

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Posgrado en Biología Experimental

**Efecto de los astrocitos senescentes sobre la
funcionalidad de las neuronas corticales en co-
cultivo primario de rata Wistar**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestra en Biología Experimental
PRESENTA

Biol. Exp. Sandra Lizbeth Morales Rosales
CVU 718720
No. De beca 593019

Comité tutorial:

Directora: Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Asesora interna: Dra. Viridiana Yazmín González Puertos

Asesora externa: Dra. María de Lourdes Massieu Trigo

Ciudad de México, México

Noviembre del 2017



Posgrado en
Biología Experimental

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 y en el Laboratorio de Neuropatología Molecular en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020

Número de registro de la beca otorgada por el CONACYT: 593019 .

Número de becario: 593019 CVU: 718720



Miembros del jurado

Presidente: Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Secretaria: Dra. María de Lourdes Massieu Trigo

Instituto de Fisiología Celular

Universidad Nacional Autónoma de México

Vocal: Dra. Beatriz Gómez González

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Vocal: Dra. Leticia Bucio Ortiz

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa



Comité tutorial

Directora: Dra. Mina Konigsberg Fainstein

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

Asesora interna: Dra. Viridiana Yazmín González Puertos

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

Asesora externa: Dra. María de Lourdes Massieu Trigo

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de
México, México.



AGRADECIMIENTOS.

A mi amada institución, que me permitió desarrollarme tanto en el ámbito intelectual como científico.

A la Dra. Mina Konigsberg Fainstein por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, otorgarme la confianza para el desarrollo de este proyecto y por permitirme crecer como científico.

A la memoria de la Dra. Viridiana Yazmín González Puertos que me acompañó en gran parte de este proyecto, me brindó su cariño y apoyo incondicional en los momentos más difíciles, guiándome con sus consejos para darme ánimo en los momentos de mayor frustración. Te llevaré siempre en mi corazón.

A la Dra. María de Lourdes Massieu Trigo que me apoyó con sus conocimientos, realizando aportaciones muy valiosas para el desarrollo de este proyecto, por su apoyo incondicional y por brindarme la oportunidad de trabajar parte de este trabajo en su laboratorio dentro del IFC de la UNAM.

A la Dra. Ruth Rincón Heredia por su apoyo invaluable en el uso del microscopio confocal en el IFC de la UNAM, por la pasión y nivel de compromiso que me brindó.

Al M. Roberto Lazzarini del laboratorio de Microscopía Confocal de la UAM-I por su apoyo en el uso del microscopio confocal.

A la MVZ Rocío González Vieira del bioterio de la UAM-I por proveer los animales utilizados en este trabajo.



A la Dra. Beatriz Gómez González por sus valiosas aportaciones durante el desarrollo del proyecto y sus observaciones a esta tesis.

A mi maestro Luis Ángel Maciel Barón quien tuvo la paciencia y vocación para enseñarme las bases para trabajar en el laboratorio. Espero te sientas orgulloso de tu primer alumna.

A Daniel Moreno, Cristian Gerónimo y Julio que me enseñaron a realizar el cultivo de neuronas.

A la Dra. Norma y el Dr. Armando por motivar el crecimiento de cada miembro del laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, que más que compañeros son mis amigos: Pedro, Gibrán, Rafa, Ulalume, Bety, Paola, David, Isabel, Nati, Vero, Angélica, Roberto, Alex, Alis, Edith y Elisa, por estar siempre con ánimo para apoyarnos unos a otros en los tiempos de victoria pero sobre todo en los tiempos más difíciles.

A Carlos Aguilar, mi pareja, que me ha apoyado desde el momento en que nos conocimos, compartiendo su tiempo para escucharme, involucrándome en su vida y por las imágenes tan hermosas que enriquecieron mi trabajo. ¡Gracias por estar a mi lado!

A mis amigos Almita, Toño y Dalía que me acompañan desde licenciatura, gracias por estar conmigo y permitirme ser parte de sus vidas.

A Victor, por siempre regalarme una sonrisa, darme ánimos, escucharme cuando más lo necesito y por todos los consejos que me han enseñado a madurar y disfrutar más de la vida.



A Leticia, mi madre, por apoyarme en todo momento con todo el amor. Eres una gran mujer, gracias por sacar lo mejor de ti y brindármelo. Te amo

A Erika, mi hermana, gracias por la paciencia, el amor y por estar siempre conmigo. Te amo desde el momento en que nací.

A la memoria de Mario, mi padre amoroso que siempre me exigía para ser mejor.

Este trabajo va dedicado a ti, desearía con toda mi alma tenerte a mi lado.



Índice

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 ENVEJECIMIENTO.....	5
1.2 SENESCENCIA CELULAR.....	7
1.3 LA SENESCENCIA EN EL ENVEJECIMIENTO.....	9
1.4 ENFERMEDADES ASOCIADAS A LA EDAD	11
1.4.1 CÉLULAS NEURONALES	12
1.4.2 CÉLULAS GLIALES	13
1.4.3 ASTROCITOS, EL SOPORTE NEURONAL.....	13
1.5 DETERIORO CEREBRAL EN EL ENVEJECIMIENTO	15
1.6 ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.....	18
1.7 NEUROINFLAMACIÓN.....	20
2. ANTECEDENTES.....	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:.....	24
3.1. JUSTIFICACIÓN	24
3.2. OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	25
3.3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	26
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
5.1 ANIMALES.....	27
5.2 MODELOS DE ESTUDIO	27
5.3 CULTIVO DE NEURONAS CORTICALES.....	28
5.4 CONTEO CELULAR POR MÉTODO DE EXCLUSIÓN DE AZUL DE TRIPANO.....	31
5.5 CULTIVO DE ASTROCITOS.....	32
5.6 SENESCENCIA PREMATURA INDUCIDA POR ESTRÉS (SIPS)	33
5.7 ENSAYO SA- β -GAL.....	33
5.8 CO-CULTIVOS	34
5.9 INMUNOCITOQUÍMICAS.....	35
5.9.1 CARACTERIZACIÓN DE ASTROCITOS.....	36
5.9.2 CARACTERIZACIÓN DE NEURONAS.....	37
5.9.3 DENSIDAD SINÁPTICA.....	37
5.10 VIABILIDAD CELULAR	37
5.11 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	38
5.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
6. RESULTADOS	39
6.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ASTROCITOS.....	39
6.2 CARACTERIZACIÓN DE NEURONAS	43
6.3 ESTABLECIMIENTO DE LOS MODELOS DE CO-CULTIVOS	44



6.4 ENSAYO DE VIABILIDAD	45
6.5 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	46
6.6 DENSIDAD SINÁPTICA DE LAS NEURONAS.....	49
7. DISCUSIÓN	52
8. CONCLUSIÓN.....	59
9. PERSPECTIVAS.....	60
10. BIBLIOGRAFÍA.....	60
ANEXO 1.....	70



RESUMEN

El principal factor de riesgo de las enfermedades neurodegenerativas es la edad, caracterizadas por el mal funcionamiento de las neuronas debido al microambiente pro-inflamatorio que se genera con la edad. El proceso inflamatorio puede tener un efecto neuroprotector o neurodegenerativo, dependiendo del tiempo de duración. Al no estar regulada, la neuroinflamación compromete a las neuronas y promueve la muerte progresiva de éstas, por lo que se van perdiendo funciones tales como la memoria, el aprendizaje y el control motor, lo cual afecta la calidad de vida de los adultos mayores.

La senescencia celular se ha relacionado con el proceso de envejecimiento debido a que se ha descrito que en los organismos envejecidos hay una acumulación de células senescentes en distintos tejidos. En el sistema nervioso central también se ha reportado la presencia de astrocitos senescentes, los cuales van incrementando en el tejido de organismos viejos y el aumento es aún mayor si presentan alguna enfermedad neurodegenerativa. Las células senescentes presentan un fenotipo que se caracteriza por la inhibición de la proliferación y por la secreción de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y proteasas, que en su conjunto se conocen como el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP), el cual es de carácter pro-inflamatorio y se le han atribuido diversos efectos tanto benéficos como deletéreos.



Debido a la secreción del SASP, la acumulación de las células senescentes puede comprometer la funcionalidad de los tejidos dando lugar a diversas enfermedades.

Los astrocitos son las células más abundantes en el sistema nervioso central y regulan múltiples procesos que permiten que se mantenga la homeostasis del tejido nervioso. Se sabe que estas células pueden adquirir el fenotipo senescente por lo que es importante conocer el efecto de los astrocitos senescentes sobre las neuronas corticales.

En el presente proyecto se estableció un modelo de co-cultivo que permite el estudio del efecto que tienen los astrocitos senescentes, mediante la secreción del SASP, sobre las neuronas corticales. Se utilizaron dos modelos de estudio: el modelo de senescencia prematura inducida por estrés (SIPS), donde se indujo la senescencia con H_2O_2 sobre los astrocitos de ratas neonatas y el modelo de envejecimiento, donde se aislaron astrocitos senescentes de ratas viejas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la secreción de los astrocitos senescentes sobre el funcionamiento de las neuronas, con ello se aporta conocimiento nuevo que podrá ser utilizado para futuros estudios, donde la regulación de la senescencia de los astrocitos pueda ser utilizada como terapia preventiva en el desarrollo de algunas enfermedades degenerativas y con ello promover un envejecimiento saludable que beneficie a la sociedad.



ABSTRACT

Aging is the main risk factor of neurodegenerative diseases, characterized by the malfunction of neurons due to the pro-inflammatory microenvironment that is generated with the aging process. Inflammation can have a neuroprotective or neurodegenerative effect, depending on the duration time. When not regulated, neuroinflammation compromises the neurons and promotes the progressive death of these cells, some functions such as memory, learning and motor control could be affected, compromising the quality life of older adults.

Cellular senescence has been related to the aging process. It has been described that in aged organisms there is an accumulation of senescent cells in different tissues. In the central nervous system has also been reported the presence of senescent astrocytes. Furthermore, there is an increasing amount of senescent astrocytes in the tissue of old organisms and the increase is even greater if they have a neurodegenerative disease. Senescent cells have a phenotype that is characterized by the inhibition of proliferation and by the secretion of multiple cytokines, chemokines, growth factors and proteases, which together are known as the senescent associated secretory phenotype (SASP), which is characterized by a pro-inflammatory environment. This phenotypes is related with several beneficial as well as detrimental effects.

Due to the accumulation of senescent cells and their SASP secretion, this phenotype could compromise the functionality of some tissues giving rise to various diseases.



Astrocytes are the most abundant cells in the central nervous system and regulate multiple processes that allow the well functionality of nervous tissue. It is known that these cells can acquire the senescent phenotype, nevertheless it is not known their effect above cortical neurons.

In this project, a co-culture model was established allowing the study of the effect of senescent astrocytes, through the secretion of SASP, upon cortical neurons. Two different models were used: the stress induced premature senescence model (SIPS), where senescence was induced with H₂O₂ on the astrocytes of neonatal rats and the aging model, where senescent astrocytes were isolated from old rats.

The aim of this work was to study the effect of senescent astrocytes secretion over the neuronal functions, providing new knowledge that might be used for future studies, where the regulation of senescent astrocytes could be used as a preventive therapy in the development of some degenerative diseases and promote a healthy aging that benefits the society.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 ENVEJECIMIENTO

La población mundial esta envejeciendo debido al incremento en la esperanza de vida y la disminución en la tasa de fecundidad. En México, el porcentaje de adultos mayores a 60 años se triplicará en los próximos años y pasará del 6.3% reportado en 2010 al 23% en el año 2050 (Angel et al, 2017).

El envejecimiento se ha definido como un proceso natural e irreversible caracterizado por la pérdida progresiva de las funciones fisiológicas que conllevan al mal funcionamiento del organismo, siendo éste más vulnerable al desarrollo de patologías (López-Otín et al, 2013). Es por ello que el envejecimiento es un factor de riesgo para el desarrollo de patologías como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, entre otras. Debido a esto, el deterioro asociado al envejecimiento es un problema a nivel mundial que requiere ser atendido, ya que con el aumento de la población de adultos mayores se incrementa el número de personas con alguna enfermedad crónica, lo cual tiene afectaciones en la calidad de vida e incluso trae problemas socioeconómicos a las familias y al estado.

A pesar de que se sabe que el envejecimiento es un proceso natural, se ha intentado esclarecer el por qué los organismos presentan enfermedades al envejecer. Se han postulado diversas propuestas que intentan explicar las causas del envejecimiento



que van desde factores genéticos hasta ambientales. Algunas propuestas atribuyen el envejecimiento a la acumulación de daño debido al estrés oxidante, sin embargo ahora se sabe que esa explicación no es suficiente. En el 2013 López-Otín y col. propusieron nueve marcadores para describir el envejecimiento basado en tres criterios que se deben cumplir: 1. Que se manifiesten de manera natural en el envejecimiento, 2. Que el aumento inducido experimentalmente de estos factores acelere el envejecimiento y 3. Que la disminución inducida experimentalmente de estos factores retrase el proceso de envejecimiento. Los nueve marcadores del envejecimiento propuestos incluyen inestabilidad genómica, desgaste telomérico, alteraciones epigenéticas, pérdida de la proteostasis, comunicación intercelular alterada, agotamiento de células troncales, desregulación de la sensibilidad a los nutrientes, disfunción mitocondrial y senescencia celular.

Puesto que el deterioro cerebral durante el envejecimiento normal, sin patologías, se comprende muy poco, con este proyecto se busca conocer como la senescencia de los astrocitos puede estar afectando el funcionamiento de las neuronas, puesto que se sabe que las neuronas depende en gran medida de los astrocitos. Por lo que el principal aporte de este proyecto es que se logró adecuar un sistema de co-cultivos donde ambos tipos celulares comparten el mismo ambiente sin estar en contacto y así poder evaluar cómo están siendo afectadas las neuronas por la secreción de los astrocitos senescentes.



1.2 SENESCENCIA CELULAR

La senescencia celular fue descrita por primera vez por Hayflick y Moorhead en 1961. Trabajando con cultivos primarios estos investigadores descubrieron que las células tenían un número finito de duplicaciones. Como trabajaban con células derivadas de cultivos primarios, no presentaban alteraciones y por ello no eran inmortales como sucede con las llamadas líneas celulares. Ellos asociaron esta incapacidad de proliferar con el envejecimiento celular, debido a que suponían que las células tenían un sensor que les indicaba el momento en el cual debían dejar de proliferar. Realizaron cultivos mixtos de células con duplicaciones poblacionales tempranas y tardías, y observaron que a pesar de estar juntas, las células de duplicaciones poblacionales tardías, llegaban a senescencia celular primero (Hayflick y Moorhead, 1961).

La principal característica de la senescencia celular es la detención en la proliferación, a esto se le ha conocido también como senescencia replicativa o límite de Hayflick, en honor a quien describió por primera vez este fenómeno. La detención de la proliferación se da de manera irreversible, ya que aún y cuando se les adicionen los nutrientes y factores necesarios para la proliferación, esta no se lleva a cabo. Otra característica es la morfología celular, las células senescentes se tornan grandes y aplanadas, con gran cantidad de vesículas y acumulación de lipofuscina. Además incrementan la actividad de la enzima β -galactosidasa, presentan segmentos de cromatina con alteraciones que refuerzan la senescencia y que se



asocian a daño al DNA (DNA-SCARS, por sus siglas en inglés) y segmentos de heterocromatina asociados a la senescencia (SAHF, por sus siglas en inglés) (Rodier y Campisi, 2011).

La senescencia celular es un proceso que ha sido descrito tanto *in vitro* como *in vivo* (Dimri et al, 1995). Para detener su proliferación, las células senescentes activan proteínas inhibitoras del ciclo celular como p21 y p16 que se unen a los complejos Ciclina E-CDK2 y Ciclina D-CDK4/6, esenciales para el progreso de la fase G1 a S. La síntesis de dichos inhibidores se activa cuando se presenta un daño en el ADN, por lo que se detiene la proliferación de manera irreversible (Rodier y Campisi, 2011; López-Díazguerrero et al, 2005).

Al estado que alcanzan las células cuando detienen su proliferación por haber llegado a un número finito de duplicaciones poblacionales se le conoce como senescencia replicativa (SR) y es ocasionado por el acortamiento de los telómeros. No obstante, además de la SR, las células pueden llegar a la senescencia de manera prematura e independiente al acortamiento de telómeros cuando se exponen a otros agentes estresores, como el estrés oxidante en la senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) (Toussaint et al, 2000), la senescencia inducida por oncogenes (OIS) (Van Deursen, 2014) y senescencia prematura inducida por inhibición del proteosoma (PIIPS) (Torres y Perez, 2008; Maciel-Barón et al, 2016), por mencionar algunos ejemplos.

Las células senescentes son metabólicamente activas y presentan un fenotipo secretor que incluye diversas citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y



proteasas que en conjunto se conoce como SASP (por sus siglas en inglés, senescence-associated secretory phenotype). El SASP se caracteriza por tener un perfil pro-inflamatorio e incluye moléculas como IL-6 (interleucina 6), IL-1 β (interleucina 1 beta), TGF β (factor de crecimiento transformante beta), Nf κ B (factor nuclear kappa B), MMP-1 (metaloproteinasas de matriz extracelular 1), etc. (Coppe et al, 2008; Rodier y Campisi, 2011). Es importante destacar que el perfil de expresión de proteínas y de secreción del SASP es diferente dependiendo del tipo celular y del tipo de estímulo que se utiliza para inducir senescencia (Dierick et al, 2002; Maciel-Barón et al, 2016). Varios autores han reportado que el SASP presenta niveles elevados de interleucina 6 (IL-6) como característica principal, sin embargo en astrocitos se ha observado que la secreción de esta citocina no se encuentra elevada. En nuestro grupo de trabajo se ha realizado la medición de las citocinas presentes en el medio condicionado de astrocitos senescentes y en ese caso particular se ha observado un incremento de la IL-1 α (interleucina 1 alfa) a partir del sexto día posterior al estímulo de inducción de senescencia (Maciel-Barón et al, en revisión).

1.3 LA SENESCENCIA EN EL ENVEJECIMIENTO

Por muchos años la senescencia celular se ha relacionado con el envejecimiento de los organismos, pues se ha observado que las células senescentes se van acumulando conforme a la edad. Sin embargo, ahora se sabe que la senescencia



tiene funciones pleiotrópicas durante toda la vida, pues participa en diversos procesos fisiológicos. Las células senescentes tienen tanto efectos benéficos como dañinos sobre los tejidos donde se encuentran, debido a que la secreción del SASP modifica el microambiente y diversos tipos celulares responden de manera distinta ante este estímulo (Tchkonia et al, 2013; Krizhanovsky y Ovadya, 2014; Rodier y Campisi, 2011).

En un principio la senescencia se describió como un mecanismo supresor de tumores, ya que las células que presentan daño en el DNA, detienen el ciclo celular, entran en senescencia y con ello evitan la proliferación descontrolada. Ahora se sabe que las células senescentes secretan el SASP y las moléculas que lo conforman influyen en diversos fenómenos fisiológicos como la reparación de tejidos dañados, la promoción de la proliferación celular de células vecinas, refuerzan el fenotipo senescente y reclutan a las células del sistema inmune encargado de fagocitar a las células senescentes. Conforme los organismos envejecen, la señalización para atraer al sistema inmune se deteriora, por lo que la eliminación de las células senescentes es poco eficiente, y estas se acumulan. La acumulación de células senescentes genera un ambiente de inflamación crónica debido a la continua secreción del SASP, lo que compromete las funciones del tejido y por ello se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades degenerativas como el cancer (Krizhanovsky y Ovadya, 2014; Savig y Krizhanovsky, 2013; Muñoz-Espín y Serrano, 2014).

Otros trabajos que muestran evidencias de la relacion de la senescencia con el desarrollo de enfermedades son aquellos en donde se emplean ratones



transgénicos, que mediante técnicas de ingeniería genética han logrado la eliminación selectiva de células positivas a p16 (senescentes). Al eliminar a las células senescentes, los tejidos de estos ratones disminuyen los marcadores asociados con el deterioro, por lo que se ha propuesto que las células senescentes pueden ser un blanco terapéutico para retrasar las enfermedades que se asocian con la edad (Baker et al, 2011).

1.4 ENFERMEDADES ASOCIADAS A LA EDAD

Hemos mencionado que el envejecimiento es un factor de riesgo para el desarrollo de diversas enfermedades, lo que provoca que la calidad de vida de los organismos viejos disminuya. Dentro de las enfermedades más frecuentes en adultos mayores se encuentran las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la artritis, la sarcopenia y las enfermedades neurodegenerativas, entre otras. Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la pérdida progresiva de la estructura y función del sistema nervioso central (SNC) o periférico (SNP), teniendo como consecuencia alteraciones cognitivas y motoras.

Las células que componen el tejido nervioso se pueden clasificar en células neuronales y células gliales; dentro de las últimas se encuentran los astrocitos, la microglía, los oligodendrocitos (presentes en SNC) y las células de Schwann (presentes en SNP). Cada tipo celular cumple con distintas funciones que se mencionaran a continuación.

1.4.1 CÉLULAS NEURONALES

Las neuronas son la unidad fundamental del sistema nervioso (SN), son células postmitóticas que están altamente especializadas. Se dice que son células polarizadas debido a su morfología, pues se distinguen distintos compartimentos como las dendritas, el soma y el axón. Esta morfología especializada permite que las neuronas lleven a cabo su función, la cual es formar redes neuronales, comunicándose mediante sinápsis eléctricas o químicas. La sinapsis química se da mediante la liberación de neurotransmisores tanto excitadores como inhibidores, por lo que permite que la neurona que recibe el neurotransmisor se excite o se inhiba. Cuando las neuronas se excitan se despolariza la membrana plasmática y pueden generarse potenciales de acción que culminan con la liberación de neurotransmisores en la región de la terminal axónica, también conocida como región presináptica. Los neurotransmisores se encuentran contenidos en vesículas que son transportadas desde la región del soma neuronal donde son sintetizados, viajan a través del axón y son liberados cuando la vesícula se fusiona con la membrana plasmática de la terminal axónica. El transporte vesicular es un proceso que requiere de mucha energía, esta energía proviene de la actividad de las mitocondrias, por lo que el buen funcionamiento de dicho organelo es esencial para que se lleven a cabo estos procesos neuronales tan importantes.



1.4.2 CÉLULAS GLIALES

Las células gliales a diferencia de las neuronales, son células con capacidad de proliferar y no son excitables, dan soporte a las células neuronales ya que cumplen diversas funciones. Las células de la microglia por ejemplo, son un tipo de macrófagos especializados que residen en el sistema nervioso; son la defensa inmunológica ya que son los encargados de fagocitar patógenos y restos celulares. Este tipo de células normalmente se encuentran quiescentes y presentan ramificaciones que le permiten vigilar el tejido; cuando se enfrentan a un daño se activan y adquieren una morfología ameboide necesaria para que realicen los procesos de fagocitosis (Cho y Choi, 2017).

Los oligodendrocitos y las células de Schwann son las células encargadas de producir mielina, la cual se encuentra recubriendo los axones de las neuronas. Este recubrimiento permite que las neuronas tengan una mejor conductancia y se lleven a cabo los impulsos eléctricos con mayor velocidad, por lo que permite que los estímulos tengan una mejor propagación (Bradl y Lassmann 2010).

1.4.3 ASTROCITOS, EL SOPORTE NEURONAL

Los astrocitos son las células más abundantes dentro del sistema nervioso, se encargan de diversas funciones, más allá de solamente dar soporte estructural al tejido nervioso, forman redes de astrocitos mediante uniones tipo GAP, este tipo de uniones facilitan la movilidad de sustancias pequeñas como el K^+ a través de ellos



para evitar que se acumulen en ciertas regiones. Un aspecto muy importante es que los astrocitos participan en la formación de la barrera hematoencefálica, ya que sus prolongaciones conocidas como pies perivasculares, se encuentran en contacto con los vasos sanguíneos; además secretan factores que mantienen la integridad de esta barrera y regulan el paso de sustancias desde el torrente sanguíneo hacia el tejido nervioso.

Los pies de astrocitos también realizan contactos con las neuronas y participan en el proceso de sinapsis mediante la recaptura de neurotransmisores como glutamato, GABA y glicina ya que los astrocitos contienen los transportadores de dichos compuestos. Por otra parte, también pueden participar liberando moléculas que promueven la actividad sináptica como glutamato, purinas (ATP y adenosina), GABA y D-serina, al ser liberados por los astrocitos se les conoce como gliotransmisores. La liberación de los gliotransmisores ocurre en respuesta a los cambios en la actividad sináptica de las neuronas y al incremento del calcio intracelular en los astrocitos. Como los astrocitos participan regulando el proceso de la sinapsis, a este contacto con los sitios sinápticos se le conoce como sinapsis tripartita (Hill et al, 2016; Sofroniew y Vinters, 2010).

Las neuronas corticales liberan glutamato como neurotransmisor excitador; los astrocitos se encargan de recapturar el glutamato, previniendo una excitabilidad sostenida en las neuronas. La constante excitabilidad de las neuronas puede generar excitotoxicidad, debido a que los receptores glutamatérgicos están acoplados con la entrada de Ca^{2+} (Chohan y Iqbal, 2006). Los astrocitos mantienen la homeostasis del sistema nervioso regulando la disposición de nutrientes en respuesta a la actividad



sináptica, esto gracias a que los pies de astrocitos están en contacto tanto con las neuronas como con el sistema circulatorio, y así regulan el flujo sanguíneo cuando se requiere un mayor aporte de nutrientes (Sofroniew y Vinters, 2010). Por otra parte, gracias a que los astrocitos mantienen la integridad de la barrera hematoencefálica, protegen a las neuronas de agentes tóxicos, seleccionando las moléculas que llegaran a las neuronas y las que han de liberarse por el torrente sanguíneo (Dixon y Philbert, 2015). Cuando el cerebro se enfrenta a un agente neurotóxico, las células de la glía se activan para conferir neuroprotección, por lo que se inicia un programa de activación conocido como gliosis; sin embargo, en ciertas circunstancias, los cambios glióticos también pueden tener efectos deletéreos que contribuyen a la neurotoxicidad pues generan una inflamación crónica (neuroinflamación) (Rodríguez-Arellano et al, 2016; Verkhratsky et al, 2016).

1.5 DETERIORO CEREBRAL EN EL ENVEJECIMIENTO

Durante el envejecimiento, se presentan cambios tanto en los tejidos como a nivel sistémico. Se ha descrito que en el envejecimiento hay una inflamación crónica de bajo grado aún en ausencia de agentes patógenos, que ha sido denominada “inflammaging”, y es un factor de riesgo para la morbilidad y mortalidad en los adultos mayores (Franceschi y Campisi, 2014). Se ha reportado que el suero de adultos mayores contiene citocinas características de un perfil inflamatorio de bajo grado y dependiendo de las proporciones de las citocinas contenidas en el suero, pueden o no inducir proliferación celular (Barajas-Gómez et al, 2017). Se desconoce la causa



de esta inflamación asociada con la edad y se piensa que existen algunos fenómenos que la promueven, se ha propuesto que uno de ellos sea la acumulación de células senescentes (Franceschi y Campisi, 2014)

Durante el envejecimiento, el SNC presenta cambios en el perfil de expresión de proteínas, incrementándose las relacionadas con inflamación y disminuyendo aquellas que se relacionan con procesos de neurogénesis y procesos de reconocimiento de patógenos. En el tejido cerebral envejecido se reporta que existe una inflamación sostenida y una disminución en el volumen del tejido, aunque el cerebro provenga de pacientes que no presentan alteraciones relacionadas con el deterioro cognitivo, es decir que no presentan síntomas de enfermedades neurodegenerativas. Otro aspecto reportado durante el envejecimiento en el cerebro es la alteración de la comunicación celular, lo cual se asocia a los cambios en la secreción de citocinas proinflamatorias que provienen principalmente de microglia y astrocitos, y que pueden estar afectando las funciones neuronales. La microglia tiene modificaciones que alteran su capacidad fagocítica a pesar de que se encuentran activadas, por lo que mantienen una secreción continua de citocinas (Mosher y Wyss-Coray, 2014). Los astrocitos son el otro tipo celular que contribuye con la secreción de dichas citocinas y ambas promueven la neuroinflamación durante el envejecimiento, ya que son capaces de activar el fenotipo senescente (Bath et al, 2012; Chinta et al, 2015; Spittau, 2017). La inflamación puede estar afectando el tejido nervioso debido a la alteración en la comunicación de las células gliales y neuronales. Por otro lado, las alteraciones en la comunicación a nivel sistémico pueden afectar al cerebro. Existen experimentos de parabiosis en los que observan



que los organismos viejos mejoran al recibir la sangre de organismos jóvenes; también existen otros experimentos donde administran factores que se sabe disminuyen durante el envejecimiento como GDF11 (factor 11 de crecimiento y diferenciación), IGF (factor de crecimiento parecido a la insulina), GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) y GHRH (hormona liberadora de la hormona de crecimiento). En ambos tipos de experimentos se ha observado que mejora el tejido nervioso ya que se presenta un incremento en la neurogénesis, disminución de la microglía activada, mejora en procesos de memoria y aprendizaje y mejora en la integridad cerebrovascular (Villeda et al, 2014; Zhang et al 2013; Baker et al 2012).

Así mismo se ha reportado que durante el envejecimiento hay incremento de moléculas oxidadas que no pueden ser degradadas por los lisosomas, por lo que se promueve la producción de enzimas lisosomales y a pesar de esto, no se degradan las moléculas dañadas, dando lugar a la pérdida de la proteostasis (López-Otín et al, 2013). Se sabe que la pérdida de la proteostasis está implicada en el proceso de envejecimiento y de neurodegeneración (Mosher y Wyss-Coray, 2014).

Muchas características descritas en el tejido de organismos con enfermedades neurodegenerativas correlacionan con las que han sido descritas en el tejido de organismos envejecidos que no presentan síntomas de neurodegeneración, por lo que algunos autores sugieren que la neurodegeneración es simplemente un proceso de envejecimiento acelerado (Wyss-Coray, 2016).

1.6 ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Se sabe que en algunas enfermedades degenerativas el sistema nervioso puede verse comprometido teniendo como consecuencia el desarrollo de diversas alteraciones, tal es caso de la demencia que se caracteriza por la pérdida de las funciones cognitivas. Durante las enfermedades neurodegenerativas (EN), el cerebro presenta una disminución en las ramificaciones de axones y dendritas, así como en la densidad post-sináptica, espinas dendríticas, marcadores pre-sinápticos, volumen cortical y una pérdida progresiva de las neuronas corticales (Chinta et al, 2015). Así mismo, se observa muerte celular a causa de múltiples factores, entre los que destacan la neuroinflamación, el estrés oxidante y la ausencia de los factores tróficos (Tovar-y-Romo et al, 2016). También se ha descrito que diversas EN presentan daño en las mitocondrias. El daño a las mitocondrias es causado por diversos factores como la excitotoxicidad, cuando hay un daño en las mitocondrias se favorece el transporte retrógrado y hay una disfunción en el transporte anterógrado de vesículas (Leonaki et al, 2015). Por lo que se presenta un daño en el transporte axonal y con ello se compromete la función sináptica de las neuronas (De Vos et al, 2008). Así mismo, se ha reportado que los procesos de dinámica mitocondrial se encuentran alterados, pues se presenta una fragmentación excesiva de las mitocondrias que da lugar a una disminución en la producción de energía y además promueve procesos de muerte celular ya que la liberación de citocromo c esta asociada a los procesos de fisión mitocondrial (Olichon et al, 2003; Sanderson et al, 2015; Wang et al, 2010).



Por otro lado, recientemente se ha reportado un incremento de astrocitos senescentes durante diversas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson (Bath et al, 2012; Tan et al, 2014). Por lo que se ha propuesto que el SASP secretado por los astrocitos senescentes, puede generar un ambiente de neuroinflamación. Es necesario hacer énfasis en que el envejecimiento es un factor de riesgo para la neurodegeneración, sin embargo, no todos los organismos envejecidos desarrollan enfermedades neurodegenerativas debido a que hay distintos factores involucrados los cuales no quedan del todo claros, y se atribuye entre el 5 y 10% a la predisposición genética que implica el mal funcionamiento de algunos organelos en las neuronas como la mitocondria (Keogh y Chinnery, 2015; Lausted et al, 2014; Cannon y Greenamyre, 2011). Existen estudios que muestran una acumulación de astrocitos senescentes con la edad y que el incremento es aún mayor en pacientes que desarrollan enfermedades neurodegenerativas (Bath et al, 2012; Chinta et al, 2015). Se ha descrito que los astrocitos senescentes tienen cambios morfológicos y disminuyen la expresión de receptores ionotrópicos de glutamato y purinérgicos; todo ello puede ser una consecuencia del cambio en el tráfico vesicular de los astrocitos, que dependen de la arquitectura del citoesqueleto y da lugar a una desregulación en la homeostasis del tejido nervioso, pues ya se ha mencionado que los astrocitos tienen un papel importante en la recaptura de los neurotransmisores para evitar la excitación sostenida de las neuronas (Verkhratsky et al, 2016). Una propuesta interesante es que el SASP de los astrocitos senescentes contribuye con el establecimiento de un ambiente pro-inflamatorio que participa en la degeneración del tejido nervioso, pues se sabe que la



neuroinflamación es un factor que compromete a las neuronas, induciendo la muerte progresiva de éstas (Jaerve y Müller, 2012).

1.7 NEUROINFLAMACIÓN

Cuando hay un estímulo que genera daño en el SNC se desencadena una serie de eventos como respuesta protectora del tejido. En primera instancia hay muerte neuronal y enseguida el daño se expande al tejido cercano a la zona dañada, mediante mecanismos relacionados con la excitotoxicidad que resulta de la regulación ineficiente del glutamato en el sitio de la sinapsis. La excitotoxicidad se caracteriza por el aumento en la excitación de los receptores glutamatérgicos, la pérdida en la homeostasis del Ca^{2+} , falla energética, estrés en retículo endoplásmico, producción de especies reactivas de oxígeno y degeneración de axones, dando lugar a la muerte neuronal (Tovar-y-Romo et al, 2016). En respuesta a ello, se activa la neuroinflamación, que es un proceso en el que participan las células del sistema inmune y sus mediadores que son las citocinas, las cuales se transportan de manera selectiva a través de la barrera hematoencefálica (Tan et al, 2014).

La neuroinflamación protege o daña al tejido, dependiendo del tiempo en que esta se mantiene. La neuroinflamación involucra la activación de las células gliales, entre las que destacan los astrocitos. Los astrocitos aumentan su proliferación y forman lo que se conoce como cicatriz glial. La función de la cicatriz glial es prevenir la expansión del daño y generar un ambiente de reparación, sin embargo, cuando hay una activación sostenida de la glía, conocida como gliosis reactiva, se genera más bien



un ambiente de neurodegeneración (Tovar-y-Romo et al, 2016). En la neurodegeneración los astrocitos presentan cambios morfo-funcionales, por lo que se altera la homeostasis, defensa y regeneración del SNC, el tipo de remodelación de los astrocitos determina si hay una respuesta fisiológica o patológica en el SNC (Verkhatsky et al, 2016).

2. ANTECEDENTES

El envejecimiento es el principal factor de riesgo de las enfermedades neurodegenerativas, las cuales presentan un estado de neuroinflamación persistente que induce la muerte neuronal lenta y progresiva. Las células de la glía, como los astrocitos, presentan cambios en su morfología y en su función (Rodriguez-Arellano, 2016). Esto puede fomentar la pérdida de la interacción neurona-astrocito (Hill et al, 2016), y compromete la homeostasis del tejido nervioso desencadenando múltiples eventos, como la excitotoxicidad que está relacionada con la hiperexcitación de receptores glutamatérgicos que incrementa la concentración de iones Ca^{2+} y la neuroinflamación persistente. Los astrocitos pueden liberar citocinas que permiten la comunicación entre neuronas y astrocitos, además de ser mediadores de la respuesta inmune e inflamatoria (Hill et al, 2016).



Recientemente se ha demostrado que hay un aumento en la cantidad de astrocitos senescentes en relación con la edad y el incremento es mayor en los organismos que presentan enfermedades neurodegenerativas (Bath et al, 2012).

Los astrocitos senescentes adquieren el fenotipo secretor denominado SASP que se caracteriza por el incremento de citocinas pro-inflamatorias (Coppe et al, 2008), además, hay un cambio en los receptores y canales en la membrana plasmática, estos dos son consecuencia de la alteración en la dinámica del tráfico vesicular que depende del citoesqueleto; el aumento en la proteína acídica fibrilar glial (GFAP) incrementa en los astrocitos debido al incremento en dichos procesos (Hill et al, 2016).

Aún no es claro el papel de la senescencia en el deterioro cerebral ni en las enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, se ha observado que algunos componentes característicos de la senescencia se encuentran elevados en las neuropatologías. Recientemente se ha demostrado la presencia de células senescentes en cerebros de pacientes con las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. Se han encontrado aumentados diversos marcadores de senescencia como los niveles de las proteínas p16 (Bath et al, 2012) y p21 (inhibidores del ciclo celular), citocinas características de los componentes del SASP como la IL-6, hiperactividad de p38MAPK, un componente que regula la transcripción de los componentes del SASP; los niveles del ARNm de TGF β , el cual induce senescencia celular *in vitro*, la actividad de SA- β -Gal, entre otros (Tan et al, 2014). Sin embargo, a pesar de que todos estos marcadores relacionados con la senescencia se han



descrito en astrocitos, se desconoce cómo es que contribuyen en el envejecimiento del cerebro y en la neurodegeneración.

Se piensa que estos cambios en las funciones básicas de la neuroglía aumentan la susceptibilidad a la neurodegeneración, pues la remodelación patológica de los astrocitos modifica varias vías de señalización, sobre todo las mediadas por Ca^{2+} (Verkhatsky et al, 2016). Por otra parte el SASP que presentan los astrocitos senescentes puede estar reforzando la neuroinflamación y con ello la alteración de las funciones neuronales (Chinta et al, 2015).

Hasta el momento no se ha descrito si la senescencia tiene un impacto directo en el mal funcionamiento de las neuronas durante el envejecimiento ni en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, tampoco se sabe si la senescencia es una consecuencia de la activación de la glía (astrogliosis) como mecanismo de amplificación de la neuroinflamación. Por ello se propone un modelo en el que coexistan neuronas con astrocitos senescentes y de esta manera conocer si los componentes del SASP de las células senescentes alteran las funciones de las neuronas corticales.



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

3.1. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la pirámide poblacional de México y el mundo ha cambiado incrementándose la población de personas de edad avanzada. Entre el año 2000 y el 2050, la población mundial mayor de 60 años se triplicará, donde el número de personas mayores pasará de 400 millones en el año 2000 a 1,700 millones en el año 2050 (WHO, 2015). Se sabe que las enfermedades neurodegenerativas, tales como Alzheimer, Parkinson, Huntington, Esclerosis Lateral Amiotrófica, etc., se incrementarán en los próximos 40 años (Lausted et al, 2014; Cannon y Greenamyre, 2011; WHO, 2015). Dichas enfermedades se asocian al envejecimiento y son de naturaleza crónica, se caracterizan por la alteración de las funciones corticales que comprometen las actividades intelectuales como la memoria, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje, la motricidad y la toma de decisiones. Además, las alteraciones en el funcionamiento del SNC conllevan a la desregulación de los otros sistemas corporales (Lausted et al, 2014; Cannon y Greenamyre, 2011; Lok et al, 2013).

La interacción de los astrocitos con las neuronas es fundamental para la homeostasis del tejido, pues hay secreción de moléculas e interacciones por contacto que deben ser estudiadas. Los astrocitos son las células encargadas de regular diversas



funciones como el metabolismo del SNC pues proveen de nutrientes a las neuronas; la concentración de neurotransmisores en el espacio conocido como sinapsis, debido a que pueden estar recapturando los neurotransmisores y los procesos de neuroprotección necesarios para evitar la neurodegeneración. Debido a las múltiples funciones de los astrocitos, es importante considerar que los astrocitos senescentes se asocian al mal funcionamiento del SNC (Salminen et al, 2011), promoviendo el deterioro cerebral durante el envejecimiento y posiblemente la inducción de EN.

A pesar de que se sabe que los astrocitos pueden adquirir un fenotipo senescente y que el número de astrocitos senescentes aumenta con la edad, el papel que la senescencia desempeña en el envejecimiento del SN y en el desarrollo de patologías que comprometen a las neuronas no se tiene claro, por lo que es importante estudiar qué efectos tiene la senescencia de los astrocitos en la funcionalidad de las neuronas corticales, para así poder desarrollar terapias preventivas que mejoren la calidad de vida de los adultos mayores.

3.2. OBJETIVOS DEL PROYECTO

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de los astrocitos senescentes sobre las funciones de las neuronas corticales cuando se encuentran en co-cultivo.



OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las condiciones para generar dos distintos modelos de co-cultivos para estudiar el efecto de los astrocitos senescentes sobre las neuronas corticales.
- Determinar el efecto de los astrocitos senescentes sobre la funcionalidad mitocondrial de las neuronas corticales.
- Determinar el efecto de los astrocitos senescentes sobre la densidad sináptica en las neuronas corticales.

3.3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existirá un efecto de los astrocitos senescentes sobre la funcionalidad de las neuronas corticales primarias de rata?

4. HIPÓTESIS

Los astrocitos senescentes generan un ambiente de inflamación debido a la secreción del SASP, lo que provocará una disminución en la funcionalidad de las neuronas corticales de rata.



5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 ANIMALES

Para realizar los cultivos primarios de astrocitos corticales se usaron ratas de la cepa Wistar de dos edades, neonatas (5 a 7 días) y viejas (20 a 24 meses). Además de ratas embrionarias de entre 17 y 18 días de gestación para el aislamiento de neuronas corticales. Los animales fueron proporcionados por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, así como por el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México y fueron tratadas de acuerdo a los principios éticos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

5.2 MODELOS DE ESTUDIO

Se realizaron cuatro diferentes modelos de co-cultivos de neuronas y astrocitos empleando cámaras transwell (el procedimiento se detalla más adelante):

- a) Control negativo: Se sembraron únicamente las neuronas corticales sin la presencia de los astrocitos.
- b) Control: Se co-cultivaron los astrocitos primarios de rata neonata sin ningún tratamiento con neuronas corticales.
- c) Modelo SIPS: Se realizaron los co-cultivos de astrocitos de rata neonata a los cuales se les indujo senescencia prematura mediante estrés oxidante (SIPS) con neuronas corticales.



d) Modelo de envejecimiento: Se co-cultivaron astrocitos primarios aislados de rata vieja con neuronas corticales.

5.3 CULTIVO DE NEURONAS CORTICALES

Para obtener las neuronas corticales se utilizaron ratas embrionarias de entre 17 y 18 días de gestación (Brewer et al, 1993). Se emparejaron ratas hembras de 3 y 7 meses de edad. Para asegurar que quedaran preñadas, se observó que mostraran un comportamiento receptivo. Las ratas hembra se dejaron con una rata macho competente durante una noche, tomándose ese día como el día 0 y así llevar el conteo de los días de gestación.

Un día previo al aislamiento de neuronas, se trataron las placas de cultivo con poli-L-lisina (5 µg/ml, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), se esterilizaron los materiales requeridos para la disección y se prepararon las soluciones KRB, 1, 2, 3, 4 y 5; descritas en el anexo 1.

Se sacrificó a las ratas por decapitación y el animal se disectó a lo largo de la zona abdominal (figura 1a y 1b) para exponer los órganos abdominales. Empleando unas pinzas se tomó el útero con los embriones (figura 1c y 1d) y con las tijeras se retiró el tejido graso. El útero se depositó en una caja Petri con la solución 1 (figura 1d y 1e).



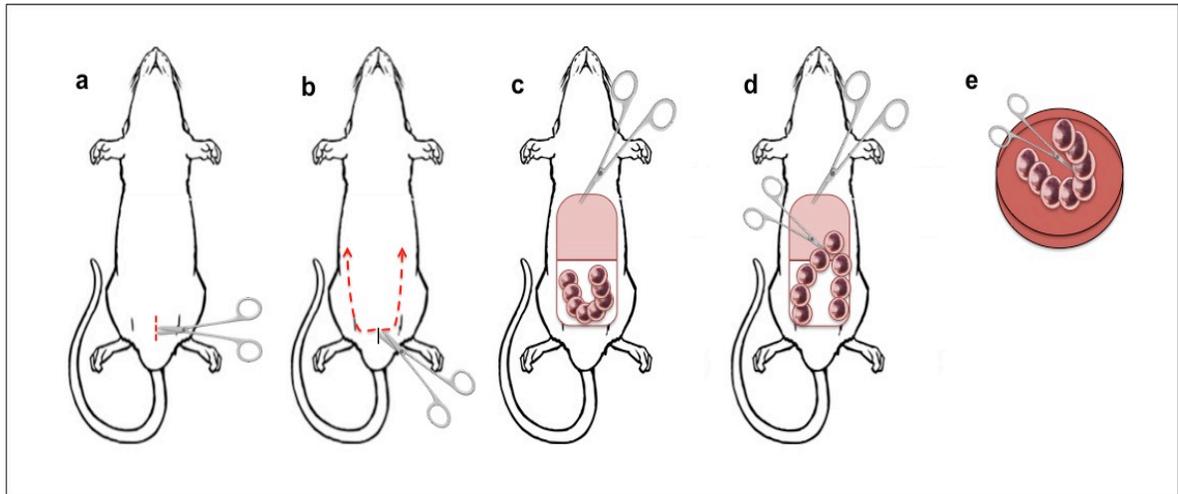


Figura 1. Esquema donde se muestra la extracción de los sacos embrionarios. Se muestran las zonas donde se realizaron los cortes de la piel, empezando en la parte medial de la región pélvica (a), para continuar por la zona lateral (b) hasta llegar al diafragma, donde se realiza el corte del músculo y la pleura, siguiendo el mismo trayecto para exponer los órganos de la cavidad abdomino-pélvica (c) para poder extraer los sacos embrionarios (d y e).

Se transfirió la caja Petri con los embriones a la campana de flujo laminar donde se realizó el cultivo primario. Con ayuda de unas pinzas de relojero, se abrieron cada uno de los sacos embrionarios y se extrajeron los embriones (figura 2a), los cuales fueron colocados en otra caja en donde se realizó un corte transversal a la altura de la nariz para obtener el cráneo y colocarlo en la siguiente caja (figura 2b). Bajo el microscopio estereoscópico se extrajo el cerebro, se retiraron las meninges y se diseccionaron las cortezas. Para ello se sujetó el tallo cerebral con las pinzas y con ayuda de otras pinzas se desdoblaron y cortaron las cortezas (figura 2c), las cuales se fueron juntando en la cuarta caja donde se filetearon con un bisturí y se recolectaron en el tubo que contenía 10 ml de la solución 1.

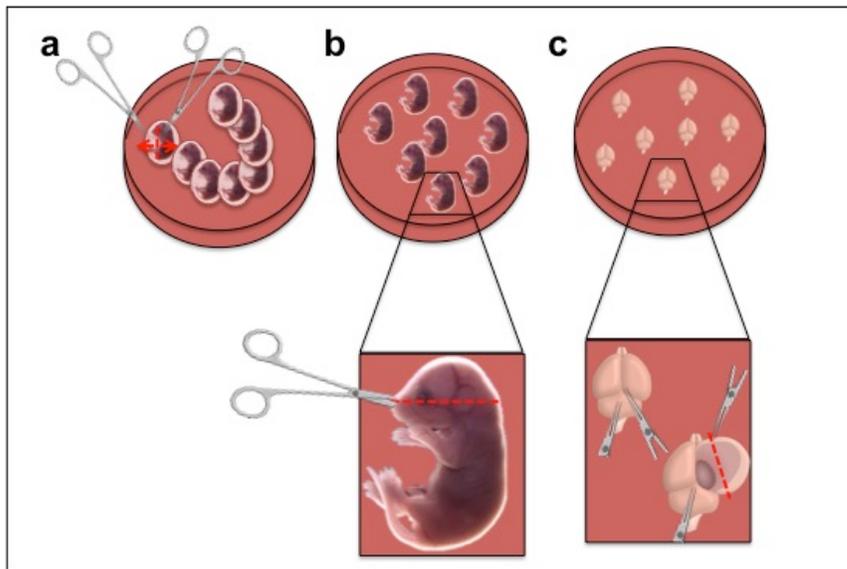


Figura 2. Obtención de cortezas. Se muestra la obtención de cada embrión, al abrir cada saco embrionario (a), para la disección del cráneo se realizó el corte rostral a la altura de la nariz para exponer el cerebro (b) finalmente se retiraron las meninges y se aisló la corteza (c).

Se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min. Se colocaron 7 ml de la solución 2, se agregaron directamente 7 μ l de tripsina-EDTA y se agitó vigorosamente; inmediatamente después se agregaron 7 ml de la solución 4 la cual contiene el inhibidor de tripsina y se resuspendió por inversión para inactivar a la tripsina. Se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 5 ml de la solución 3 y en otro tubo se filtraron 5 ml de la solución 5. Con una pipeta Pasteur se resuspendió el botón para homogenizar, se tomó la suspensión y se colocó en un dispositivo que tiene acoplado una malla de acuario para continuar disgregando las células.

Se tomó la suspensión celular por fuera de la malla, es decir, la que se encuentra en el vaso de precipitado y se colocaron en el tubo que contenía la solución 5. Se

centrifugó a 3000 rpm durante 3 min, se retiró el sobrenadante y se agregaron 10 ml del medio neurobasal (Gibco Life Technologies) suplementado con B27 complete y B27 minus AO (Gibco Life Technologies), 0.5 mM l-glutamina y 20 µg/ml gentamicina. Las células se contaron mediante el método de exclusión de azul de tripano, descrito posteriormente, para conocer el número de neuronas viables que se obtuvieron. Se retiró la poli-L-lisina de las cajas de cultivo y se sembraron las neuronas a una densidad de 83×10^3 células/cm². Se incubaron a 37° C con 5% CO₂ y se cambió la mitad del medio de cultivo cada 4 días.

5.4 CONTEO CELULAR POR MÉTODO DE EXCLUSIÓN DE AZUL DE TRIPANO

Una vez que se tuvo a las células en suspensión con un volumen conocido de medio de cultivo, se homogenizó y de ahí se tomaron 20 µl de la suspensión y se diluyeron en 20 µl de azul de tripano. De ahí se tomaron 10 µl y se colocaron en un hemocitómetro (cámara Neubauer). Se observaron al microscopio y se contaron las células viables, (que son aquellas que no incorporan el colorante), en 4 cuadrantes y se calculó la media (\bar{x}).

El número total de células se calculó mediante la ecuación:

$$N = (\bar{x})(FD)(10^4)(V)$$

Dónde: N= número total de células

V= volumen total de la suspensión de células

FD= factor de dilución



5.5 CULTIVO DE ASTROCITOS

El cultivo primario de astrocitos se obtuvo de la corteza cerebral de los animales de acuerdo con el protocolo descrito en McCarthy y de Vellis 1980; Lin et al., 2007. Una vez sacrificadas las ratas neonatas y viejas, se extrajo el cerebro y se colocó en un tubo de 50 ml con PBS frío. Dentro de la campana de flujo laminar, el cerebro se colocó en una caja Petri de 10 cm de diámetro, y se realizaron 3 lavados con PBS. Se disectó la corteza cerebral, se filetearon las cortezas con un bisturí, se recuperó el tejido en un tubo de 15 ml, se agregaron 5 ml de PBS y se resuspendió vigorosamente para disgregar el tejido. Posteriormente, se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 10 ml de medio de cultivo Neurobasal (Gibco Life Technologies) suplementado 0.5 mM l-glutamina, suero fetal bovino al 10% y antibiótico al 1%. Se resuspendió y se filtró a través de un sernidor cuyo filtro tiene un poro de 100 μ m. Se recuperó el filtrado de manera directa en la caja petri de 10 cm y se incubaron las células a 37 °C. Pasadas 24 horas, se sembraron las células en una nueva caja petri y la primer caja fue lavada con PBS y se añadió medio de cultivo frío. En el caso de los astrocitos de las ratas viejas, se aislaron con medio de cultivo MEM combinado con medio Neurobasal 1:1.



5.6 SENESCENCIA PREMATURA INDUCIDA POR ESTRÉS (SIPS)

Los astrocitos del grupo SIPS se sembraron en las placas transwell tres días antes del aislamiento de neuronas, para que el mismo día que se realizó el aislamiento de neuronas se indujo el fenotipo senescente mediante estrés oxidante. Para esto, se adicionó H_2O_2 50 μM y se dejaron incubar durante 2 horas a 37°C , 5% CO_2 . Pasado ese tiempo, se retiró el medio y se reemplazó con medio fresco. Seis días después del estímulo, aproximadamente el 80% de la población de astrocitos era senescente y se pudo realizar el co-cultivo con las neuronas.

5.7 ENSAYO SA- β -GAL

Para asegurar que los astrocitos se encontraban en senescencia se realizó el ensayo SA- β -Gal. Las células se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído al 3% durante 5 min a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron a 37°C sin CO_2 (cerrando las placas con parafilm) con la solución de tinción SA- β -Gal (senescence associated- β -galactosidase): amortiguador de ácido cítrico/fosfato de sodio 40 mM pH=6, 1mg/mL de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside), ferrocianuro de potasio 5 mM, ferricianuro de potasio 5 mM, NaCl 150 mM y MgCl_2 2 mM (Dimri et al., 1995). Pasadas 24 horas, se contaron al menos 100 células por pozo y se determinó el porcentaje de células positivas a la tinción. Las células senescentes contienen un exceso de la enzima



β -galactosidasa, que aunque la solución se encuentre a un pH subóptimo de 6.0, hidrolizan el compuesto X-Gal y forman un precipitado azul.

5.8 CO-CULTIVOS

Para el co-cultivo se aislaron previamente las neuronas de rata neonata, así como astrocitos de ratas neonatas y viejas, para realizar los modelos de co-cultivo antes mencionados. Se utilizaron insertos transwell de poliestireno con poro de 0.4 μm , se utilizaron de distintos diámetros 6.5 mm, 12 mm y 24 mm para los ensayos de MTT, JC1 y densidad sináptica en las neuronas, respectivamente.

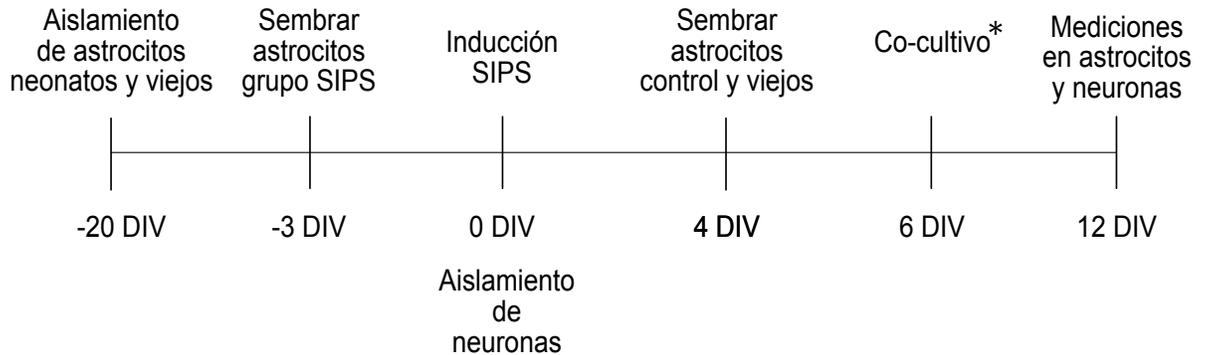
Para el modelo SIPS, se sembraron los astrocitos a una densidad de 31×10^3 células/cm² 3 días previos al aislamiento de neuronas y se les indujo el fenotipo senescente, como se describió antes, el mismo día en que se realizó el cultivo de neuronas.

Para los modelos control y envejecimiento, se sembraron los astrocitos a la misma densidad celular, cuando las neuronas se encontraban en el cuarto día *in vitro* (DIV). Los astrocitos de todos los modelos se mantuvieron separados de las neuronas hasta el sexto DIV, día en que se realizaron los co-cultivos, transfiriendo el inserto transwell con ayuda de unas pinzas estériles a las placas donde se tuvieron sembradas las neuronas (figura 3).

Se mantuvieron seis días en co-cultivo, pasado este tiempo se retiró el inserto transwell y se realizaron los ensayos MTT, JC1 y densidad sináptica en las neuronas (12 DIV).

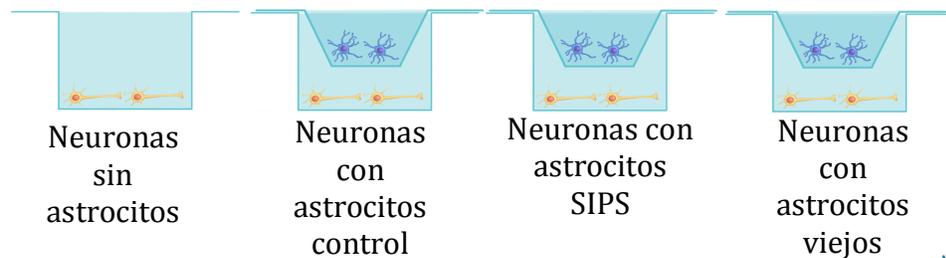


a



b

Co-cultivo*



Imagine
cells

Figura 3. Esquema de co-cultivos. En a) se muestra la línea del tiempo que representa los días in vitro en los que se llevan a cabo los co-cultivos, teniendo en cuenta que los astrocitos fueron previamente sembrados en los insertos transwell como ya se describió anteriormente. En b) se muestran los grupos experimentales con los que se trabajó en cada co-cultivo.

5.9 INMUNOCITOQUÍMICAS

Las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio y el día del ensayo se lavaron dos veces con PBS para retirar el medio de cultivo, y posteriormente se fijaron con formaldehído al 3% durante 5 min y se realizaron 2 lavados más para retirar el formaldehído. Se incubaron durante 10 min con 200 μ l de bloqueador universal de proteínas, se retiró el bloqueador universal y se incubó con 200 μ l del



anticuerpo primario durante 1 hora. Posteriormente se hicieron dos lavados con PBS-tween, se incubó 200 μ l de un segundo anticuerpo primario durante 1 hora y se realizaron 2 lavados con PBS-Tween y un tercer lavado con agitación durante 5 min. A partir de este momento se trabajó en condiciones de oscuridad, se incubó 200 μ l del anticuerpo secundario durante una hora y se realizaron tres lavados con PBS-Tween con agitación y se incubó con 200 μ l de un segundo anticuerpo secundario durante una hora y se realizaron tres lavados con PBS-Tween con agitación. Se colocaron 20 μ l de solución de montaje con DAPI en un portaobjetos y se colocó en el cubreobjetos donde se fijó la muestra. Las preparaciones se almacenaron a 4 °C hasta el momento de su observación, la cual se realizó en un microscopio confocal Carl Zeiss modelo LSM 780 NLO. Todos los anticuerpos utilizados fueron diluidos en PBS-Tween (0.2% de tween en PBS).

5.9.1 CARACTERIZACIÓN DE ASTROCITOS

Se utilizó el anticuerpo primario Anti-GFAP-cabra (Santa cruz biotechnology, CA), dilución 1:50 que detecta la proteína GFAP (proteína acídica fibrilar glial) como marcador de astrocitos y el anticuerpo secundario Anti-cabra Alexa Fluor 488, dilución 1:500.



5.9.2 CARACTERIZACIÓN DE NEURONAS

Se utilizó el anticuerpo primario Anti- β -III-tubulina-ratón (Santa cruz biotechnology, CA), dilución 1:1000 y el anticuerpo secundario Anti-ratón Alexa Fluor 594, dilución 1:500.

5.9.3 DENSIDAD SINÁPTICA

Se utilizó el anticuerpo primario Anti- β -III-tubulina-ratón (Santa cruz biotechnology, CA), dilución 1:1000 y el anticuerpo secundario Anti-ratón Alexa Fluor 488, dilución 1:500 para detectar el citoesqueleto de las neuronas y el anticuerpo primario Anti-Syt1-conejo (US, Biological), dilución 1:1000 y el anticuerpo secundario Anti-conejo Alexa Fluor 594, dilución 1:500 para detectar la sinaptitagina.

5.10 VIABILIDAD CELULAR

Se empleó la técnica de Mosmann 1983, cuyo fundamento se basa en la reducción del compuesto MTT (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5difetil bromuro de tetrazolio) por medio de la transferencia de electrones a través del complejo II (succinato deshidrogenasa) de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Se midió la funcionalidad mitocondrial de las neuronas a los 12 DIV, después de haber estado 6 días en co-cultivo. Se diluyó el MTT en PBS (1mg/ml)



y de ésta solución se tomaron 50 μ l por cada ml de medio de cultivo. Se incubaron las células con 1 ml de medio de cultivo con el MTT durante 1 hora a 37°C y CO₂ 5%. Se retiró el medio con MTT y se agregó 1 ml de solución de extracción (HCl 1 N en isopropanol) manteniendo las células en agitación durante 15 min para disolver el formazán. Se recuperó la solución de extracción y se midió la absorbancia en celdas de 1 cm a una longitud de onda de 570 nm.

5.11 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Se trabajó con las neuronas a los 12 DIV, después de haber estado en co-cultivo con los astrocitos como se describió previamente. Se utilizó el colorante catiónico JC1, partiendo de un stock 1mg/ml, se tomó 1 μ l por cada 1 ml de medio de cultivo y se añadió a las neuronas vivas y se incubó durante 30 min. Pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio que contenía al colorante y se utilizó la solución Lockey para realizar la observación de las muestras en un microscopio confocal Leica modelo TCS-SPS, con un objetivo de inmersión en agua 63X, excitando la muestra con un láser de argón a 488 nm. Se analizó la densidad emitida en rojo a 590 nm, que indica la formación de agregados de JC-1 dentro de la mitocondria cuando el potencial de membrana mitocondrial se encuentra bien y en verde a 525 nm, que indica una despolarización, por lo que no se forman los agregados y el colorante se observa de manera difusa (monómeros) en el citosol. Se cuantificó la intensidad de la fluorescencia para el canal rojo y el verde y se realizó el cociente Rojo/Verde.



5.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos se realizaron por triplicado en 3 eventos independientes, se les aplicó el análisis estadístico por análisis de varianza (ANOVA) seguida de la prueba Tukey con un nivel de probabilidad de $p < 0.05$ como criterio mínimo de significancia.

6. RESULTADOS

6.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ASTROCITOS

Se inició con el aislamiento de astrocitos corticales de ratas neonatas en medio neurobasal y se caracterizaron evaluando la presencia de la proteína GFAP característica de astrocitos (Figura 4).



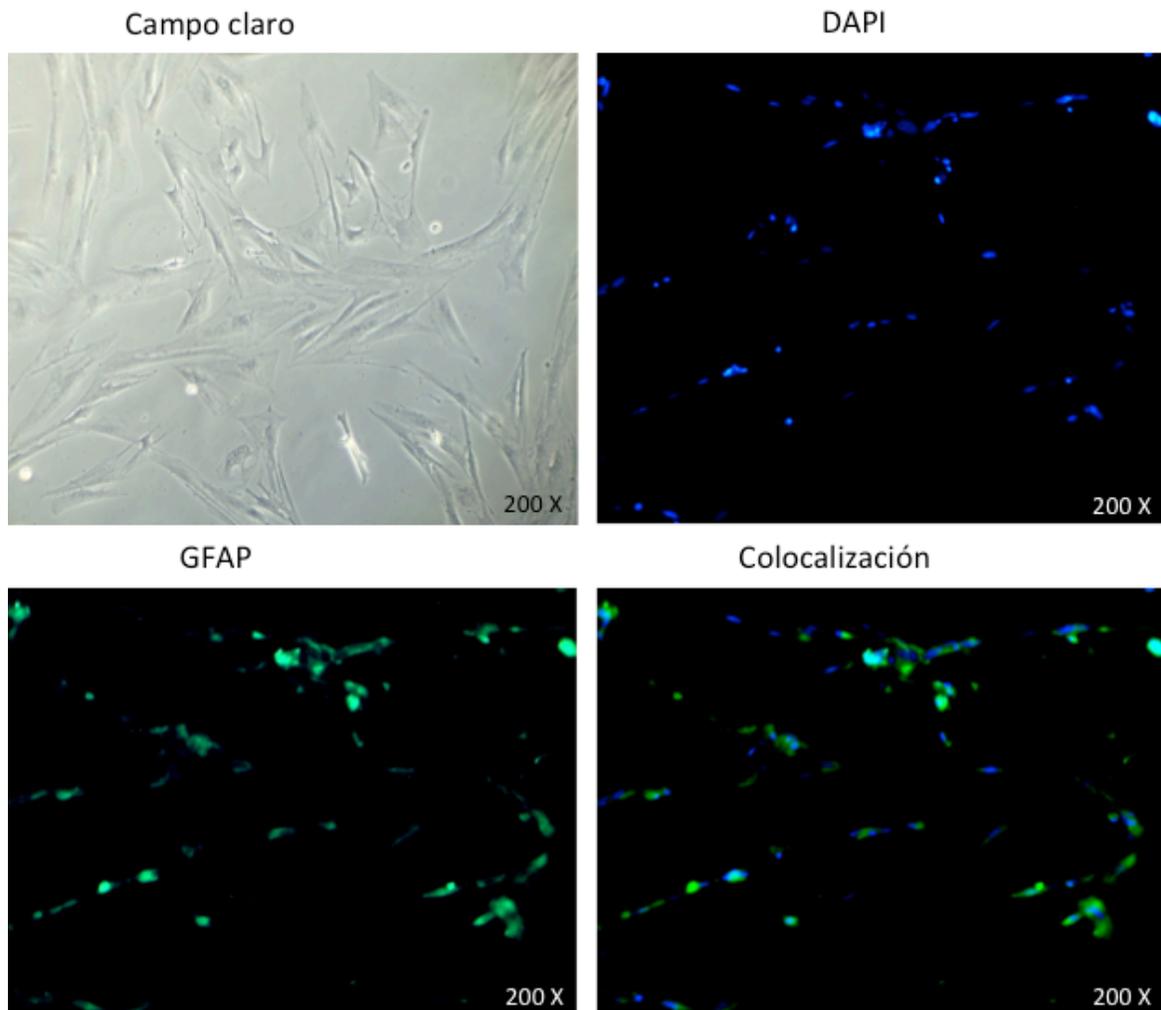


Figura 4. Caracterización de astrocitos. Astrocitos aislados en medio neurobasal, se muestra la imagen de microscopía de campo claro y la inmunofluorescencia en microscopía confocal donde se marca en verde la proteína GFAP para caracterizar a los astrocitos.

Para los astrocitos de ratas neonatas, se sembraron los “astrocitos control” y “astrocitos senescentes” para realizar los ensayos de proliferación celular (Figura 5) y el ensayo de SA- β -gal (Figura 6 a y b) a los 2, 4, 6 y 8 días posteriores al estímulo con H₂O₂. En la proliferación celular no se encontraron diferencias dentro del grupo SIPS a los diferentes días.

El día 6 posterior al estímulo, el 80% de la población de astrocitos SIPS fue positiva al ensayo SA- β -gal (Figura 7), por lo que definimos ese momento como el día en el que los astrocitos deben ponerse en co-cultivo con las neuronas.

Por otra parte, el 10% de la población de astrocitos control es positiva a este ensayo durante los distintos días en que se realizó dicha determinación. En el caso de los astrocitos de rata vieja, es difícil que proliferen, por lo que no se realizó curva de proliferación, sin embargo si se realizó el ensayo de SA- β -gal para conocer el porcentaje de células positivas, el cual fue de un 50% (Figura 6c).

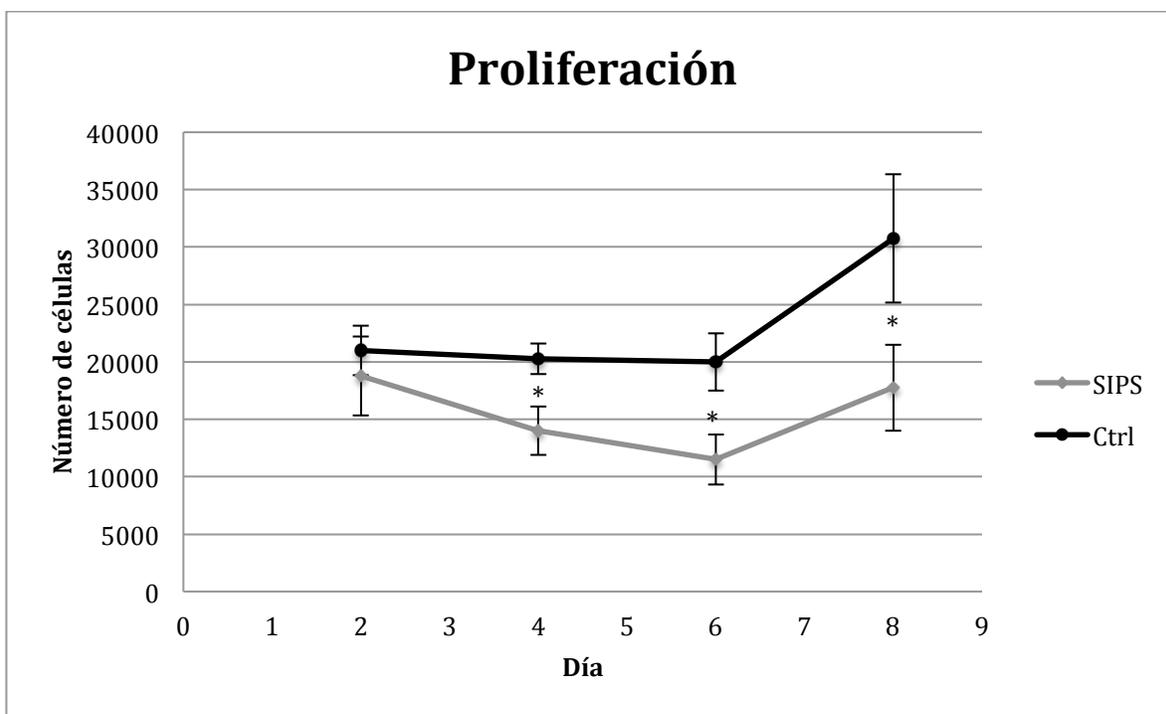


Figura 5. Proliferación celular de los astrocitos. Astrocitos neonatos control (Ctrl) y senescentes (SIPS). n=3 *p<0.05 Tukey-Kramer comparado con el control.

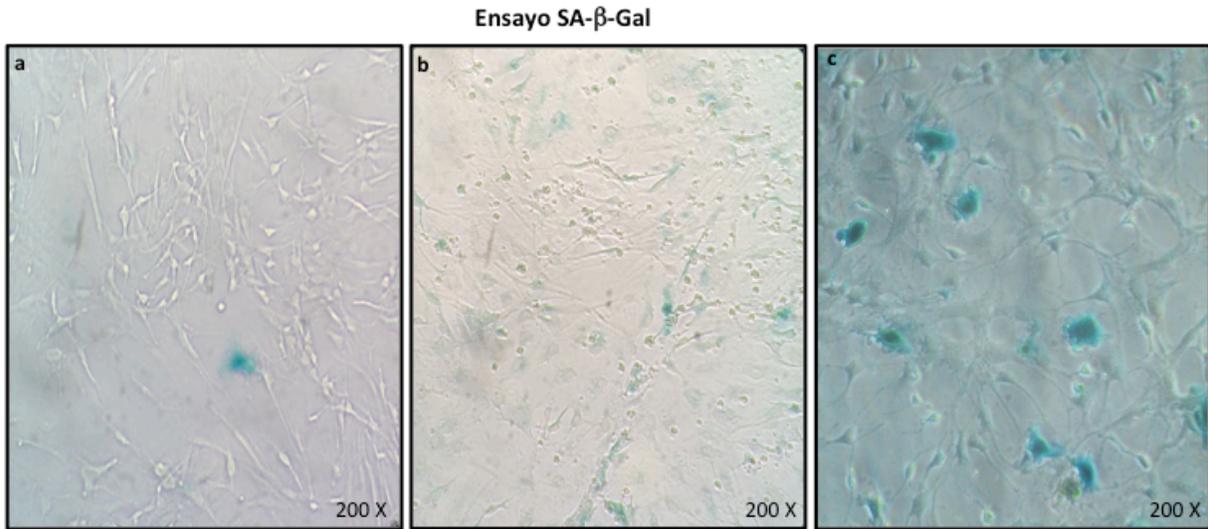


Figura 6. Ensayo SA-β-gal para los astrocitos. Se muestra la imagen de los astrocitos control (a), donde el 10% de la población es positiva al ensayo, mientras que para los astrocitos SIPS (b) el 80% de la población es positiva al ensayo el sexto día posterior al estímulo de estrés oxidante y los astrocitos viejos (c) presentan 50% de la población positiva a este ensayo n=3.

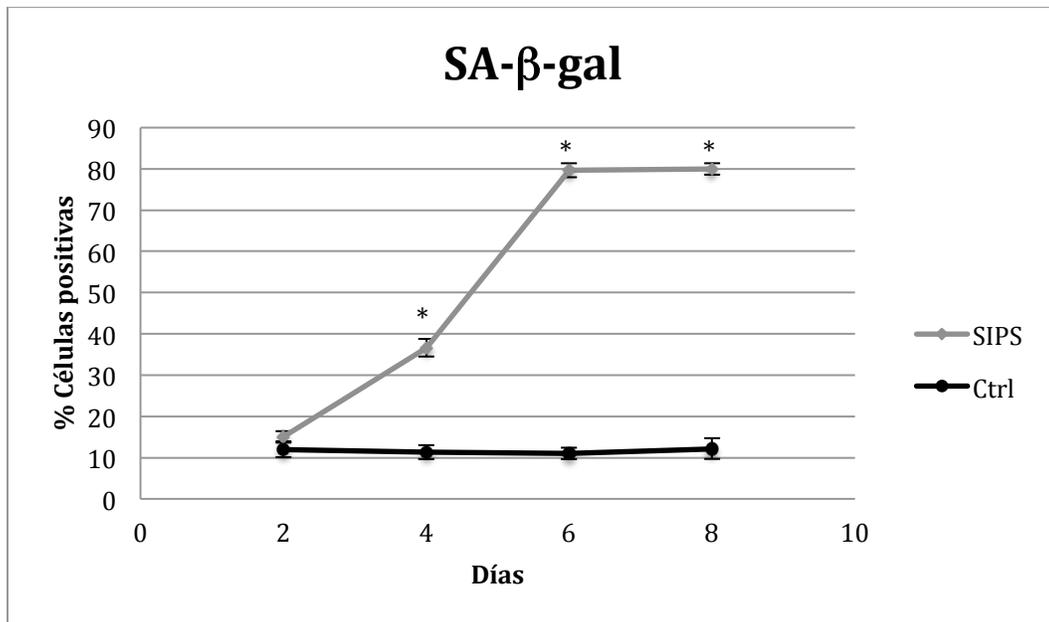


Figura 7. Porcentaje de células positivas al ensayo SA-β-gal. Se realizó el porcentaje de células positivas al ensayo a los 2, 4, 6 y 8 días posteriores al estímulo con H₂O₂. n=3 *p<0.05 Tukey-Kramer comparado con el control

6.2 CARACTERIZACIÓN DE NEURONAS

El cultivo primario de neuronas corticales fue caracterizado por inmunofluorescencia, marcando la proteína β -III-tubulina, que es un marcador de citoesqueleto específico para neuronas (Figura 8). Además se aprecia la morfología característica de las neuronas, distinguiéndose un soma y las proyecciones de axón y dendritas

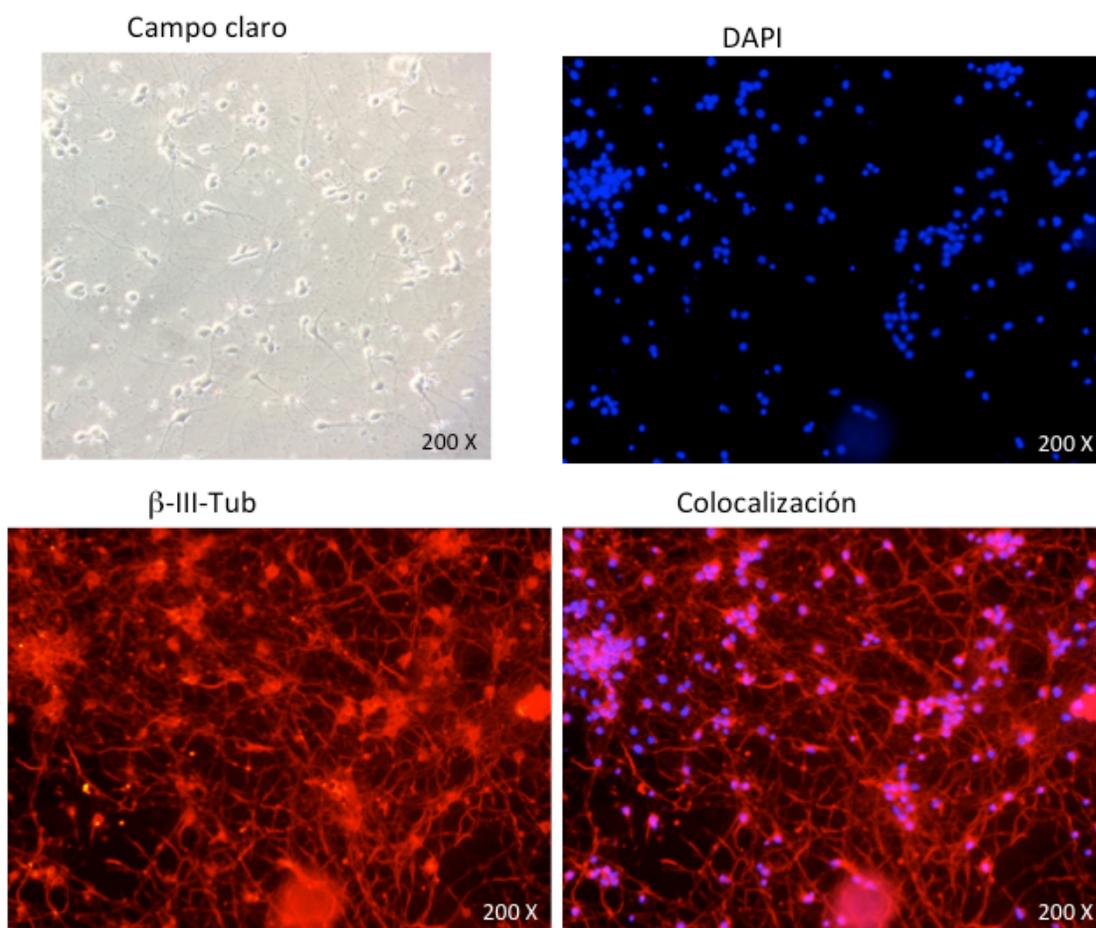


Figura 8. Caracterización de neuronas. Cultivo primario de neuronas corticales de rata a los 6 DIV, se muestra la imagen de microscopía de campo claro y la inmunofluorescencia en microscopía confocal donde se marca en azul los núcleos teñidos con DAPI y en rojo la β -III-tubulina.



6.3 ESTABLECIMIENTO DE LOS MODELOS DE CO-CULTIVOS

Durante el desarrollo de este proyecto se estableció un modelo de co-cultivo de neuronas y astrocitos con el fin de evaluar el efecto de los astrocitos senescentes sobre la funcionalidad de las neuronas. Los aspectos que fueron tomados en cuenta al momento de establecer los co-cultivos fueron los DIV del cultivo de neuronas. Es importante mencionar que las neuronas pueden estar en cultivo aproximadamente hasta 40 DIV, sin embargo para fines de este proyecto no es viable mantenerlas por muchos días ya que desde los 22 DIV empiezan a proliferar células gliales (astrocitos), esto se debe a que el medio de cultivo no es suplementado con la citocina que inhibe el crecimiento de los astrocitos, ya que nos interesa que los astrocitos que fueron sembrados en el transwell no fueran afectados por esta citocina. Por otra parte decidimos esperar 6 DIV para que las neuronas establecieran sus procesos (axones y dendritas) para así estudiar el efecto de los astrocitos senescentes sobre las neuronas maduras que ya establecieron conexiones entre ellas. Los astrocitos a los que les indujimos el fenotipo senescente, fueron utilizados seis días posteriores al estímulo con H_2O_2 , por ello es importante que los astrocitos fueran sembrados en el inserto transwell desde días previos para poder realizar el tratamiento el DIV cero. Al sexto día después del estímulo, el 80% de la población de astrocitos SIPS son senescentes.

El DIV 12, se retiró el inserto transwell en el que se tenían sembrados los astrocitos para poder realizar las distintas determinaciones en las neuronas.



6.4 ENSAYO DE VIABILIDAD

Se determinó la viabilidad de las neuronas mediante el ensayo de la reducción del MTT, este reactivo es una sal de tetrazolio que se reduce por la actividad de las enzimas deshidrogenasas dando lugar a un precipitado de formazán, el cual es un compuesto insoluble color morado. La principal deshidrogenasa que participa en la reducción de este compuesto es la succinato deshidrogenasa, dicha enzima se encuentra ubicada en la membrana interna de la mitocondria y es conocida como el complejo II de la cadena de transporte de electrones, participa en la respiración celular obteniendo los electrones de FADH_2 y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos pues lleva a cabo la oxidación del succinato, dando lugar a fumarato, por lo que la medición de su actividad nos indica que las células son viables y funcionales. En este caso no se observaron cambios en las neuronas al estar en co-cultivo con los astrocitos senescentes y viejos (Figura 9). Lo anterior posiblemente se debe a que la presencia de los astrocitos senescentes no es un factor que provoque un daño agresivo por lo que no se reflejan cambios en la viabilidad de las neuronas.



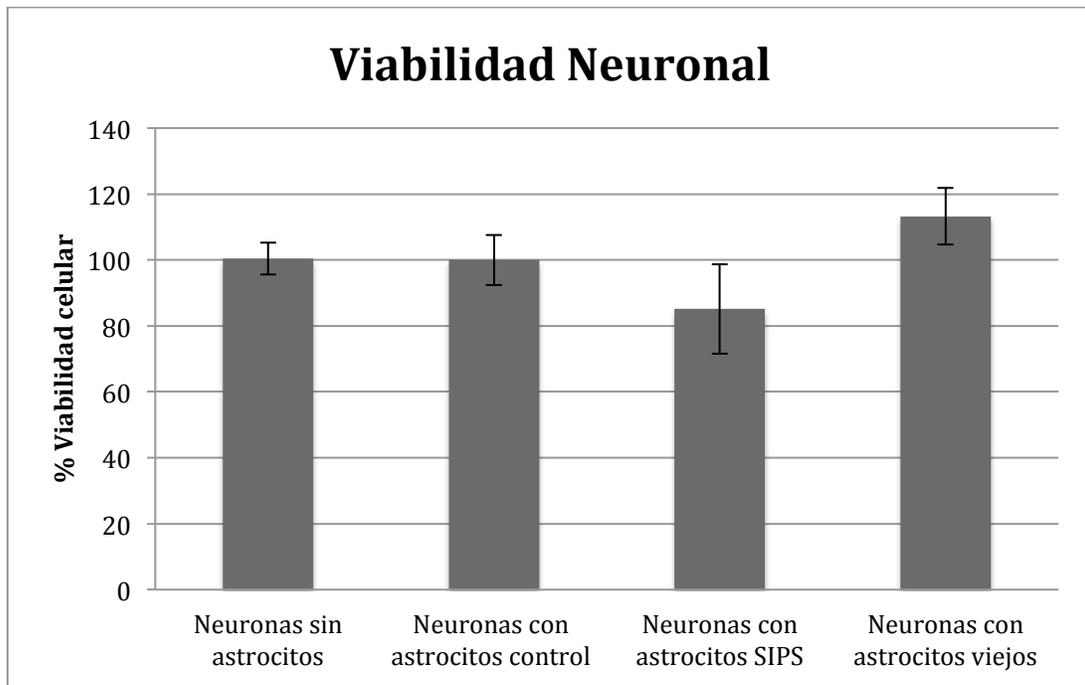


Figura 9. Viabilidad neuronal. Se cuantificó la formación del formazán en las neuronas a los 12 DIV, seis días después de estar en co-cultivo. Se normalizaron los valores respecto a las neuronas en co-cultivo con astrocitos control. Se muestran las desviaciones estándar n=2.

6.5 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

El potencial de la membrana mitocondrial fue analizado con el reactivo JC1, el cual por ser un colorante catiónico, discrimina las mitocondrias que tienen el potencial de membrana íntegro. Para que el JC1 logre ingresar al interior de la mitocondria es necesario que la mitocondria mantenga el potencial de membrana. La mitocondria genera un potencial electroquímico ya que al estar activa la cadena de transporte de electrones, los complejos I, III y IV liberan un protón hacia el espacio intermembranal, generándose un gradiente que provee la fuerza protón motriz para que el complejo V

pueda realizar la síntesis del ATP. Cuando las células mantienen dicho potencial de membrana mitocondrial, podemos asumir que se encuentran en buen estado y cuando pierden este potencial es porque comienzan a ser afectadas. Cuando el colorante ingresa a las mitocondrias se forman los J-agregados que emiten una señal a 590 nm (rojo) que nos indica cuáles son las mitocondrias funcionales y por el contrario al no ingresar a la mitocondria debido a la pérdida del potencial, quedan como monómeros que emiten una señal a 525 nm (verde) (Figura 10). Analizamos las neuronas, calculando el cociente de los J-agregados sobre los J-monómeros, normalizando respecto al grupo de neuronas que estuvieron con los astrocitos control y observamos que el valor de la formación de J-agregados es menor, aproximadamente de 0.7 en las neuronas que se encontraron con los astrocitos SIPS y viejos (Figura 11), lo que indica que estas neuronas están siendo afectadas en cuanto al potencial de membrana mitocondrial, cabe mencionar que es necesario realizar al menos un experimento más para poder realizar el análisis estadístico. Este primer acercamiento, da la pauta para hacer una exploración de los procesos que están ocurriendo en las mitocondrias, pues la disminución de su potencial de membrana puede afectar muchas de las funciones neuronales. Este resultado nos indica que la senescencia de los astrocitos sí provoca cambios en las neuronas, los cuales requieren un estudio a mayor profundidad abarcando los procesos de bioenergética y dinámica mitocondrial.



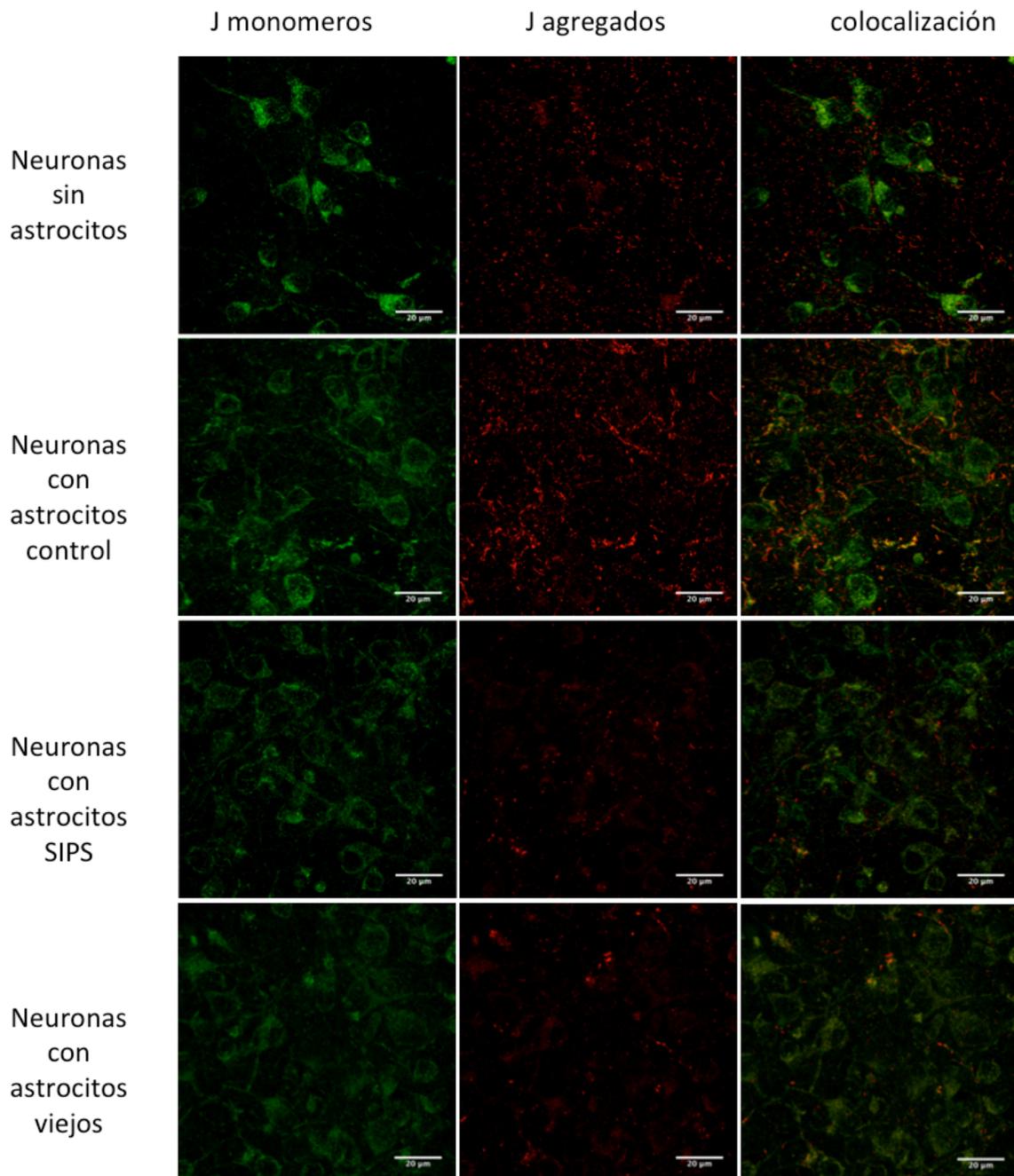


Figura 10. Potencial de membrana mitocondrial. Se muestra por microscopía confocal en verde los J-monómeros y en rojo los J agregados que se formaron en las mitocondrias que mantienen su potencial de membrana mitocondrial en neuronas a los 12 DIV. n=2

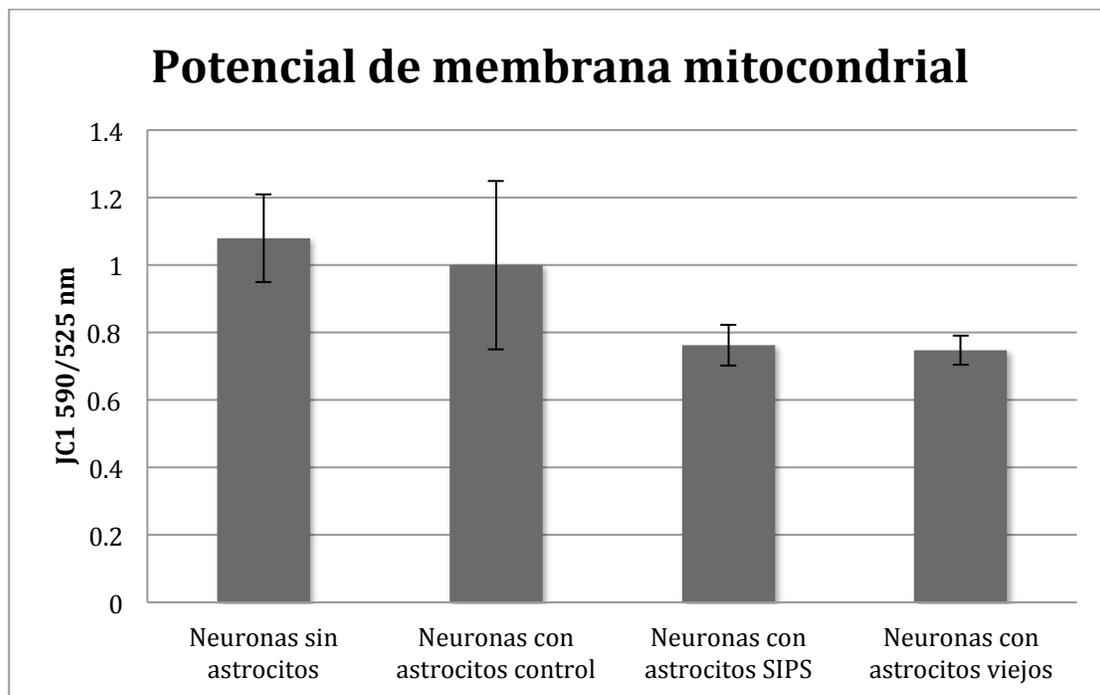


Figura 11. Potencial membrana mitocondrial de neuronas. Cociente de los J-agregados sobre los J-monómeros realizado en las neuronas a los 12 DIV, seis días después de estar en co-cultivo. Los datos fueron normalizados respecto al grupo de neuronas en co-cultivo con los astrocitos control. Se muestran las desviaciones estandar n=2.

6.6 DENSIDAD SINÁPTICA DE LAS NEURONAS

Se propuso hacer un análisis de la sinaptotagmia 1 (Syt 1), la cual es una proteína que forma parte de las vesículas que contienen a los neurotransmisores y permite la fusión de las vesículas con la membrana plasmática para la liberación del contenido, por lo que al observarla como puntos localizados en la membrana plasmática, nos estaría indicando que se está llevando a cabo el proceso de sinapsis. Observamos que las regiones que muestran a la sinaptotagmina, se localizan principalmente en el soma, por lo que se estaría hablando de sinapsis axosomáticas (Figura 12 y 13). En



las inmunofluorescencias, podemos observar que la morfología de los núcleos muestra que algunas células están muriendo, debido a que hay una condensación de la cromatina (Figura 12 y 13), es necesario realizar estudios más detallados sobre procesos de muerte celular. Las neuronas que no estuvieron en co-cultivo con los astrocitos presentan un citoesqueleto discontinuo, marcado con β -III-tubulina, además de presentar menor señal de Syt 1, sugiriendo que los astrocitos ayudan a que las neuronas mantengan las sinapsis. Las neuronas que estuvieron en co-cultivo con astrocitos senescentes, no disminuyen la señal de Syt 1.



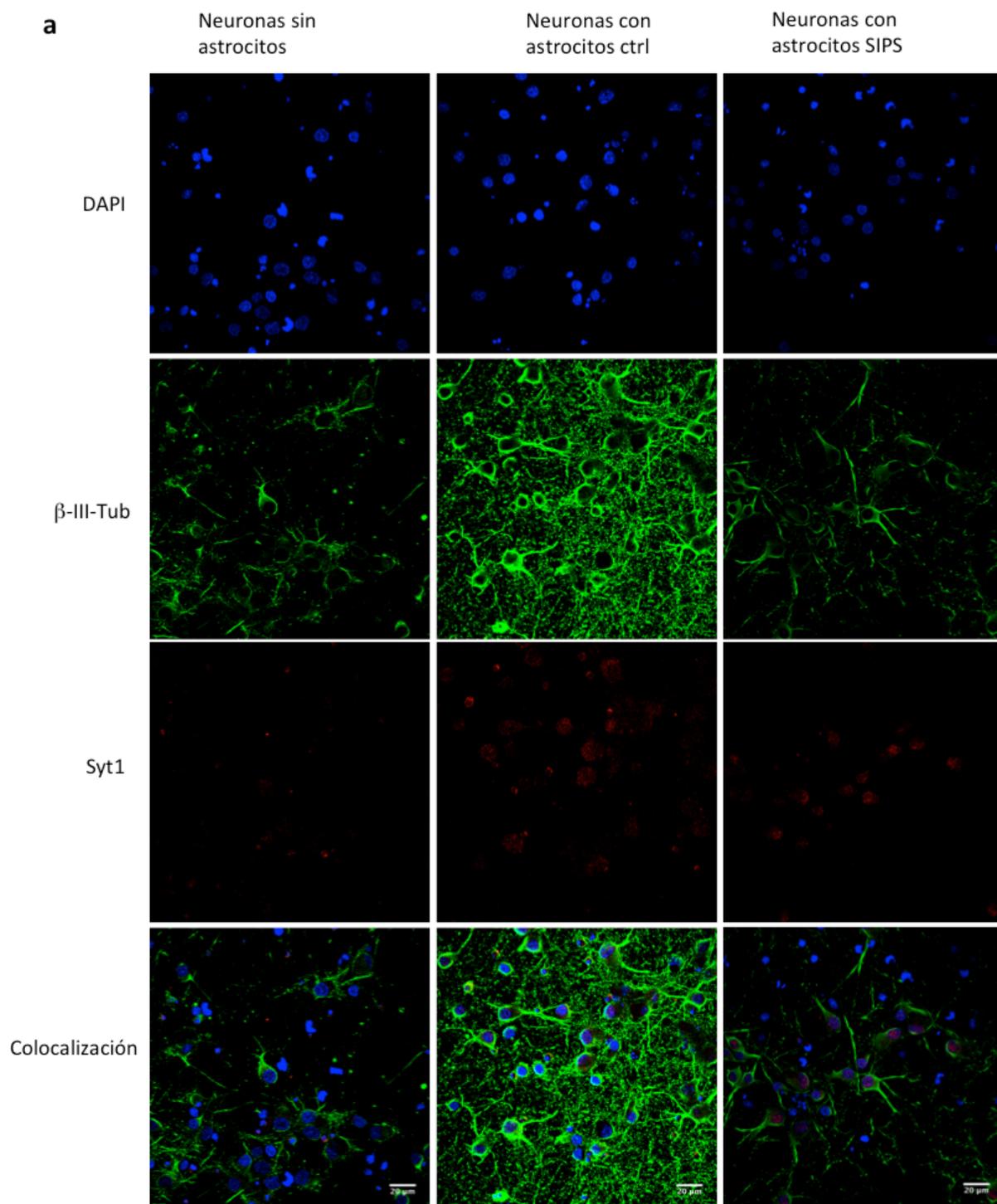


Figura 12. Densidad sináptica. Se muestra por microscopía confocal donde se muestra en rojo la Syt1 como los sitios donde se esta llevando a cabo el proceso de sinapsis, en verde la β -III-tub y en azul los núcleos marcados con DAPI n=2



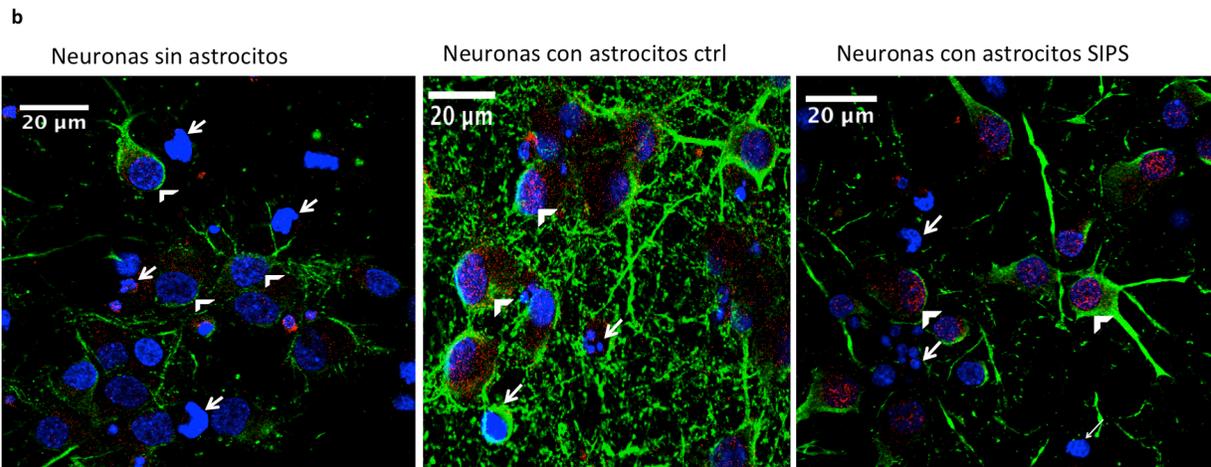


Figura 13. Densidad sináptica. Acercamiento de la figura 12 a. Las flechas indican núcleos con la cromatina condensada y las cabezas de flecha muestran las regiones de sinapsis axosomáticas n=2

7. DISCUSIÓN

Por mucho tiempo la senescencia celular ha sido un fenotipo estudiado principalmente en fibroblastos. En este modelo se han establecido gran parte de las características que se utilizan como marcadores de senescencia, las cuales ya han sido mencionadas en la introducción. Así mismo, se ha establecido un perfil de secreción del SASP el cual se caracteriza por tener un perfil pro-inflamatorio que tiene diversos efectos dependiendo del estado en que se encuentren las células que reciben el estímulo. Se sabe que el SASP tiene efectos benéficos, donde se incluyen proceso de reparación de tejidos, participación en el desarrollo embrionario, y promoción de la eliminación de estas células por el sistema inmune. Sin embargo durante el envejecimiento las células senescentes y el SASP que secretan se

acumulan debido a que la eliminación de estas células pierde eficiencia y da lugar a efectos deletéreos debido a que se promueve una inflamación crónica, que tiene como consecuencia la disfunción de diversos tejidos, por lo que los organismos son propensos a desarrollar diversas patologías.

En el sistema nervioso ya se ha establecido que los astrocitos son capaces de adquirir el fenotipo senescente. En este trabajo, se logró establecer la senescencia prematura de los astrocitos *in vitro* mediante estrés oxidante, utilizando el H₂O₂ promover el fenotipo senescente. Seis días posteriores a este estímulo, el 80% de la población es positiva al marcador SA-β-gal. Por otra parte se logró aislar astrocitos provenientes de ratas viejas y se observó que 50% de la población de astrocitos son positivos al ensayo SA-β-gal, por lo que comprobamos que los organismos viejos presentan mayor número de astrocitos senescentes pues al aislar los astrocitos de ratas neonatas, únicamente el 10% de las células fueron positivas a este ensayo.

Una vez establecido que los astrocitos son senescentes, se realizaron co-cultivos utilizando insertos transwell que permiten la comunicación entre los astrocitos y las neuronas mediante la secreción de moléculas, mas no permiten el contacto entre ellas. Por lo que los efectos observados en las neuronas después de estar en co-cultivo, se le atribuyen a la secreción del SASP proveniente de los astrocitos SIPS y viejos, teniendo como referencia a los astrocitos control y a las neuronas que no fueron expuestas a co-cultivo. Los componentes del SASP secretado por los



astrocitos difieren de la secreción dada por fibroblastos, se sabe que el SASP tiene perfil pro-inflamatorio y la IL-6 ha sido una de las moléculas que presenta un mayor aumento en los fibroblastos senescentes (Coppe et al, 2008; Rodier y Campisi, 2011). Por el contrario, nuestro grupo de trabajo observó que el incremento de IL-6 no es un componente del SASP presente en astrocitos, sin embargo la IL-1 α se encontró aumentada en astrocitos senescentes (Maciel-Barón et al, en revisión). La IL-1 α es una citocina cuyas funciones están relacionadas con un perfil pro-inflamatorio promoviendo la expresión de moléculas que refuerzan este perfil.

El fenotipo senescente y su modulación han sido estudiados debido a que la senescencia es un factor que promueve alteraciones en los tejidos, que en organismos viejos propicia el desarrollo de patologías. Una de las propuestas que ha cobrado relevancia en el estudio de la senescencia ha sido la eliminación selectiva de células senescentes y se ha comprobado que al eliminarlas, el tejido se recupera (Baker et al, 2011; Jeon et al, 2017) esta estrategia de eliminación de células senescentes es realizada en ratones transgénicos y permite el estudio de diversos tejidos. En organismos silvestres la eliminación selectiva de células senescentes no ha sido posible, por lo que otra alternativa ha sido buscar sustancias que modulen el perfil de secreción de estas células (Laberge et al, 2012). Al modular la secreción de estas células se busca aminorar los efectos que comprometen la funcionalidad de los tejidos.

Respecto al sistema nervioso, son pocos los estudios que existen donde se involucra al fenotipo senescente, la mayoría de estos están enfocados principalmente a la



caracterización del SASP y la búsqueda de moléculas que puedan modular la secreción de dicho SASP (Bath et al, 2012; Hou et al, 2017; Maciel-Barón et al, en revisión), por lo que en este proyecto decidimos explorar el efecto del SASP secretado por los astrocitos senescentes sobre la funcionalidad de las neuronas, la cual es esencial para el buen funcionamiento del tejido nervioso.

Los astrocitos senescentes mantienen una secreción continua de factores que componen el SASP, el cual genera alteraciones en las neuronas pues estas últimas muestran menor señal de J-agregados, lo que indica que las mitocondrias pierden el potencial de membrana. Es interesante mencionar que a pesar de que observamos cambios en el potencial de membrana, en el ensayo de MTT para viabilidad celular no se refleja una disminución en la producción del formazán. Una posible explicación de por que no se observaron cambios en la viabilidad, es que la presencia de los astrocitos senescentes no es un factor que promueva una muerte neuronal masiva, por lo que los valores de la reducción del MTT son similares en todos los grupos. Lo cual es congruente con lo esperado, ya que durante el envejecimiento hay pérdida de la funcionalidad neuronal, y la muerte neuronal se da de manera progresiva. Es importante mencionar que no es posible comparar nuestros resultados con otros estudios, ya que no existen estudios donde se analice el efecto de astrocitos senescentes sobre neuronas en general, y sobre la funcionalidad mitocondrial en particular. La mayoría de los estudios donde se analizan los efectos del SASP de células senescentes sobre otros tipos celulares se relacionan con el cáncer, por lo que se estudian los efectos sobre la proliferación y migración celular, desenlaces que



no tienen sentido en nuestro modelo. Otro potencial efecto del SASP es el reforzamiento, o bien la inducción de senescencia en las células vecinas. En nuestro caso, las neuronas co-cultivadas con astrocitos SIPS o viejos no se volvieron senescentes.

Como se mencionó antes, nuestro grupo de trabajo ha caracterizado los componentes del SASP de astrocitos senescentes y dentro de los factores del SASP que se incrementan se encuentra la IL-1 α , la cual está relacionada con procesos de inflamación ya que al unirse a su receptor IL-1R1 el cual se dimeriza con IL-1RAP, activa la vía de las MAPKs (proteínas activadas por mitógenos) que culmina en la translocación del factor de transcripción NF κ B para promover la expresión de múltiples genes asociados con inflamación, entre ellos el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), IL-6, IL-8 e IL-1 β . Se ha descrito que TNF α induce disfunción mitocondrial en neuronas mediante la activación del receptor TNF-R1 el cual activa a la caspasa 8 y conlleva a la liberación de citocromo c (Doll et al, 2015). Se sabe que para que se promueva la liberación de citocromo c, la pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial se altera y con ello se pierde el potencial de membrana. Es importante mencionar que se han realizado estudios donde se evalúa si la IL-1 α tiene efectos neurotóxicos o neuroprotectores y se ha debatido en gran medida el tipo de modelo utilizado, ya que estudios *in vitro* no correlacionan con los estudios *in vivo*. Dentro de los estudios *in vitro* los resultados varían dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición utilizados. Gran parte de los estudios sugieren que la IL-1 α



tiene un efecto neurotóxico (Allan et al, 2005). En nuestro modelo, observamos que hay una disminución de la señal emitida por los J-agregados al estar en co-cultivo con los astrocitos SIPS y viejos, lo que nos indica que la secreción de los astrocitos senescentes esta afectando el potencial de membrana mitocondrial de las neuronas. Al estar afectado el potencial de membrana, múltiples procesos regulados por la mitocondria como la producción de ATP y la regulación del Ca^{2+} afectan la funcionalidad de las neuronas.

Para que los procesos de sinapsis se lleven a cabo de una manera eficiente, es necesario un buen funcionamiento mitocondrial, ya que además de proporcionar la energía necesaria para este proceso, participan regulando la concentración del calcio en las terminales sinápticas, la movilización de vesículas además de la liberación y recaptura de neurotransmisores. Por lo que alteraciones en las mitocondrias, pueden estar afectando los procesos de sinapsis (Cai y Tammineni, 2017). La sinapsis neuronal es un proceso fundamental para el buen funcionamiento del sistema nervioso, por lo que las alteraciones de este proceso tienen impacto en el comportamiento, haciendo notar la disminución de procesos cognitivos. Durante el envejecimiento estos procesos cognitivos disminuyen, haciendo que los adultos mayores se vuelvan propensos al desarrollo de diversos tipos de demencia. El proceso de sinapsis puede ser de tipo excitador ó inhibidor, ambos presentes para mantener una buena comunicación neuronal. Se ha reportado que en monos Rhesus los tipos de sinapsis inhibidores que se dan por el tipo de comunicación axosomática permanecen durante el envejecimiento y las sinapsis excitadoras dadas por la



comunicación axodendrítica o axoaxónica disminuyen, por lo que al haber un predominio de sinapsis axosomática, los organismos presentan un deterioro cognitivo (Soghomonian et al, 2010). Es interesante notar que en nuestros cultivos neuronales la señal de Syt 1 se presenta localizada mayormente en la región somática y poco en las proyecciones, además esta señal se mantiene cuando las neuronas se encuentran en co-cultivo con los astrocitos senescentes. Es necesario realizar repeticiones sobre estos experimentos, ya que no logramos obtener muestras de neuronas en co-cultivo con astrocitos de rata vieja. Es interesante mencionar que los estudios de sinapsis activas en cultivos neuronales que están presentes con astrocitos nos han dado pauta a seguir estudiando diversos procesos que se asocian con el envejecimiento.

Cabe mencionar que las ventajas proporcionadas por nuestros modelos de co-cultivo son, en primer lugar la concentración de citocinas a la que están expuestas las neuronas, ya que esa concentración es la que secretan los mismos astrocitos, lo cual modela un proceso de inflamación de bajo grado observado en el envejecimiento; segundo, las células están en comunicación constante, por lo que la secreción del SASP que se sabe que varía a lo largo del tiempo, nos permite tener un mejor enfoque a diferencia de únicamente agregar el medio condicionado, el cual tendrá un efecto a corto plazo; tercero los efectos observados se atribuyen al fenotipo de los astrocitos pues se comparan los efectos de los astrocitos control, SIPS y viejos.



8. CONCLUSIÓN

Diversos grupos de trabajo han reportado que en el tejido nervioso existe la presencia de astrocitos con características asociadas con el fenotipo senescente y además han caracterizado la senescencia de astrocitos en cultivo celular. En nuestro grupo de trabajo hemos logrado establecer cultivos de astrocitos senescentes y estudiado el fenotipo secretor que se caracteriza por el incremento de diversas citocinas. Basados en esto, decidimos estudiar el efecto de estos astrocitos senescentes sobre las neuronas, pues son las células encargadas de realizar las funciones especializadas del sistema nervioso. Cuando las neuronas presentan alteraciones, el sistema nervioso pierde capacidades tan importantes como lo es el comportamiento que abarca procesos de memoria y aprendizaje.

Se sabe que en el envejecimiento se presentan cambios como la neuroinflamación que afecta las funciones neuronales. Este trabajo propone que los astrocitos senescentes al estar secretando el SASP son un factor que compromete a las células neuronales, pues hemos observado que las neuronas presentan cambios en el potencial de membrana de sus mitocondrias. Los cambios en la funcionalidad de las mitocondrias, han sido descritos como un marcador de envejecimiento y de enfermedades neurodegenerativas, pues al no estar funcionando este organelo, se comprometen diversos procesos que pueden dar lugar a la muerte celular.



El modelo de co-cultivo es un modelo que permite que las neuronas estén expuestas de manera constante al SASP secretado por los astrocitos senescentes por lo que es un buen acercamiento que permite conocer el efecto de los astrocitos sobre las neuronas y su relación entre estos dos tipos celulares que se encuentran íntimamente relacionados en el tejido nervioso.

9. PERSPECTIVAS

El modelo de co-cultivo de neuronas y astrocitos es una herramienta que nos permite explorar acerca de la participación del fenotipo senescente sobre diversos procesos neuronales. Cabe mencionar que una de las principales perspectivas es realizar repeticiones de los experimentos para poder realizar los análisis estadísticos y poder hacer una mejor interpretación. Además hemos encontrado que algunas técnicas presentaron limitaciones, por lo que se buscarán alternativas que permitan realizar un análisis más sensible además con los resultados observados hasta ahora, se ha planteado la exploración de más procesos que pueden estar involucrados como los relacionados con dinámica mitocondrial.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Allan SM. Tyrrell PJ. Rothwell NJ. 2005. Interleukin-1 and neuronal injury. Nature Reviews. Immunology 5:629-640



2. Angel JL. Vega W. López-Ortega M. 2017. Aging in Mexico: Population trends and emerging issues. *Gerontologist*, 52:2(152-162)
3. Baker DJ. Wijshake T. Tchkonian T. LeBrasseur NK. Childs BG. van de Sluis B. Kirkland JL. Van Deursen JM. 2011. Clearance of p16^{Ink4a}-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479:232-237
4. Baker LD. Barsness SM. Borson S. Merriam GR. Friedman SD. Craft S. Vitiello MV. 2012. Effects of growth hormone-releasing hormone on cognitive function in adults with mild cognitive impairment and healthy older adults. *Archives of Neurology* 69(11):1420-1429
5. Barajas-Gómez BA. Rosas-Carrasco O. Morales-Rosales SL. Pedraza-Vázquez G. González-Puertos VY. Juárez-Cedillo T. García-Álvarez JA. López-Díazguerrero NE. Damián-Matsumura P. Königsberg M. Luna-López A. 2017. Relationship of inflammatory profile of elderly patients serum and senescence-associated secretory phenotype with human breast cancer cells proliferation: Role of IL6/IL8 ratio. *Cytokine* 91:13-29
6. Bath R. Crowe P. Bitto A. Mho M. Katsetos C. Garcia F. Johnson F. Trojanowski J. Sell C. Torres C., 2012. Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *Plos One*, 7 (9):1-10
7. Bradl M. y Lassmann H. 2010. Oligodendrocytes:biology and pathology. *Acta Neuropathologica* 119:37-53
8. Brewer GJ. Torricelli JR. Evege EK. Price PJ. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in b27-supplemented neurobasal, a new serum-free medium combination. *Journal of Neuroscience Research* 35:567-576



9. Cai Q. y Tammineni P. 2017. Mitochondrial aspects of synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 57(4):1087-1103
10. Cannon J. y Greenamyre T. 2011. The role of environmental exposures in neurodegeneration and neurodegenerative diseases. *Toxicological Sciences* 124(2):225-250
11. Chinta SJ. Woods G. Rane A. Demaria M. Campisi J. Andersen JK. 2015. Cellular senescence and the aging brain. *Experimental Gerontology* 68:3-7
12. Cho K. y Choi GE. 2017. Microglia: Physiological functions revealed through morphological profiles. *Folia Biologica* 63:85-90
13. Chohan MO. Y Iqbal K. 2006. From tau to toxicity: Emerging roles of NMDA receptor in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 10:81-87
14. Coppe JP. Patil C. Rodier F. Sun Y. Muñoz D. Goldstein J. Nelson PS. Desprez PY Campisi J. 2008. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-non autonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biology* 6(12):2853–2868
15. De Vos K. Grierson A. Ackerley S. Miller C. 2008. Role of axonal neurodegenerative diseases. *Annual Review of Neuroscience*. 31:151-173
16. Dierick JF. Eliaers F. Remacle J. Raes M. Fey SJ. Larsen PM. Toussaint O. 2002. Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. *Biochemical Pharmacology* 64:1011-1017
17. Dimri GP. Lee X. Basile G. Acosta M. Scott G. Roskelley C. Medrano EE. Linskens M Rubelj I. Pereira-Smith O. Peacocke M. Campisi J. 1995. A



- biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 9363–9367
18. Dixon AR. y Philbert MA. 2015. Morfometric assesment of toxican induced neuronal degeneration in full and restricted contact co-cultures of embryonic cortical rat neurons and astrocytes. *Toxicology in vitro* 29(3): 564-574
19. Doll SN. Rellick SL. Barr TL. Ren X. Simpkins JW. 2015. Rapid mitochondrial dysfunction mediates TNF-alpha-induced neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry* 132:443-451
20. Franceschi C. y Campisi J. 2014. Chronic inmflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *The Journals of Gerontology, Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 69:(S1):S4-S9
21. Hayflick L. y Moorhead PS. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* 25:585-621
22. Hill E. Nagel R. Parri R. Coleman M. 2016. Stem cell-derived astrocytes: are they physiologically credible?. *The Journal of Physiology* 594(22):6595-6606
23. Hou J. Kim S. Sung C. Choi C. 2017. Ginsenoside Rg3 prevents oxidative stress-induced astrocytic senescence and ameliorates senescence paracrine effects on glioblastoma. *Molecules* 22(9):1516-1530



24. Jaerve A. y Müller H. 2012. Chemokines in CNS injury and repair. *Cell and Tissue Research* 349(1):229-248
25. Jeon OH. Kin C. Laberge RM. Demaria M. Rathod S. Vasserot AP. Chung JW. Kin DH. Poon Y. David N. Baker DJ. Van Deursen JM. Campisi J. Elisseeff JH. 2017. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nature Medicine* 23 (6):775-781
26. Keogh MJ. y Chinnery PF. 2015. Mitochondrial DNA mutations in neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta* 1847:1401-1411
27. Krizhanovsky O. y Ovadya Y. 2014. Senescence cells: SASPected drivers of age-related pathologies. *Biogerontology* 15(6):627-642
28. Laberge RM. Zhou L. Sarantos MR. Rodier F. Freund A. Keizer PLJ. Liu S. Demaria M. Cong Y. Kapahi P. Desprez P. Hughes RE. Campisi J. 2012. Glucocorticoids suppress selected components of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging Cell* 11(4):569-578
29. Lausted C. Lee I. Zhou Y. Qi S. Sung J. Price N. Hoop L. Wang K. 2014. Systems approach to neurodegenerative disease biomarker discovery. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 54:457-481
30. Lin D. Wu J. Hostein D. Upadhyay G. Rourk W. Lechleiter J. 2007. Ca²⁺ signaling, mitochondria and sensitivity to oxidative stress in aging astrocytes. *Neurobiology of Aging* 28(1):99-111



31. Lionaki E. Markaki M. Palikaras K. Tavernarakis N. 2015. Mitochondria, autophagy and age-associated neurodegenerative diseases: new insights into a complex interplay. *Biochemical et Biophysica Acta* 1847:1412-1423
32. Lok K. Zhao H. Zhang C. He N. Shen H. Wang Z. Zhao W. Yin M. 2013. Effects of accelerated senescence on learning and memory, locomotion, and anxiety behavior in APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 335(1-2):145-154
33. López-Díazguerrero N. Martínez-Garduño CM. Königsberg M. 2005. La senescencia replicativa como una respuesta celular al estrés. *Revista de Educación Bioquímica* 24 (2):47-53
34. López-Otín C. Blasco MA. Partridge L. Serrano M. Kroemer G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell* 153:1194-1217
35. Maciel-Barón LA. Morales-Rosales SL. Aquino-Cruz AA. Triana-Martínez F. Galván-Arzate S. Luna-López A. González-Puertos VY. López-Díazguerrero NE. Torres C. Königsberg M. 2016. Senescence associated secretory phenotype profile from primary lung mice fibroblasts depends on the senescence induction stimuli. *Age* 38(1):26 DOI 10.1007/s11357-016-9886-1
36. Maciel-Barón LA. Morales-Rosales SL. Silva-Palacios A. Rodríguez-Barrera R. Luna-López A. Torres C. Königsberg M. The SASP profile of senescent astrocytes differs from the classical pattern since it contains IL-1 α but not IL-6 as the main regulatory component, *en revision*.



37. McCarthy K. y de Vellis J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *The Journal of Cell Biology* 85(3):890-902
38. Mosher KI. Y Wyss-Coray T. 2014. Microglial Dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology* 88(4):594-604
39. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application of proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65(1-2):55-63
40. Muñoz-Espín D. y Serrano M. 2014. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15(7):482-496
41. Olichon A. Baricault L. Gas N. Guillou E. Valette A. Belenguer P. Lenaers G. 2003. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(10):7743–7746
42. Rodier F. y Campisi J. 2011. Four faces of cellular senescence. *The Journal of Cell Biology* 192 (4):547-556
43. Rodríguez-Arellano JJ. Parpura V. Zorec R. Verkhratsky A. 2016. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* 323:170-182
44. Salminen A. Ojala J. Kaarniranta K. Haapasalo A. Hilyunen M. 2011. Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. *The European Journal of Neuroscience* 34(1):3-11



45. Sanderson TH. Raghunayakula S. Kumar R. 2015. Neuronal hypoxia disrupts mitochondrial fusion. *Neuroscience* 301:71-78.
46. Savig A. y Krizhanovsky O. 2013. Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program. *Biogerontology* 14 (6):617-628
47. Sofroniew MV. y Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica* 119:7-35
48. Soghomonian JJ. Sethares C. Peters A. 2010. Effects of age on axon terminals forming axosomatic and axodendritic inhibitory synapses in prefrontal cortex. *Neuroscience* 168(1):74-81
49. Spittau B. 2017. Aging microglia-phenotypes, functions and implications for age-related neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience* 9:194
50. Tan F. Hutchison E. Eitan E. Mattson M. 2014. Are there roles for brain cell senescence in aging and neurodegenerative disorders? *Biogerontology* 15(6):643-660
51. Tchkonina T. Zhu Y. Van Deursen J. Campisi J. Kirkland J. 2013. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *The Journal of Clinical Investigation* 123(3):966-972
52. Torres CA. y Perez VI. 2008. Proteasome modulates mitochondrial function during cellular senescence. *Free Radical Biology & Medicine* 1;44(3):403-414



53. Toussaint O. Medrano E.E. von Zglinicki T. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Experimental Gerontology* 35:927-945
54. Tovar-y-Romo LB. Penagos-Puig A. Ramírez-Jarquín JO. 2016. Endogenous recovery after brain damage: molecular mechanisms that balance neuronal life/death fate. *Journal of the Neurological Sciences* 136(1):13-27
55. Van Deursen JM. 2014. The role of senescent cells in ageing. *Nature* 509(7501):439-446
56. Verkhatsky A. Zorec R. Rodríguez J. Parpura V. 2016. Astroglia dynamics in ageing and Alzheimer disease. *Current Opinion in Pharmacology* 26:74-79
57. Villeda SA. Plambeck KE. Middeldorp J. Castellano JM. Mocher KI. Luo J. Smith LK. Bieri G. Lin K. Berdnik D. Wabi R. Udeochu J. Wheatley EG. Zou B. Simmons DA. Xie XS. Longo FM. Wyss-Coray T. 2014. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nature Medicine* 20(6):659-663
58. Wang X. Su B. Lee H. Li X. Perry G. Smith MA. 2010 impaired balance of mitochondria fission and fusion in Alzheimer disease. *The Journal of Neuroscience*. 29(28):9090-9103
59. WHO. Marzo2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en/>
60. Wyss-Coray T. 2016. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature* 539:180-186



61. Zhang G. Li J. Purkayastha S. Tang Y. Zhang H. Yin Y. Li B. Liu G. Cai D.
2013. Hypothalamic programming of systemic ageing involving ikk-b, NFkB
and GnRH. Nature 497(7448):211-216



ANEXO 1

* Solución KRB 10X, contiene NaCl, KCl, KH_2PO_4 , NaHCO_3 , glucosa y rojo fenol.

Esta solución puede ser almacenada en refrigeración a 4 °C para futuros cultivos.

* Solución 1, se preparó usando 100ml de KRB 1x al cual se le añadió 0.3 g de albúmina sérica bovina y 0.8 ml de Mg al 3.8%

* Solución 2, se tomaron 10 ml de la solución 1 y se agregó 7 μl de tripsina hasta el momento en que realizamos el cultivo para evitar que pierda actividad

* Solución 3, se tomaron 10 ml de la solución 1, 5.2 mg de inhibidor de tripsina y 100 μl de Mg al 3.8%

* Solución 4, se tomaron 10.5 ml de la solución 1, y 2 ml de la solución 3

* Solución 5 se tomaron 12.5 ml de la solución 1, 15 μl de Ca^{2+} al 1.2% y 100 μl de Mg al 3.8%

Es importante tener en cuenta que las soluciones 1 a la 5 pueden guardarse en refrigeración pero no deben almacenarse más de una semana. Las soluciones se filtraron inmediatamente antes de usarse (filtro 0.22 μm diámetro).



Miembros del jurado

Presidente: Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Norma E López Díaz G.

Secretaria: Dra. María de Lourdes Massieu Trigo

Instituto de Fisiología Celular

Universidad Nacional Autónoma de México

María de Lourdes Massieu Trigo

Vocal: Dra. Beatriz Gómez González

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Beatriz Gómez González

Vocal: Dra. Leticia Bucio Ortiz

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Leticia Bucio Ortiz





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00180

Matrícula: 2153803824

EFFECTO DE LOS ASTROCITOS
SENESCENTES SOBRE LA
FUNCIONALIDAD DE LAS
NEURONAS CORTICALES EN
COCULTIVO PRIMARIO DE RATA
WISTAR

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:30 horas del día 23 del mes de noviembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO
- DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ
- DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ
- DRA. MARIA DE LOURDES MASSIEU TRIGO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

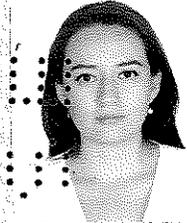
DE: SANDRA LIZBETH MORALES ROSALES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



SANDRA LIZBETH MORALES ROSALES
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

SECRETARIA ACADÉMICA DE LA DIVISIÓN DE
CBS

Margarita E. Gallegos
DRA. MARGARITA ELIZABETH GALLEGOS
MARTINEZ

PRESIDENTA

Norma Edith Dn G
DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO

VOCAL

Beatriz Gomez Gonzalez
DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ

VOCAL

Leticia Bucio Ortiz
DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ

SECRETARIA

Maria de Lourdes Massieu Trigo
DRA. MARIA DE LOURDES MASSIEU TRIGO