the use of co-cultures could be a better approach to evaluate the SASP effects. Nevertheless, different experiments with dissimilar outcomes, such as ROS generation, excitability response, neuronal metabolism and others still need to be done. It would be interesting to explore these points in further studies.

Finally, more comparative studies concerning the differences within the SASP profile in diverse cellular types and senescence inducers are necessary in order to better understand the differences in the early stages of senescent cells, and the time dependence of the SASP regulation, which could improve our knowledge in the search of interventions in order to reduce the deleterious effects of senescent cells.

Acknowledgements The authors would like to thank Dr. Rocío González-Vieira from UAM-I for animal supply and Dr. Ruth Rincón Heredia from IPC-UNAM and the CBS-UAMI Confocal Core for confocal images acquisition and analysis. Dr. Anahí Chavarría for her guidance in the cytokines field. This work was supported by CONACyT grant FON.INST/298/2016, as well as the “Red Temática de Investigación en Salud y Desarrollo Social” from CONACyT. Maciel-Barón, Silva-Palacios and Morales-Rosales are CONACyT scholarship holders.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors have no conflicts of interest to disclose.

References

- Acosta JC et al (2013) A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* 15:978–990. <https://doi.org/10.1038/ncb2784>
- Amann R, Peskar BA (2002) Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. *Eur J Pharmacol* 447:1–9
- Angiolillo AL et al (1995) Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 182:155–162
- Bhat R et al (2012) Astrocyte senescence as a component of Alzheimer’s disease. *PLoS ONE* 7:e45069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045069>

Anexo II

ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING
Volume 00, Number 00, 2017
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/ars.2017.7112

FORUM REVIEW ARTICLE

Cellular Senescence, Neurological Function, and Redox State

Luis Ángel Maciel-Barón,^{1,*} Daniel Moreno-Blas,^{2,†} Sandra Lizbeth Morales-Rosales,^{1,*}
Vridiana Yazmín González-Puertos,¹ Norma Edith López-Díazguerrero,¹
Claudio Torres,³ Susana Castro-Obregón,² and Mina Königsberg¹

Abstract

Significance: Cellular senescence, characterized by permanent cell cycle arrest, has been extensively studied in mitotic cells such as fibroblasts. However, senescent cells have also been observed in the brain. Even though it is recognized that cellular energetic metabolism and redox homeostasis are perturbed in the aged brain and neurodegenerative diseases (NDDs), it is still unknown which alterations in the overall physiology can stimulate cellular senescence induction and their relationship with the former events.

Recent Advances: Recent findings have shown that during prolonged inflammatory and pathologic events, the blood–brain barrier could be compromised and immune cells might enter the brain; this fact along with the brain's high oxygen dependence might result in oxidative damage to macromolecules and therefore senescence induction. Thus, cellular senescence in different brain cell types is revised here.

Critical Issues: Most information related to cellular senescence in the brain has been obtained from research in glial cells since it has been assumed that the senescent phenotype is a feature exclusive to mitotic cells. Nevertheless, neurons with senescence hallmarks have been observed in old mouse brains. Therefore, although this is a controversial topic in the field, here we summarize and integrate the observations from several studies and propose that neurons indeed senesce.

Future Directions: It is still unknown which alterations in the overall metabolism can stimulate senescence induction in the aged brain, what are the mechanisms and signaling pathways, and what is their relationship to NDD development. The understanding of these processes will expose new targets to intervene age-associated pathologies.—*Antioxid. Redox Signal.* 00, 000–000.

Keywords: senescence, astrocytes, neurons, microglia, ROS, inflammation

Introduction

CELLULAR SENESCENCE IS A PARTICULAR phenotype characterized by permanent cell cycle arrest (137), accompanied by a lack of response to mitotic and apoptotic stimuli, as opposed to quiescence, a state in which cells are in a reversible cell cycle arrest (*i.e.*, stem cells). In

quiescent cells, reversibility of the cell cycle exit is driven by the transcriptional repressor hairy and enhancer of split-1 (HES1), which inhibits senescence and inappropriate differentiation (142). In both, quiescence and senescence, cell cycle arrest is controlled by cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs); but while quiescent cells are arrested in G₀ by p27/CDKN1B, in senescent

¹División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Department Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Iztapalapa, México.

²Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

³Department of Pathology and Laboratory Medicine, Drexel University College of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania.

*Posgrado en Biología Experimental, UAM.

†Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.

cells, proliferation is inhibited by p21/CDKN1A and/or p16/CDKN2A (34, 122, 184) (Fig. 1).

Cellular senescence was described by Hayflick and Moorhead in the 1960s following the observation that cells cultured *in vitro* ceased their proliferation after a limited number of replication rounds (69, 70). Currently, this type of senescence is known as replicative senescence (RS) and it is supposed to happen mainly *in vitro*. RS occurs due to telomere shortening after each round of replication; when telomeres reach a critical size, a persistent DNA damage response (DDR) is activated, culminating in proliferation arrest (20, 38). It is now accepted that many stimuli or stressors such as oxidative stress (101), radiation (95), hypoxia (165), autophagy impairment (83), and proteasome inhibition (163) among others are able to induce the senescence program, independently of cellular replication and telomere attrition. This type of senescence is known as premature senescence (PS). Moreover, overexpression of many oncogenes, such as *Ras*, *Akt*, *E2F1*, *Cyclin E*, *Mos*, and *Cdc6*, is also recognized to induce a PS state known as oncogene-induced senescence (OIS) (27).

Cellular senescence is not only restricted to the loss of replicative ability. In fact, it involves changes in gene expression, epigenetic regulation, alterations in mitochondrial homeostasis, redox state, disruption of energy metabolism and degradation of macromolecules, and multiple changes in

cellular metabolism (14, 159). Among overexpressed genes, the upregulation of galactosidase beta 1 (*Glb1*) is characteristic; this gene encodes for a lysosomal β -D-galactosidase known as senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal). Detection of SA- β -Gal activity is a widely used biomarker to detect senescent cells (46), although its increased activity is not the only feature to confirm a senescent phenotype (94), and it is not exclusive to senescent cells. Furthermore, since there is no unique and universal marker to detect unequivocally senescent cells, additional changes that occur in senescent cells should be used to identify them. Some of them are permanent cell cycle arrest (117), the presence of nuclear foci of DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence (DNA-SCARS) along with γ H2AX (a histone variant that is phosphorylated in response to DNA damage) that are evidence of DDR activation (139), increased heterochromatin foci called senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) and macro-H2A expression (an heterochromatin marker) (120), and lipofuscin accumulation (109). Cellular senescence is accompanied by the secretion of a diverse array of molecules such as cytokines, chemokines, growth factors, and proteases among others, known as senescence-associated secretory phenotype (SASP) (2, 25, 89), which has pleiotropic effects that will be discussed later. It is important to remark that not all senescent cells show each one of the aforementioned hallmarks and the occurrence of

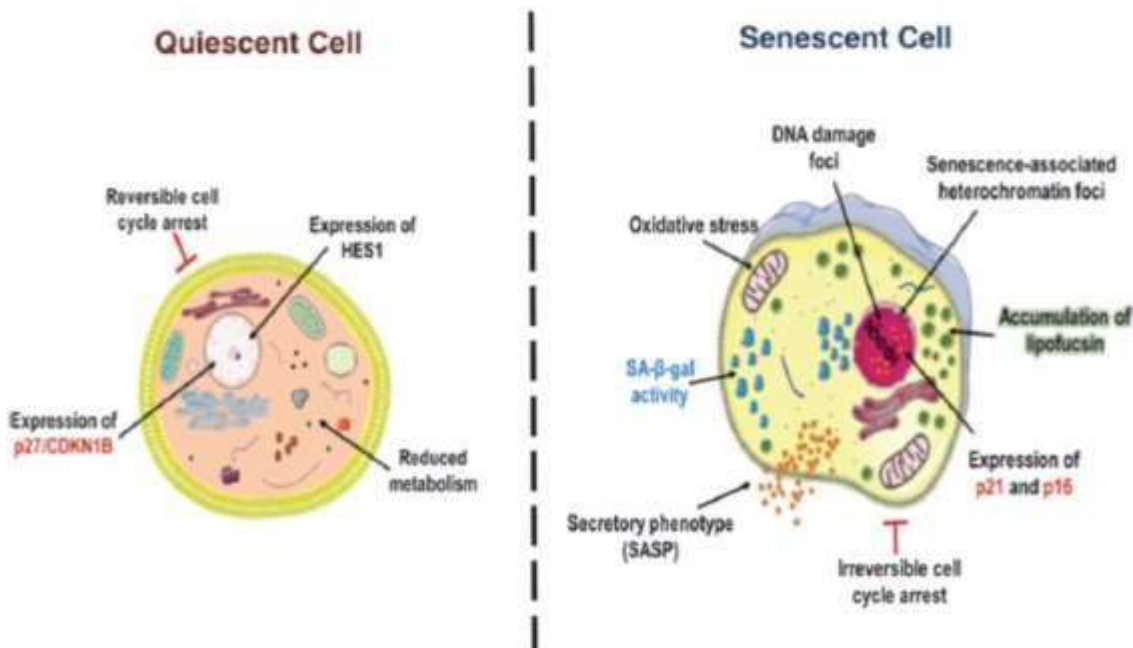


FIG. 1. Quiescent and senescent cells are different. Quiescent cells are in a reversible cell cycle arrest, able to respond to mitotic stimuli; the expression of the transcriptional repressor HES1 inhibits the acquisition of the senescent phenotype (142). In contrast, senescent cells do not respond to mitogenic stimuli, indicating they have an irreversible cell cycle arrest. Senescent cells also exhibit a variety of features not present in quiescent cells such as SA- β -Gal activity, senescence-associated heterochromatin foci, cell cycle inhibitors sustained expression, p21/CDKN1A and p16/CDKN2A. An essential characteristic of cellular senescence is the expression of the SASP, which is capable of modifying the microenvironment due to the function of secreted factors, including extracellular matrix modifiers, growth factors, and immune system modulators. HES1, hairy and enhancer of split-1; SASP, senescence-associated secretory phenotype.

some of those markers depends on the cell type and, sometimes, on the stimuli that induced senescence (Fig. 1).

Cellular senescence occurs both *in vitro* and *in vivo* (46) and it has been associated with many biological processes such as aging (21), tumor suppression and promotion (23, 137), chronic inflammation (20), embryonic development (118, 156), and recently with neurodegenerative diseases (NDDs) (11, 13, 35). In this review, we will describe cellular senescence in the brain and its relationship with the redox state and signal transduction.

Redox State Involvement in Senescence Induction Signaling Pathways

DDR is one of the main inductors of cell cycle arrest during senescence. It is known that during RS, sustained DDR is induced by telomere erosion due to exhaustive DNA replication cycles. Moreover, reactive oxygen species (ROS) and increased oxidative stress are acknowledged as the principal DDR activators during PS, in particular stress-induced PS (SIPS) (20, 37). DNA is an important biological target for free radicals; however, superoxide anion (O_2^-) has a relatively low activity to react with it. Therefore, the main free radical that reacts with DNA is the hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$), although peroxynitrite ($ONOO^-$) and singlet oxygen (1O_2) have also been reported to interact with DNA in several biological systems (67). ROS and reactive nitrogen species (RNS) can generate DNA damage by different mechanisms such as adducts in nitrogenous bases and DNA-protein crosslinks, as well as single- and double-strand breaks (SSB and DSB), although 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) is a selective marker of oxidative DNA damage (71), whose quantification has gained popularity since it is one of the most abundant oxidative DNA lesions that correlates with mutagenesis, carcinogenesis, and aging (29, 102). During DDR through senescence induction, SSB and mainly DSB are assumed to be the principal signaling activators. However, not much research has been done to evaluate the participation of abasic sites or adduct formation in signaling cell cycle arrest.

During DDR, DNA damage (SSB and DSB) is detected by phosphorylation of the histone variant γ H2AX, which activates the RAD50/NBS1/MRE11 sensor complex starting the activation of the transducer protein kinases, ataxia telangiectasia mutated (ATM) or ataxia telangiectasia and rad-related protein (ATR). ATM and ATR targets are checkpoint kinases, CHK2 and CHK1, respectively, which after being activated by phosphorylation, in turn activate the transcription factor and tumor suppressor p53 (76, 136), which regulates the expression of the cell cycle inhibitor p21/CDKN1A, a major participant during cellular arrest.

Another key protein that controls proliferation arrest is the retinoblastoma protein (pRB). Particularly, pRB and other members of its family, such as p107 and p130, are transcriptional repressors of E2F family transcription factors. These factors play an essential role in supporting the proliferative arrest during cellular senescence (26, 37). The activities of the members of this family are regulated by phosphorylation, protein-protein interactions, and other modifications. In proliferating cells, cyclin-dependent kinases (CDKs), including CDK2, CDK4, and CDK6, along with their cyclin partners, mainly cyclin D1, induce pRB hyperphosphorylation. The

phosphorylation induces a conformational change in pRB, which abrogates its binding to E2F, resulting in transcription of required genes to start DNA replication and cell cycle progression (120). In senescent cells, CDK-cyclin complexes are inactivated by CDKIs. There are two classes of CDKs: (1) CDK-interacting protein/kinase inhibitory protein (CIP/KIP) family (p21/CDKN1A, p27/CDKN1B, and p57/CDKN1C) and (2) inhibitor of kinase 4 (INK4) family (p16/CDKN2A, p15/CDKN2B, p18/CDKN2C, and p19/CDKN2D). Members of CIP/KIP family can inhibit any CDK, while INK4 family members inhibit specifically CDK4 and CDK6, which are crucial in G1-S progress. For this reason, INK4 family members are known as G1-phase inhibitors (125). During cellular senescence, p21/CDKN1A and p16/CDKN2A expression considerably increases. The CDK inhibitor p21/CDKN1A is overexpressed due to the action of its transcription factor p53, as mentioned above, while p16/CDKN2A is overexpressed in a p53-independent manner; p21/CDKN1A and p16/CDKN2A can act together to inactivate CDKs and avoid pRB-family phosphorylation inducing cell cycle arrest (75, 117).

It has been demonstrated that inactivation of p53 and pRB allows senescent cells to restart DNA replication; however, even in this case, senescent cells are incapable to start cellular proliferation, suggesting an additional blocking in G2 or M phase of the cell cycle (117). In this sense, it has been reported that activation of p16/CDKN2A-pRB pathway induces ROS overproduction, which can activate a downstream mediator called PKC δ kinase that blocks cytokinesis (182).

During OIS, it has been suggested that DDR is induced by a sustained oncogenic signaling (23). Di Micco *et al.* demonstrated that cells in S phase exposed to oncogenic stress showed a significant increase in the number of active replication forks and that these cells exhibited defects in replication fork progression, resulting in ATM and ATR activation, suggesting that phase S entrance was crucial for OIS. It is important to mention that only the overexpression of oncogenes capable of generating DNA damage is able to induce senescence as a tumor suppressor mechanism (44).

PI3K/AKT/mTOR pathway has also been related to OIS induction. This pathway is often constitutively active in many types of cancers due to genetic or epigenetic inactivation of the tumor suppressor phosphatase called phosphatase and tensin homolog (PTEN) along with the overexpression or activation (due to an active mutation) of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and/or serine/threonine kinase or protein kinase B (AKT) (50). Recent studies have reported that sustained activation of this pathway is able to induce OIS, for example, a constitutively active myristoylated form of AKT-induced OIS in a murine fibroblast primary culture and in human endothelial cells through p53/p21/CDKN1A axis (112). This event is mediated due to downregulation of the transcription factor FOXO3a, which is a downstream substrate of AKT. FOXO3a increases the transcription of antioxidant enzymes that eliminate ROS, such as Mn-superoxide dismutase (MnSOD). AKT activation inhibits FOXO3a transcriptional activity, thus decreasing MnSOD levels and increasing ROS, which in turn activate the p53/p21/CDKN1A axis, and consequently inducing cellular senescence (177).

Additionally, PTEN loss induces p53-dependent OIS in mouse fibroblast primary cultures since PTEN absence induces p19/ARF expression, which is a noncanonical inhibitor of the E3-type ubiquitin ligase MDM2, whose specific target

is p53. p19/AFR overexpression provokes p53 stabilization, increasing p21/CDKN1A expression and inducing cellular senescence (30). Similar effects have been observed *in vivo* when PTEN is depleted in premalignant lesions in mouse prostate epithelium, supporting the tumor suppressor function of cellular senescence, at least in OIS (177). A key role for mechanistic target of rapamycin (mTOR) signaling during OIS in human fibroblasts has also been suggested. Inhibition of mTOR complex 1 (mTORC1) by rapamycin, or silencing mTOR or Raptor with shRNAs, delays RS and OIS, whereas mTOR complex 2 (mTORC2) inhibition does not (8, 86). Moreover, mTOR has also been involved in SASP secretion (91), but this will be discussed later.

An alternative pathway that controls proliferation arrest in senescent cells, in an independent manner to telomeric signals, is the ERK/p38/MAPK pathway. This induction occurs due to activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase (ERK) and accumulation of mitogen-activated protein kinase family (MAPK) such as MAPK MKK3 and MKK6 that culminates in the p38/MAPK activation. p38/MAPK has the ability to activate both p53 and p16/CDKN2A. This mechanism of senescence induction has been found in OIS and SIPS and is orchestrated principally by ROS (117, 177). Interestingly, the loss of proliferative capacity in senescent cells occurs very early and is associated with a reduction in the expression of early response genes such as *c-fos* and *id-related* genes (68, 145). These gene products alter the ERK/MAPK pathway, leading to the induction of senescence. The declined expression of these genes has been related to a decreased binding activity of their respective transcription factors such as SRF and AP-1 (146). More recently, Torres *et al.* proposed a model whereby the reduced activity of proteasome leads to stabilization of MKP-2, a phosphatase implicated in dephosphorylation and inactivation of nuclear p-ERK, therefore decreasing p-ERK nuclear levels. The former resulted in decreased ERK activity and diminished SRF binding to the *c-fos* promoter, leading to cell cycle arrest and thus inducing senescence (162, 167).

It is well known that complete abrogation of proteasome activity induces apoptotic cell death (32, 100, 130), therefore cellular senescence induced by proteasome impairment must only be attained as a partial inhibition, and some activity should be preserved (13, 163). This kind of senescence has been called proteasome inhibition-induced PS (PIPS) (105). Partial inhibition of the proteasome promotes a sublethal accumulation of ubiquitinated proteins that cannot be degraded, inducing cellular senescence instead of apoptosis (32). Accordingly, it has been reported that proteasome inhibitors induce ROS and mitochondrial dysfunction, generating an important effect on protein ubiquitination and protein degradation (164). However, depending on the proteasome inhibitor and the concentrations used, it might be possible that PIIPS cells would still be able to buffer redox state and maintain a healthy glutathione-redox balance. Other reports have shown that mouse primary fibroblasts induced to PIIPS can preserve their redox state better than SIPS and RS (105). In this context, one proposed hypothesis is that primary fibroblasts induced to PIIPS might modulate the protein synthesis rate to avoid a greater accumulation of ubiquitinated proteins, which might otherwise be lethal.

It has been suggested that *in vivo*, senescence is mainly attained as a response to the different stressors more than due

to telomere attrition (137). Hence, numerous transduction pathways might overlap and entail a constant cross talk among them. Conversely, an acknowledged common feature in all described types of senescence is a shift to a pro-oxidant redox state (45, 80, 108, 116), as illustrated in the signaling pathways described above. Therefore, numerous articles have reported a delay in cellular senescence induction when the cells are treated with antioxidants, such as Trolox (168), phenolic diterpenes (22), and polyphenols (148), ascorbic acid (85), melatonin (183), and other molecules that modify redox state such as rapamycin (96) and resveratrol (74) or sirtinol (107). Furthermore, differences in oxygen levels during culture conditions have also been studied, and atmospherically standard conditions (20%) are known to provoke earlier DDR and senescence induction than oxygen physiological levels (3%) (131), suggesting that whereas the milieu becomes more oxidant, distinct pathways might be activated by diverse senescence inducers leading to diverse and characteristic outcomes in each senescence program. An important consequence might be the secretion of distinctive SASP components, depending on the senescence pathway, which ultimately could differently affect neighbor cells and might induce diverse diseases, including cancer and aging.

Senescence-Associated Secretory Phenotype and Redox Regulation

One of the most interesting features of senescent cells is the complex production and secretion of cytokines, chemokines, growth factors, metalloproteinases, and ROS. These components within the SASP can modulate paracrine and autocrine responses (25). Almost 40–80 secreted factors have been reported in different cell types from different species (56), principally in fibroblasts and epithelial cells, which entered senescence by different stimuli (105). Among the principal secreted factors are the interleukins 6, 7, and 8 (IL-6, IL-7, and IL-8) that stand out as well as the chemokine monocyte chemoattractant protein 2 (MCP-2) and macrophage inflammatory protein 3 α (MIP-3 α), the growth factors, growth-regulated oncogene α (GRO α) and the hepatocyte growth factor, matrix metalloproteinases (MMPs), and insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) (24, 25).

Due to its eclectic profile, SASP has been associated with both beneficial and detrimental effects. Positive consequences include the tumor suppressor effect (25), along with wound healing and tissue regeneration (42), embryonic tissue remodeling (118, 156), and immune system activation (1). Effects that have been related to undesired outcomes include age-related illnesses, cancer and NDD (11), tissue disruption and dysfunction (55), chronic inflammation (56, 137), proliferation induction and accelerated tumor growth (24, 88), angiogenesis (129), and differentiation and epithelium-mesenchymal transition (88, 98). These SASP pleiotropic effects depend on the cell type that receives the stimuli and on the biological context that is being studied (24).

The molecular mechanisms that drive the SASP secretion are not completely elucidated, but it is known that most SASP components increase at mRNA level (25). Its regulation is being addressed by established transcription factors associated with the inflammatory response such as the nuclear factor κ B (NF- κ B) and CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β) (2, 89). C/EBP β depletion in epithelial cells and

fibroblasts decreased IL-6 and IL-8 expression (89) and NF- κ B inhibition significantly diminished ENA-78, NAP-2, MCP-1, MCP-4, MIP-3 α , and some members of the GRO family (2). Both factors, C/EBP β and NF- κ B, are activated by genotoxic stress and their activation is independent of p53 and p16/CDKN2A. Hence, it has been suggested that the SASP is a proliferating arrest-independent hallmark of senescent cells. However, it was also reported that sustained DDR is required for robust SASP production. DDR component depletion, such as ATM, NBS1, or CHK2, inhibits the expression of IL-6, IL-8, and several GRO family members. Besides, it is also known that NF- κ B is an important target of ATM (24, 25, 138). κ B κ , an atypical NF- κ B inhibitor, has also been reported as a molecule capable of regulating the SASP (5), acting not only as a repressor but also as an activator of NF- κ B target genes, increasing their expression (Fig. 2).

SASP components are detectable almost 6–10 days after senescence induction depending on the cell type, therefore it has been suggested that other pathways besides DDR must be involved. p38/MAPK has recently been proposed as a candidate to control SASP secretion. p38/MAPK, like other members of the MAPK family, is activated by phosphorylation usually a few minutes after an acute stress and its activation is preserved during several hours. Furthermore, p38/MAPK is important to sustain cell cycle arrest by activating the p53 and pRb/p16/CDKN2A pathways. It is known that p38/MAPK upregulates the expression of specific cytokines, such as IL-6, IL-8, and TNF- α , in a diversity of biological contexts usually after an acute stress (56).

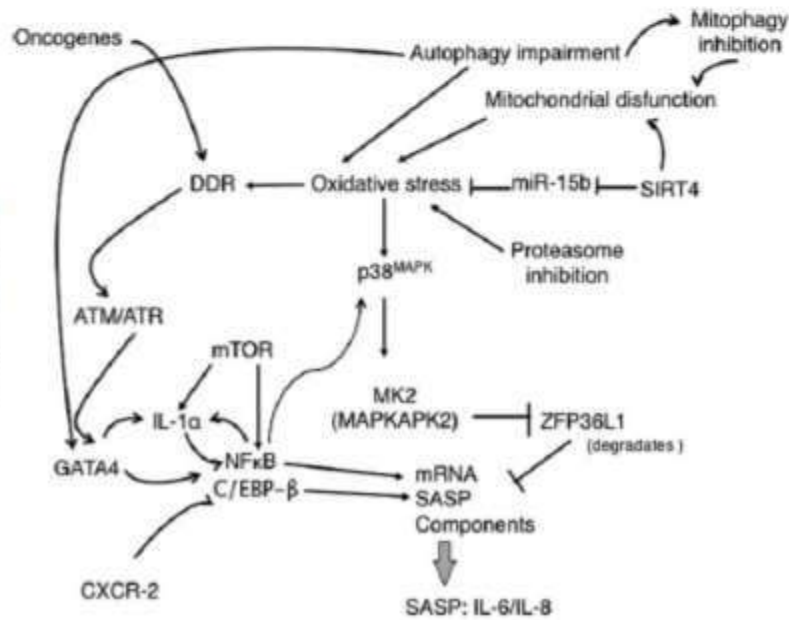
In 2011, Freund *et al.* showed the role of p38^{MAPK} in SASP secretion in a DDR-independent manner. They reported that human HCA2 fibroblasts induced to senescence by X radiation and OIS gradually activate p38/MAPK, being the highest activation peak almost 8–10 days after senescence induction.

p38/MAPK inhibition with SB203580 decreased the secretion of 25 SASP factors in genotoxic stress-induced senescence and 34 SASP factors in OIS. (57). Further reports have corroborated that other inhibitors of the p38/MAPK-MK2 pathway can also suppress the SASP (6, 61) (Fig. 3). Interestingly, MAPK pathways have been shown to be activated not only by receptor ligand interactions but also by ROS (152, 153), therefore the use of antioxidants to regulate p38 (175) or to modulate redox state (40) and decrease proinflammatory SASP components is also explored.

An important feature of diverse cytokines is that they are able to regulate their own expression in an autocrine way. This is the case for IL-1 α , another important component within the SASP, whose autoregulation mechanisms involve NF- κ B activation. IL-1 α also promotes IL-6 and IL-8 expression in senescent cells and inhibiting directly IL-1 α or its receptor decreases the cytokine expression (56). McCarthy *et al.* showed that H₂O₂ levels increase IL-1 α expression at the transcriptional level and can be modulated with the use of antioxidants. Moreover, IL-1 α processing to its active form is performed by Ca²⁺-dependent protease calpain and therefore is influenced by intracellular Ca²⁺ levels. The cellular redox environment may indirectly influence this differential processing event since alterations in redox state are often coupled with shifts in Ca²⁺ homeostasis. This redox-dependent expression and subsequent processing of IL-1 α provide a therapeutic avenue to limit the activity of this central SASP regulator (110) (Fig. 4).

Other groups have confirmed redox state involvement on SASP production. Recently, Lang *et al.* found that miR-15b function prevented SIRT4 upregulation in senescent cells. Increased SIRT4 negatively impacted on mitochondrial function and contributed to the development of a senescent phenotype. They showed that miR-15b inhibition, in an SIRT4-dependent manner, increased mitochondrial ROS,

FIG. 2. Signaling pathways that drive SASP secretion. The figure shows how different senescence induction stimuli, such as oncogenic stress, autophagy impairment, and mitochondrial dysfunction, are associated with oxidative stress increment and DNA damage response activation and culminate in SASP secretion.



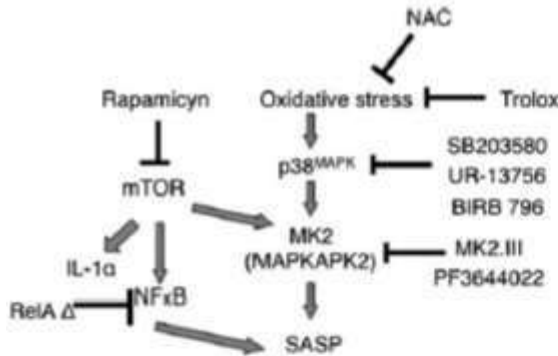


FIG. 3. Oxidative stress and mTOR inhibition prevent SASP secretion. Different antioxidant molecules and the classical mTOR inhibitor, rapamycin, are able to modulate or impede SASP secretion. The same was observed when p38 and MK2 (MAPKAPK2) chemical inhibitors were used.

decreased mitochondrial membrane potential, and modulated SASP-component mRNA levels. These suggest that miR-15b might be a negative regulator of stress-induced SIRT4 expression counteracting mitochondrial dysfunction during cellular senescence and regulating the SASP (93) (Fig. 2).

JAK/STAT pathway has also been involved in SASP regulation since inhibition of this pathway decreases as well the expression of several SASP components (176). Furthermore, Dasgupta *et al.* (40) proved that cellular aging is associated with an increase in MMP-1 expression that involves alterations in steady-state ROS production, leading to Janus family tyrosine kinase (JNK) activation. JNK activation is mediated by redox alterations, so the activation of this transduction pathway is able to regulate kinases and phosphatases that might also be related to SASP production.

Recently, SASP production has also been related to autophagy, and the Globin transcription factor 4 (GATA4) has also been proposed as an SASP regulator (82). During normal conditions, GATA4 binds to p62 to induce its selective degradation through autophagy. During senescence, the binding between GATA4 and p62 is lost, leading to GATA4 stabilization and consequent NF- κ B activation.

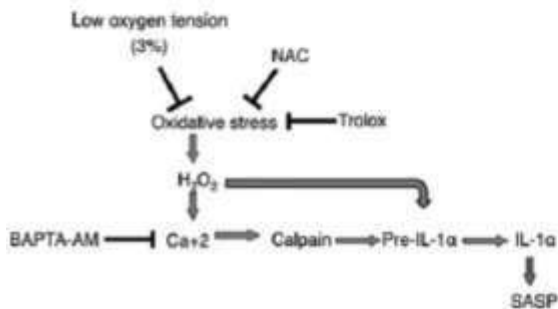


FIG. 4. Inhibition of IL-1 α processing also modifies SASP secretion. Calcium inhibitors, antioxidant molecules, or oxygen tension can inhibit IL-1 α cleavage and decrease SASP secretion.

Several compounds such as glucocorticoids, corticosterone, and cortisol are able to inhibit the secretion of SASP components such as IL-6, IL-8, MCP-2, VEGF, IL-10, and RANTES among others in human fibroblasts (92) due to IL-1 α /NF- κ B inhibition. Metformin was also able to decrease SASP secretion acting on the same signaling pathway (113).

Two articles have been recently published in which not only rapamycin was shown to modulate the SASP but also mTOR's role—participation in the secretion of some SASP components—was confirmed. In the first one, mTOR impacted again in the IL-1 α /NF- κ B pathway (91), and in the second report, rapamycin is proposed to act by regulating p38/MAPK and MAPK-activated protein kinase 2 (MAPKAPK2) through eukaryotic translation factor 4E-binding protein (4EBP1) (72). In both cases, SASP proinflammatory components decreased (Fig. 3).

In summary, cellular redox state is an important parameter in controlling the SASP. This finding is of paramount significance since it provides a new strategy to modulate the proinflammatory SASP components and regulate their harmful effects on neighbor cells.

At this point, it is pertinent to indicate that cellular senescence has been extensively studied in mitotic cells such as fibroblasts and cancer cells. Hence, all the previous information related to molecular signaling during senescence, SASP and its effects on neighbor cells, has been obtained predominantly using those kinds of cells. Most of the studies were carried out mainly in WI38 or IMR90 cells. WI38 is a human diploid cell line derived by Leonard Hayflick from a normal Caucasian female embryonic (3 months of gestation) lung tissue. WI38 and IMR90 cells have a finite lifetime of ~ 50 population doublings (CPD). W.W. Nichols derived the IMR90 cell line also from a normal Caucasian female embryonic (16 weeks of gestation) lung tissue and it endures ~ 58 CPD. Other study models are human diploid foreskin fibroblasts (BJ) with ~ 61 CPD and mouse models such as mouse embryonic fibroblasts or mouse lung fibroblasts (133) with shorter CPD ($\sim 6-8$).

Still, new models are being studied since senescent cells are present in various tissues, such as placenta (7), hepatic stellate cells (87), chondrocytes (84), vascular smooth muscle cells (160), and keratinocytes (121). Interestingly, the central nervous system (CNS) is not the exception, and this will be the subject of discussion of the following sections.

Energetic Metabolism and Cellular Senescence in the Brain

Senescent cells have recently been observed in CNS (11, 13, 35), so understanding their participation is very important to comprehend brain deterioration during aging as well as the progression of various NDDs. The discovery of senescent cells in the brain is not surprising since this tissue is known to be highly susceptible to ROS because of its high aerobic metabolism, relying on glucose oxidation and increased mitochondrial activity (52). The brain also presents low levels of antioxidant enzymes, in contrast to the high activity of some pro-oxidant enzymes, as well as a constant auto-oxidation of catecholamines and ascorbate, along with elevated lipid concentrations that are more vulnerable to oxidation (3). It is also recognized that cellular energy metabolism and redox homeostasis are perturbed in the aged brain as well as in NDDs

such as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) (15, 43). The deregulation of neuronal mitochondrial fission-fusion processes could also play a fundamental role in these pathologies (31, 150). However, it is still unknown which changes or alterations in the overall metabolism of an organism can stimulate cellular senescence induction in the aged brain, what are the mechanisms and signaling pathways, and what is their relationship to NDD development.

In peripheral tissues, prolonged inflammatory cascades lead to the activation of multiple cellular stress mechanisms that impair cell function and organ metabolism (66). The blood-brain barrier (BBB), which sits at the interface between the CNS and the periphery, is a target of inflammatory and oxidative insults (49). If the BBB is compromised, immune cells might enter the brain; this fact along with the brain's high oxygen dependence besides with its low antioxidant capacity might result in oxidative damage to macromolecules and DDR, which are cellular senescence, aging deterioration, and NDD common features (134).

The aging process is accelerated when metabolic and cardiovascular diseases are present, and the risk of illness increases with age (17). Many predisposing conditions, which increase during aging, such as obesity, insulin resistance, inflammation, changes in the activity of the hypothalamus-hypophysis suprarenal axis, stress, and hypertension, also contribute to increase in metabolic syndrome prevalence. Elderly people often have impaired glucose metabolism, reduced expression and translocation to the plasma membrane of neuronal glucose transporters, GLUT3 and GLUT4, and an insulin imbalance with altered PI3K/AKT pathway- and c-Jun N terminal kinase (JNK) signaling (79, 180). Altogether, along with impaired mitochondrial function, increased oxidative stress (62) could lead to cellular senescence induction in the brain. The evidences to link systemic metabolic alterations with brain cellular senescence induction are still not enough, but some interesting studies are being researched.

A study by Wilkinson *et al.* confirmed that thiamine levels are lower in older people, including those without major medical illness. This thiamine deficiency (TD) is associated with a diffuse decrease in cerebral glucose metabolism and in cholinergic neurotransmission that affects multiple organs and systems (173). The CNS is sensitive to TD because of its participation in metabolic pathways and neurotransmitter synthesis (171). TD causes mild impairment in energetic metabolism, neuroinflammation, and neurodegeneration, as well as oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and autophagy in the brain (99).

Another emerging evidence that links metabolism and brain senescence is wingless-type MMTV integration site family member (WNT) signaling. WNT is the upstream extracellular effector that when activated, stimulates several intracellular signaling pathways. Increased risk for type 2 diabetes has been linked with specific WNT component modifications (65). WNT/ β -catenin signaling pathway regulates whole-body metabolism in mammals by altering the behavior of multiple cell types and tissues involved in growth, insulin secretion, and energy expenditure (147). WNT signaling is also strongly implicated in adipose tissue control, glucose homeostasis systemic regulation, and adipogenesis during obesity (58). Recent evidence indicates that WNT proteins participate in synapse remodeling and function (126, 127). Therefore, the dysregulation of canonical and non-

canonical WNT signaling pathways and their differential modulation during mitochondrial processes have been associated with mitochondrial dysfunction and neurodegeneration (115). Thus, it is possible to assume that all these metabolic changes may promote senescent cell appearance in the brain.

Cellular Senescence in Microglia

The microglia, a type of glial cells, are the brain-resident macrophages representing primary immune cells in the CNS. They are responsible for CNS surveillance and their distribution throughout the brain varies depending on the cerebral structure. In healthy brain, the microglia are in a quiescent state, but even in this state, they have a fundamental role in monitoring synapse functionality, regulating neuronal activity, and neurogenesis (166). Microglia can respond to a variety of stimuli, such as parasitic, viral, or bacterial infection, triggering a classical inflammatory response (64). They also respond to trauma, ischemia/reperfusion, autoimmune injury, or chemically induced injury (172). Microglia are known to change through life, acquiring an activated phenotype, which has been associated with the CNS increased inflammatory environment during NDD development (172). Furthermore, activated microglia display morphological changes that include reduction of their ramified processes, accounting for the decrease in their physiological functions (174).

Aged microglia change their surface antigen pattern by upregulating MHCII, CD11b, CD11c, and CD68, as well as the pattern recognition receptors, Toll-like receptor 4 (TLR4), CD14, and scavenger receptors (73, 97, 178), all of them related to the activated microglial phenotype (124). As a result of TLR stimulation, microglia can produce the inflammatory cytokines mentioned above as part of the SASP through NF- κ B activation; at the same time, increased mitochondrial ROS production also activates NF- κ B (41). Moreover, aged microglia are over-responsive, they have an enhanced IL-6, IL-1 β , and ROS production in response to lipopolysaccharide (LPS) than younger microglia (149, 161). Increasing ROS generation also results from the lysosomal-mitochondrial axis dysfunction; it has been reported that microglia accumulate lipofuscin as a consequence of increased phagocytosis and lipid aggregates incompletely degraded by the autophagy mechanisms as a result of decreased proteases (cathepsins). Lysosomal dysfunction increases oxidative stress, decreasing antioxidant response and promoting mitochondrial damage (119). These lead to an even more oxidative environment, which activates NF- κ B, and might also induce cellular senescence. It has been reported that microglia from healthy aged mice have increased basal levels of proinflammatory cytokines, such as IL-6, TNF- α , and IL-1 β , and decreased anti-inflammatory ones such as IL-10 and transforming growth factor- β (TGF- β) rather than neonatal and adult mouse microglia (149, 179). It has also been reported that in aged organisms, microglia undergo structural abnormalities characterized by cell senescence phenotype mainly characterized by cytoplasmic degeneration (157).

On the other hand, patients with AD have increased cerebrospinal fluid and plasma TGF- β levels (140); nonetheless, aged microglia present an unpaired TGF- β 1-SMAD3 signaling leading to abnormally activated microglia and the loss of phagocytic A β peptide activity (161).

The microglial aberrant activation during aging was recently described as senescent microglia. This was confirmed by the observation of telomere shortening; in human brains, which contain high levels of amyloid aggregates, senescent microglia increased in comparison with normal aging brain (53, 54). Repeated LPS stimulation has also been shown to promote a microglial senescence phenotype, confirmed by increased SA- β -Gal activity (181).

The existence of activated microglial phenotypes during aging has lately gained interest because these cells represent the main immunological cells in the brain (9). During persistent activation, microglia might become senescent and foment an inflammatory environment in the brain due to SASP secretion. SASP is known to have autocrine and paracrine effects, hence inducing senescence in neighbor cells, such as astrocytes and neurons, and accounting for normal brain aging deterioration and age-related NDDs (Fig. 5).

Cellular Senescence in Astrocytes

Astrocytes are one of the most studied brain cells that function within the CNS to maintain homeostasis, including ions, water, and neurotransmitter regulation, BBB maintenance, CNS metabolism contribution, and participation in the

synaptic transmission as part of the tripartite synapse (144). Likewise, astrocytes have also been acknowledged as key players during brain inflammation due to their participation in innate immunity (51). Therefore, the occurrence of senescent astrocytes in the brain was predicted to contribute to brain decline during aging and accelerate neurological pathologies through the SASP (11, 36, 141).

One of the first approaches to study astrocyte senescence was done by Pertusa *et al.* They found that astrocytes from 2-day-old rats showed an increased SA- β -Gal activity after 90 days *in vitro* (DIV). Although no other senescence markers were evaluated, impaired mitochondrial activity, increased ROS and NO production, augmented glutamate uptake, and decreased neuroprotective capacity were observed in the senescent astrocytes (132).

In 2010, Torres *et al.* reported replicative (RS) and premature (SIPS) senescence in rodent and human astrocytes. Interestingly, they found that *in vitro*, astrocytes reach RS more quickly (\sim 15 CPD) than other cell types, such as fibroblasts (\sim 50 CPD). Moreover, astrocytes were shown to be very sensitive to oxidative stress and proteasome inhibition to enter PS. This finding, coupled with the fact that brain consumes most of the body oxygen (135), suggested that *in vivo*, astrocytes probably senesce faster than fibroblasts

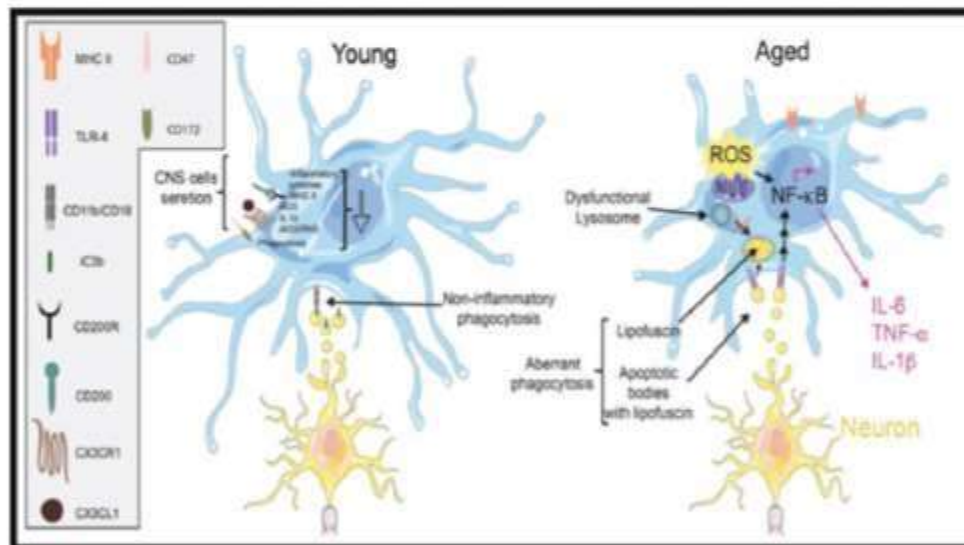


FIG. 5. Young quiescent and aged activated microglia. Young quiescent microglia are in constant surveillance within the CNS system. Microglia interact with cellular components such as neurons, astrocytes, and oligodendrocytes and their secretion through ligand-receptor communications, thus allowing the quiescent phenotype, characterized by reduced inflammatory cytokine secretion, MHC II (due to CD200-CD200R interaction); reduced ROS production, IL- 1β , iNOS, RNS (due to CX3CL1-CX3CR1 interaction); and reduced phagocytosis (due to CD47-CD172 interaction). Furthermore, quiescent microglia phagocytose apoptotic bodies without inflammatory response through the interaction of CD11b/CD18 present in the microglia with iC3b ligand present in the apoptotic body, hence microglia prevent the accumulation of cellular debris. Aged microglia are characterized by dysfunctional activation. The phenotype changes, cells decrease their branched processes, and acquire an amoeboid shape. Besides, microglia upregulate some surface receptors such as MHCII and TLR4, classical for activated microglia. The activated transcription factor NF- κ B enhances the transcription of inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , and IL- 1β), soon after, these inflammatory components were secreted. The mitochondrial dysfunction increases ROS production; ROS could activate NF- κ B reinforcing the production of inflammatory cytokines. If phagocytosis is defective, microglia can engulf danger components, including apoptotic bodies with lipofuscin, derived from neurons; nevertheless, it could not be degraded owing to dysfunctional lysosomes (reduced cathepsins), thereby microglia increase lipofuscin aggregates. CNS, central nervous system; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species.

(13). In 2012, the same group reported the presence of senescent astrocytes in samples obtained from the frontal cortex from postmortem elderly persons as well as AD patients (11). Interestingly, a significantly higher percentage of senescent cells were found in AD compared with normal age-matched individuals. At the same time, β -amyloid₁₋₄₂ ($A\beta_{1-42}$) was found to induce senescence *in vitro* in a concentration-dependent manner (11). Most recently, they showed the transcriptional changes that occur in human astrocyte senescence induced by oxidative stress.

Other astrocyte senescence inducers have been reported such as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) (123) and ammonia (63); in both cases, treatments induced ROS production, which triggered the senescence response. Interestingly, TCDD-induced senescence was associated with the WNT- β -catenin pathway, while ammonia-induced senescence was triggered by p38/MAPK and p53-dependent activation.

SASP analysis in senescent astrocytes is still an emergent field and few works have been published concerning it, but since they might display an immune function (51), astrocytes are potential SASP producers in the aging brain (141). Bhat *et al.* analyzed the SASP of $A\beta_{1-42}$ -induced senescence and found a significant secretion of IL-6, IL-8, ICAM-1, GM-CSF, and RANTES among others; this secretion was triggered by p38/MAPK signaling (11). The p38/MAPK central role in controlling astrocyte senescence and SASP secretion was modeled by Mombach *et al.* using logical framework tools (114).

Recently, Crowe *et al.* published the transcriptome changes in human fetal astrocytes during oxidative SIPS. Genes related to inflammation, extracellular matrix modification, and apoptosis resistance were upregulated, while genes associated with CNS development, differentiation, and carbohydrate and glycoprotein metabolism were downregulated, suggesting that senescence-related changes might impact the pathogenesis of age-related brain disorders (28).

Since astrocytes exert substantial effects on neurons, the changes in astrocytic physiology may impact neuronal functions (78). For example, lactate generated during anaerobic glycolysis in astrocytes supports neuronal oxidative metabolism (106). However, an *in vivo* magnetic resonance spectroscopy study revealed a reduced neuronal mitochondrial metabolism along with an increased glial mitochondrial metabolism in human aged brains (18). Consequently, when mitochondrial oxidative metabolism is enhanced, they might switch their neurotrophic role to a neurotoxic one (78), demonstrating that their effects may be neuroprotective or neurotoxic depending on the kind of secreted factors. SASP-secreted factors such as IL-6, have shown detrimental effects in neurons (19, 77), but others, as neural growth factor or insulin-like growth factor-1 (IGF-1) secreted by astrocytes at early stages, have beneficial effects on neurons (51). In this sense, it has been demonstrated that p53 isoforms are important to modulate astrocyte secretion (170). Further research will be focused on understanding the specific pathways that control senescence induction and SASP production in astrocytes and their effects on the surrounding tissue.

Senescence in Neurons

As described above, the limited information about cellular senescence in the brain has been obtained mostly from research in glial cells since it has been assumed that the se-

nescent phenotype is a feature exclusive to mitotic cells. Nevertheless, neurons with several hallmarks of senescence have been observed in old mouse brains (81). Therefore, although limited evidence exists on whether postmitotic cells, such as neurons, are able to enter into a senescent state, here we summarize and integrate the partial observations from several studies and propose that neurons indeed senesce.

Early evidences for the occurrence of neuronal senescence were the observation of increased SA- β -Gal activity in hippocampal pyramidal cells in the CA3 region of 18- and 24-month-old rats (59). The same was observed in CA3 and dentate gyrus areas of senescence-accelerated mouse prone (SAMP) 8, a model of cognitive decline with aging (128). However, SA- β -Gal activity is not a senescence marker entirely specific since different types of cells such as adult melanocytes and sebaceous and eccrine gland cells also have this activity regardless of cellular senescence (46).

Recently, Jurk *et al.* reported a more comprehensive and detailed evidence for neuronal senescence. They showed for the first time that cortical and Purkinje neurons in old mice (32 months old) exhibit several markers of senescence. These include SA- β -Gal activity, lipofuscin accumulation, γ H2AX and macro-H2A expression, oxidative stress, phosphorylated p38/MAPK (p-p38), and IL-6 expression, all in a p21/CDKN1A-dependent manner (81). These findings support the notion that neuronal cells undergo cellular senescence with similar features than proliferating cells. Furthermore, another recent study revealed the expression of p16/CDKN2A in pyramidal neurons derived from human brains of people over 77 years old (82), thus confirming what has been observed in mouse and rat. These findings further support the neuronal capability to acquire a senescent phenotype. Unfortunately, *in vivo* studies have the disadvantage of being expensive, require years to be completed, and face the difficulty of maintaining the animals alive until they grow old. In addition, it is difficult to perform molecular and cellular analyses in whole animals. Therefore, it is necessary to develop *in vitro* models that help solve these drawbacks.

Accordingly, *in vitro* studies of primary cortical neurons, derived from various murine models and maintained in culture for a long time, have shown that the average proportion of SA- β -Gal-positive cells augments with time (10, 33, 59). For example, in a primary culture of hippocampal neurons kept for 25 and 30 days *in vitro* (25–30 DIV), more than 90% of the cells stained positive for SA- β -Gal activity and had an increased ROS production (47). However, these studies were limited to detect only SA- β -Gal activity. Most recent *in vitro* studies confirmed the presence of additional senescent features, including SA- β -Gal activity, p21/CDKN1A expression, oxidative stress, and γ -H2AX, in neurons from mouse neuroglial cocultures maintained up to 27 DIV (12). This was also demonstrated in N2A-derived neuronal cells exposed to high-glucose conditions (154). Taken together, these reports support the notion that cultured neurons *in vitro* are capable of undergoing cellular senescence as occurs *in vivo* (Fig. 6).

IL-6 expression was also observed in neurons in old mice (81), in N2A-derived neuronal senescent cells (154), and in senescent neurons from neuroglial cocultures (12). Additional proinflammatory cytokines have been detected, including TNF- α and MCP-1 (154). Although these observations suggest the expression of an SASP-like phenotype by senescent neurons, it is still necessary to verify that the senescent neurons are

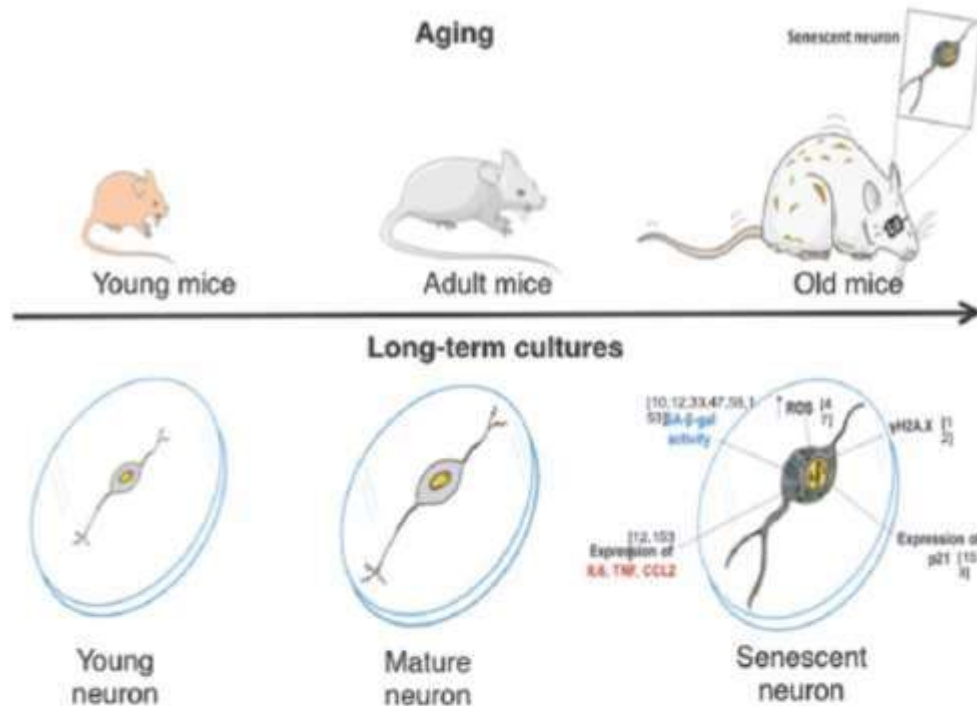


FIG. 6. Primary neuron culture can model neuronal senescence. Neurons maintained in culture for a long time exhibit several features of the senescent phenotype such as SA- β -gal activity, increased ROS levels, and expression of IL6 and γ H2A.X. In addition, N2A neurons cultured under high-glucose condition show increased expression of p21/CDKN1A, IL-6, TNF-alpha, and MCP-1. Therefore, neurons aged *in vitro* can be a useful model to investigate the mechanisms of neuronal senescence establishment in a shorter period of time than *in vivo* studies.

indeed the ones secreting SASP molecules with more detailed and specific experiments in both *in vitro* and *in vivo* models of senescence.

The potential existence of a neuronal SASP has important physiological implications because chronic and low-grade inflammation (inflammaging) has been associated with neurodegeneration in aging (55, 60). Therefore, secretion of proinflammatory cytokines by senescent neurons in the old brain could be one of the main causes of the onset of neurodegeneration. This hypothesis is supported by articles reporting, in neurons from AD patient tissues, features of senescent phenotype such as p16/CDKN2A expression, increased p38/MAPK activity, IL-6 protein, and TGF- β mRNA expression (103, 104, 111, 158). Another SASP activity is to induce paracrine senescence to neighboring cells (90). Hence, senescent neurons could induce senescence to nearby healthy neurons as well as to other cell types within the brain, such as astrocytes, microglia, or endothelial cells, thereby spreading the senescent phenotype and thus contributing to brain aging and exacerbating neurodegeneration.

In conclusion, several studies support the occurrence of senescence in postmitotic neurons. Given its potential role in aging and neurodegeneration, it would be essential to develop a more comprehensive *in vitro* model, which recapitulates the senescent features observed *in vivo*, including the SASP. The above will allow the study of the molecular mechanism of senescence establishment and maintenance in postmitotic

cells, as well as the potential role of the neuronal SASP in spreading neuronal and non-neuronal senescence. Therefore, this will contribute to the understanding of neuroinflammation and neurodegeneration.

Cellular Senescence in Other Brain Cells

Other cell types within the brain that could enter the senescence state are neuronal stem cells (NSCs), endothelial cells, and oligodendrocytes. All of them might have significant effects on neuronal function.

Neuronal stem cells

These cells are vital within the CNS because they support both glial and neuronal cell development. With age, neurogenesis decreases because proliferation, differentiation, regeneration, and repair functions are almost lost, thus contributing to neurodegenerative disorders and brain functional deterioration (151). Zou *et al.* reported that NSCs exposed to ionizing radiation underwent cellular senescence and acquired astrocytic characteristics. Even though they did not display the typical proinflammatory secretion pattern, they were resistant to apoptosis and were positive to p16/CDKN2A (185). More recently, Daniele *et al.* used hydroxyurea to induce NSC senescence and reported that α -glycerylphosphorylethanolamine (GPE) was efficacious in recovering NSC from hydroxyurea-induced senescence. GPE was able to reduce ROS production, promote

mitochondrial integrity and functionality, and restore their proliferative potential (39).

Oligodendrocytes

The importance of oligodendrocytes during aging and NDD is emphasized by its unusual sensitivity to DNA damage and oxidative injury, which may lead to impaired neural conductivity due to incorrect axon myelination. Unrepaired DNA damage has been reported in oligodendrocytes during normal aging, as well as AD, progeroid syndromes, ataxia telangiectasia, and other conditions (4, 169).

Endothelial cells

Not much is known about endothelial cell senescence. However, since they are prominent components of the BBB, their senescence stage might result in the loss of this important barrier tolerating the entrance of undesired compounds or inflammatory factor infiltration that altogether might harm brain functions (36, 48, 155).

Conclusion and Perspectives

From its discovery, cellular senescence has always been linked with aging. First, it was seen as a model that re-

produced, at the cellular level, the aging of the whole organism (137). However, nowadays, we know that cellular senescence has several physiological roles that may vary during lifetime, from embryogenesis to old age (118, 156). Even if cellular senescence is probably not the only or inherent causative factor of aging, there is cumulative evidence supporting it as one of the most important contributors to the aged phenotype and age-related diseases (137). For all the above, it is important to study the numerous effects that the diverse cellular types might have on each other and on the neuron (Fig. 7) when they become senescent (Fig. 8).

It is known that some cells belonging to the CNS, such as astrocytes and microglia, undergo activation processes that produce proinflammatory cytokines, these processes are regulated and, in principle, occur acutely (51). However, there are practically no studies comparing cytokine secretion during those activation processes and cellular senescence. This is due to technical problems that arise when studying astrocytes in culture because from the moment they are isolated and cultured, they become activated and enter into gliosis. What is clear is that both phenomena share a proinflammatory profile orchestrated mainly by IL-6, IL-1 β , TNF α , and possibly other cytokines and chemokines (11, 51). This is fundamental because both glia activation and senescence are known to be beneficial and reparative at the

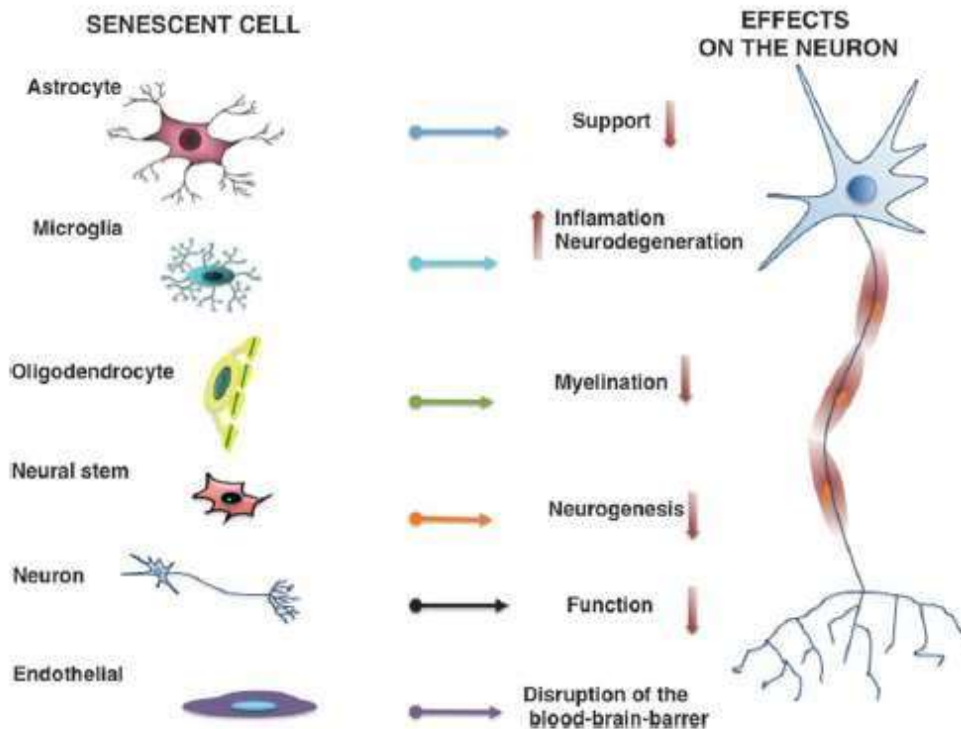


FIG. 7. Effects that the brain's different cellular types can exert on the neurons. Senescent astrocytes may decrease the energetic (lactate) and antioxidant (antioxidant enzymes and GSH) supply to the neuron. Senescent microglia might increase or sustain inflammation, thus damaging the brain and increasing neurodegeneration. Senescent oligodendrocytes might decrease neuron myelination and impede neurotransmission. Senescent neural stem cells might disrupt the generation of neurons. Senescent neurons can also induce senescence in other cellular types and/or cause their functional decline. Senescent endothelial cells might promote the rupture of the BBB. BBB, blood-brain barrier.

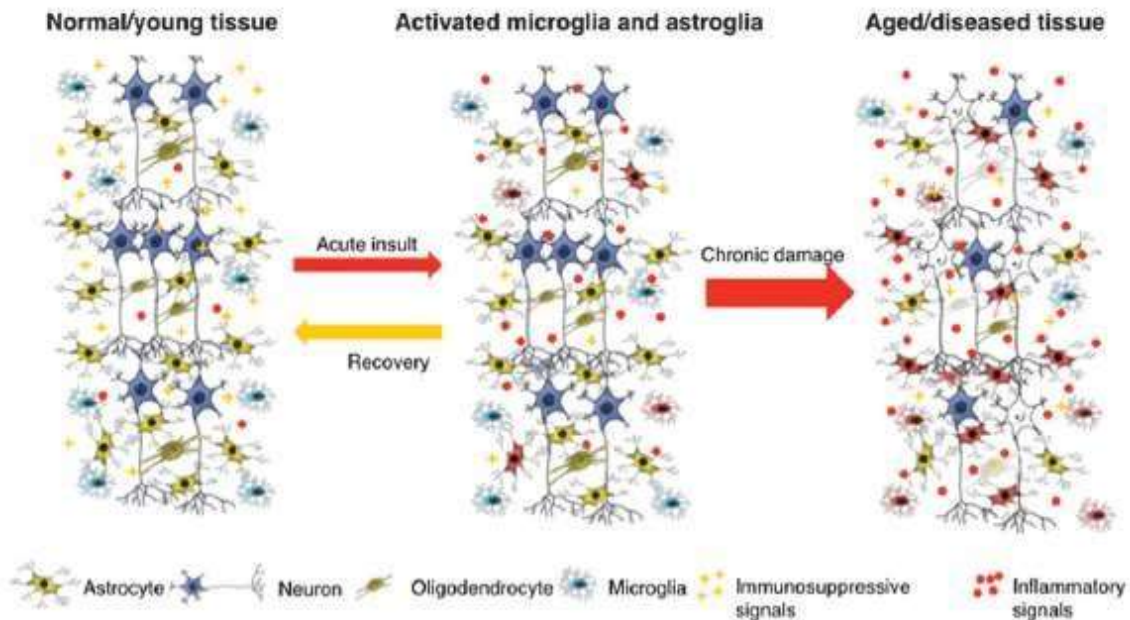


FIG. 8. Schematic representation of nervous tissue in different physiological states. Astrocytes can amplify the signals to induce the immune response as result of an acute insult or pathogen infection. Molecules secreted by astrocytes include both inflammatory, such as IL-6, INF β , IL-1 β , TNF, CCL2, and CCL5, and immunosuppressive, such as NGF, CNTF, and BDNF, molecules. Inflammatory molecules increase the BBB permeability, activate endothelial cells, and recruit monocytes, macrophages, dendritic cells, *etc.* After that immunosuppressive signals promote neuronal and oligodendrocyte survival, differentiation, regeneration, remyelination, and neurogenesis to recover the tissue structure and function. With age, chronic damage and senescent (*red cells*) accumulation provoke chronic inflammation. The SASP contribution to chronic inflammation is not defined yet, but evidence suggests that SASP could be one factor of importance to this. In this state, the loss of balance between inflammatory and immunosuppressive secretion can induce neuronal and oligodendrocytic death (*white cells*) and, in last instance, contribute to pathologic characteristics. NGF, neural growth factor.

beginning. Nevertheless, if these processes become chronic, they might have deleterious effects. Thus, finding markers that differentiate between activated glia secretions and SASP from senescent cells would help to differentiate their effects.

One of the principal deleterious effects of senescent glia might be fomenting neuronal cell death. These might be induced by alterations in mitochondrial functionality and glutamate receptor deregulation, which might alter calcium cellular levels leading to excitotoxicity and massive neuronal demise. Another important effect might be oligodendrocyte death or dysfunction, which may lead to demyelination and decreased neural conductivity.

In NDDs, such as Alzheimer's and Parkinson's, presumed chronic inflammation has been reported (16, 143) and since these diseases are associated with age, senescent cells have emerged as the main candidates to orchestrate this phenomenon. Even so, it is important that in the future the investigations will focus on a distinction between activation (astrogliosis, microglial activation) and SASP effects to understand the exact contribution of each phenomenon in neurodegeneration and neuroinflammation.

Therefore, the challenges we face are diverse. On the one hand, it would be necessary to understand if the senescence that is observed in brain cells during various neuropathologies is part of their etiology and supports their progression, or on the other hand, if their appearance is a consequence of the

same disease. Another fundamental question is to validate the senescence phenotype in neurons and to understand the induction mechanisms. The fact that a cell population that does not proliferate enters into senescence is a key point that could redefine the understanding of this phenomenon. The same can be said for its relationship with the pathophysiology not only of aging but also in the overall development of the organism. Another important challenge would be to understand more precisely which cell types are most susceptible to enter senescence and how they might be affecting others since the relationships between the various cell types in the brain are of paramount importance for proper functioning of this organ. Finally, another point to study is the different systemic disorders such as obesity, metabolic syndrome, eating disorders, and other dysfunctions.

The understanding of signaling pathways during senescence and factors involved in SASP induction will expose new targets to intervene age-associated pathology, including NDD and brain deterioration by modulation of the senescence program.

Acknowledgments

This work was partially supported by CONACyT grants: (MKF) FON INST/298/2016; (NELD) CB-2015-01-255591; (SCO) CB2013-220515; and PAPIIT-UNAM IN20615.