Tesina de grado Facultad de Ciencias Universidad de la República

Caracterización de microglias senescentes en modelos celulares y animales de neurodegeneración

Lucas Tarrago Licenciatura en Bioquímica

Orientador: Emiliano Trias, Ph.D Co-orientadora: Mariángeles Kovacs, B.Sc. Instituto Pasteur de Montevideo

| 1. Introducción. | 5 |
|---|-------------|
| 1.1 Envejecimiento. | 5 |
| 1.2 Senescencia celular. | 8 |
| 1.3 El envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas. | 12 |
| 1.4 Senescencia celular en la neurodegeneración. | 13 |
| 1.5 La Esclerosis Lateral Amiotrófica. | 14 |
| 1.6 Senescencia celular en la Esclerosis Lateral Amiotrófica. | 17 |
| 2. Objetivos. | 18 |
| 2.1 Objetivo general. | 18 |
| 2.2 Objetivos Específicos. | 18 |
| 3. Estrategia experimental. | 19 |
| 3.1 Línea celular BV2. | 19 |
| 3.2 Temozolomide (TMZ) como inductor de la senescencia en BV2. | 20 |
| 3.3 Estudio de la toxicidad y viabilidad celular en células tratadas con TMZ. | 20 |
| 3.4 Estudio de la actividad β -galactosidasa en BV2 tratadas con TMZ. | 21 |
| 3.5 Caracterización del fenotipo senescente en BV2 tratadas con TMZ. | 21 |
| 3.6 El ratón hSOD1G93A como modelo de ELA. | 21 |
| 3.7 Caracterización del fenotipo senescente microglial en la médula espinal de ratón. | 22 |
| 4. Materiales y métodos. | 22 |
| 4.1 Células BV2. | 22 |
| 4.2 Tratamiento con TMZ. | 23 |
| 4.3 Evaluación de la actividad β -galactosidasa y viabilidad celular. | 23 |
| 4.3.1 Citometría de flujo. | 23 |
| 4.3.2 Citoquímica. | 27 |
| 4.4 Inmunocitoquímica células BV2. | 27 |
| 4.5 Animales. | 29 |
| 4.6 Inmunohistoquímica de médula espinal. | 29 |
| 4.7 Microscopía confocal. | 31 |
| 4.8 Análisis cuantitativo de células microgliales en la médula espinal. | 32 |
| 4.9 Análisis estadístico. | 32 |
| 4.10 Consideraciones éticas. | 32 |
| 5. Resultados | 33 |
| 5.1 El tratamiento con TMZ es capaz de inducir la senescencia en un modelo de células BV | /2. 33 |
| 5.2 La microglía senescente en cultivo presenta alteraciones en la morfología nuclear característica en la senescencia celular. | 36 |
| 5.3 Las células microglíales senescentes en la médula espinal de ratones hSOD1G93A pres una morfología nuclear alterada | entan 39 |
| 5.4 Las alteraciones nucleares en la microglía senescente en los ratones hSOD1G93A está | 57 |
| acompañada de la baja expresión nuclear de HMGB1. | 41 |
| 6. Discusión. | 43 |
| | |

| 43 |
|----|
| 45 |
| 49 |
| 49 |
| 52 |
| |

Resumen:

El envejecimiento es un proceso biológico donde ocurre una disminución progresiva de las capacidades fisiológicas y una habilidad reducida para responder al estrés ambiental, conduciendo a una mayor susceptibilidad y vulnerabilidad a desarrollar enfermedades. Desde hace una década se ha comenzado a profundizar en diferentes sellos característicos del envejecimiento a nivel celular y molecular, siendo uno de ellos la senescencia celular. La senescencia celular es un proceso que se caracteriza por el arresto proliferativo, y alteraciones en la morfología y las vías de señalización fisiológicas normales. Las células senescentes se caracterizan por la expresión de algunos marcadores típicos, como p16, p21, p53, pérdida de lamina B1 y aumento en la actividad β-galactosidasa. Numerosos trabajos han identificado y caracterizado la presencia de fenotipos celulares senescentes en el contexto del envejecimiento, así como una correlación positiva entre la emergencia de células gliales senescentes y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como la Enfermedad de Alzheimer, la Enfermedad de Parkinson y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). En este trabajo nos propusimos como objetivos, desarrollar y caracterizar un modelo celular de microglía senescente, inducida por exposición a un agente alquilante del ADN, Temozolomide (TMZ), y en segundo lugar, profundizar en la caracterización del fenotipo de la microglía senescente que emerge durante la progresión de la ELA en un modelo murino de la enfermedad. En los experimentos en cultivo con una línea celular de microglía, logramos obtener más de un 90% de microglías que presentan aumento de la actividad β-galactosidasa, arresto de la proliferación y alteraciones fenotípicas y de la estructura nuclear características de las células senescentes. Por otra parte, en los estudios realizados en el modelo murino de ELA, observamos la presencia de microglías senescentes que expresan p16 nuclear, e identificamos lo que podría ser un nuevo marcador de senescencia en este modelo: la pérdida de HMGB1. Además, observamos un marcado cambio en la estructura de los núcleos p16+ y HMGB1- en la microglía. En conclusión, en este trabajo pusimos a punto un nuevo modelo de microglía senescente en cultivo, y aportamos nuevas observaciones sobre el fenotipo de la microglía senescente en un modelo de neurodegeneración. Este conocimiento aporta nueva evidencia sobre las características de las células gliales senescentes, y podría contribuir a entender sus efectos patogénicos en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas. Comprender las características y roles de las células gliales senescentes es relevante actualmente, ya que podrían constituir un blanco celular para el desarrollo de fármacos que tengan como objetivo modular y eliminar estos fenotipos celulares y modificar la progresión de estas enfermedades.

1. Introducción.

1.1 Envejecimiento.

El envejecimiento de un organismo vivo es un proceso considerado normal que aparece como resultado de la acumulación de daños celulares y moleculares con el paso del tiempo, lo que lleva a un descenso gradual de las capacidades físicas y neurológicas, y a un mayor riesgo de enfermedad y de muerte (1, 2). En el último siglo, el avance de la ciencia y la medicina vino acompañado de un aumento significativo de la expectativa de vida de los seres humanos, lo que se asocia a una mayor prevalencia de enfermedades cuyo factor de riesgo es la edad. Por tanto, existe un interés aumentado por parte de la ciencia moderna en entender los mecanismos moleculares y celulares que explican el envejecimiento, de forma de poder intervenir en ellos para prevenir y tratar enfermedades asociadas (3, 4).

Las teorías modernas sobre el envejecimiento se apoyan en el concepto de acumulación de daño moleculares que no son reparados (por ejemplo, el daño oxidativo del ADN) y a procesos internos programados en cada especie por vía de cambios epigenéticos del ADN (5). En las últimas décadas se han descrito modelos animales para estudiar los procesos moleculares y celulares asociados al envejecimiento (6). En el año 1983 se logró desarrollar las primeras cepas aisladas del gusano C.Elegans para el estudio de la longevidad, via su regulación genética y mediado por factores ambientales (7, 8). Las investigaciones de las últimas décadas han mostrado los determinantes biológicos del envejecimiento y la longevidad en otras especies (9). Las principales determinantes del envejecimiento aceptadas actualmente son la inestabilidad genómica, acortamiento de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de la proteostasis, comunicación intercelular alterada, desregulación de las vías metabólicas controladas por

nutrientes, disfunción mitocondrial, agotamiento de las células madres y la acumulación de células senescentes (9) (Figura 1).



Figura 1. Los sellos del envejecimiento. El esquema enumera las diferentes alteraciones funcionales que se observan durante el envejecimiento normal. Si bien estas alteraciones aparecen como compartimientos separados, existen múltiples interacciones y causalidades entre las vías afectadas y la instalación de círculos viciosos o auto tóxicos que aceleran el proceso de envejecimiento. Por ejemplo, el aumento de la inflamación sistémica característica del envejecimiento puede ser originado por la acumulación de células senescentes que adoptan un fenotipo secretor, pero también por la disfunción mitocondrial y los defectos de la proteostasis. (Imagen adaptada de Lopez-Otín y colaboradores (9).)

Queremos mencionar con mayor detalle las bases de la teoría por la cual el envejecimiento se asocia a la acumulación de daño del ADN. A su vez, el daño genético vincula el envejecimiento al cáncer, a través de las alteraciones estructurales aberrantes

del ADN que provoca mutaciones oncogénicas, así como cambios epigenéticos (5, 10, 11).

Se cree que, en el envejecimiento normal, el daño del ADN hace que las células dejen de dividirse o mueran por apoptosis, lo que lleva a una detención de los mecanismos regenerativos que ocurren en los individuos jóvenes(10). Como mencionamos más abajo, el daño del ADN por agentes químicos alquilantes puede generar envejecimiento celular y llevar a un fenotipo conocido como senescencia celular, lo que permite estudiar algunos mecanismos del envejecimiento. (12)

En células epiteliales y del tejido conectivo sujetas a replicaciones múltiples durante la vida, los defectos que pueden producirse en la replicación del ADN se acompañan por el acortamiento de los telómeros, que ocurre en cada división celular (13). Cuando los telómeros alcanzan un acortamiento crítico, las células dejan de dividirse, envejecen o mueren, dando lugar a la teoría del "reloj molecular" propuesto por Hayflick (14). Se ha comprobado que esta teoría del envejecimiento sólo se aplica a determinados modelos de envejecimiento celular, pero no se aplica masivamente al envejecimiento de individuos(14).

Al mismo tiempo diversos trabajos relacionados al envejecimiento muestran como éste es el mayor factor de riesgo de muchas enfermedades crónicas como la diabetes, el síndrome de fragilidad, aterosclerosis, osteoartritis, ceguera y la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas (15, 16). En particular se ha encontrado que durante el envejecimiento, el sistema nervioso central muestra cambios significativos, incluyendo la atrofia cerebral y de la médula espinal, una disminución de la materia gris, acumulación de placas β -amiloides y ovillos neurofibrilares, y un aumento en el número de células senescentes (17).

1.2 Senescencia celular.



Figura 2. Adquisición de un fenotipo senescente celular. Un número de diversas señales de estrés intrínsecos y extrínsecos, pueden estimular la conversión de una célula normal a una célula senescente con alteraciones morfológicas, aumento de la heterocromatina, pérdida de la expresión de proteínas como lámina B1 y HMGB1 y aumento de la expresión de factores secretores inflamatorios (Imagen adaptada de Baker et al (18))

La senescencia celular representa un estado de detención permanente del crecimiento celular. Puede ocurrir en cualquier etapa de la vida desde el embrión hasta la edad adulta, aunque la acumulación de células senescentes está asociada con el proceso de envejecimiento (19, 20). La senescencia celular es un proceso altamente regulado y tiene efectos tanto beneficiosos como perjudiciales, implicados en el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas, la supresión de tumores y el envejecimiento (21, 22). Las células senescentes presentan características fundamentales que las diferencian

del resto de la células somáticas: i) Pérdida de la capacidad de división celular y regenerativa, ii) resistencia a la apoptosis y alteración de las funciones metabólicas, y iii) expresión y secreción de una variedad de moléculas activas pro-inflamatorias y angiogénicas, productos de células senescentes con fenotipo secretor (Figura 2) (18).

En las últimas décadas se han descubierto y descrito numerosas técnicas para el estudio, y marcadores específicos para la identificación de las poblaciones de células senescentes (23-25). Algunos de estos incluyen una mayor actividad enzimática de la β -galactosidasa (β -gal) asociada a la senescencia , revelada por la tinción de x-gal en reacción histoquímica; una mayor expresión de los inhibidores de la quinasa dependientes de ciclina y represores del ciclo celular representado por las proteínas de localización nuclear p16, p53 y p21; y aumento de los marcadores citológicos de daño nuclear y del ADN (26-30).

Morfológicamente, podemos decir a grandes rasgos que las células senescentes sufren una hipertrofia celular (31), lo que está acompañado de una disminución significativa de la capacidad proliferativa, ambas características que se pueden observar muy bien por citometría de flujo (32). Por inmunocitoquímica, se puede observar el aumento de la expresión de las proteínas represoras del ciclo celular y de la actividad de β -gal, así como los cambios morfológicos en los núcleos celulares acompañados de una disminución de la proteína lámina B1(33-35). Sin embargo, sigue siendo un desafío identificar células senescentes en los tejidos y órganos *in vivo*, debido a la falta de especificidad y baja sensibilidad de los marcadores de senescencia utilizados actualmente, por lo que se hace necesario utilizar múltiples marcadores para revelar células senescentes.

Un gran número de estudios en cultivos celulares han permitido comprender los mecanismos moleculares que llevan al arresto celular y el mantenimiento de la

senescencia (24, 34, 36-39). Como se observa en la figura 3, diferentes inductores pueden afectar al ADN, ya sea mediante la activación de vías relacionadas al daño del ADN, o de la activación del locus Ink4/AARF, dando lugar a la regulación de proteínas claves del ciclo celular, tales como p53 y p16 (40). Por otra parte, las células senescentes, además de tener como característica el arresto del ciclo celular, adquieren características morfológicas que las distinguen de las células normales (31). Las células eucariotas tienen una arquitectura nuclear convencional, donde la eucromatina se localiza predominantemente en el núcleo interno y la heterocromatina rodeando la parte interna de la membrana nuclear y los nucléolos (31). Este arreglo es mantenido por interacciones que la heterocromatina, tiene con proteínas específicas, como el receptor de la lamina B (LBR), que las anclan a proteínas de la membrana nuclear, como la lámina B1(41).



Figura 3. Vías moleculares que controlan el arresto celular durante la senescencia. Se observa cómo diferentes factores intrínsecos o extrínsecos como los oncogenes, el estrés replicativo, las especies reactivas del oxígeno, disfunción mitocondrial, irradiación o drogas quimioterapéuticas, pueden dar lugar ya sea a un daño en el ADN que active la vía de daño al ADN, o la activación del locus INK4/ARF, dando lugar a una cascada de señalización que culmina en la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular tales como p53 y p16 que tendrán un efecto sobre la transición de la fase G1 a la S. (Imagen adaptada de McHugh y Gil (40))

Trabajos previos realizados en animales con deficiencias en la lámina A, han demostrado profundas anormalidades estructurales del núcleo que imitan un fenotipo de envejecimiento acelerado, encontrándose además una relación entre estos defectos y la expresión de marcadores de senescencia, tales como p53 y otros mediadores inflamatorios como interleucina-6, interleucina-8, metalopeptidasa-1 (IL-6, IL-8, MMP 1) (33, 41-47). Por otra parte los trabajos de Lukasova y colaboradores muestran como la lámina B1 y LBR juegan un rol crítico en las funciones genómicas y en la organización de la cromatina mostrando cómo durante los procesos de senescencia celular, ocurre una disminución en la expresión de la lámina B1 y que ésta es consecuencia de la disminución de LBR (48, 49). Por otra parte, Freund muestra cómo la disminución de LBR durante la senescencia celular induce cambios en la expresión de diversos genes inflamatorios relacionados a la senescencia (IL-6, IL-8, MMP-1) y además demuestra cómo la activación de las vías clásicas de senescencia como p53 o fosfo retinoblastoma (pRB) son suficientes para que ocurra una pérdida de lámina B(33).Como consecuencia de esto se ha observado en otro trabajo en un porcentaje significativo de células senescentes la presencia de una estructura y morfología de los núcleos alterada (31). En células no senescentes los núcleos presentan una circularidad u ovalidad característica, la desestabilización y cambio en la forma nuclear se vé tras la pérdida de las proteínas de la lámina nuclear tales como la lámina B en donde: el tamaño nuclear aumenta; se generan ampollas nucleares e invaginaciones en la estructura nuclear, a la vez que ocurre la aparición de células multinucleadas (31).

Por otra parte, *High mobility group box 1* (HMGB1es una proteína cuya expresión nuclear se ve alterada durante la senescencia celular, pero además puede ser secretada por diferentes tipos celulares, y tiene una actividad dual dependiendo de si su acción es individual (promoviendo la inflamación, y regeneración del tejido) o actuando en conjunto con otros mediadores proinflamatorios, (promoviendo la inflamación y la activación de la inmunidad innata (50).). Los trabajos de Park y colaboradores han demostrado que niveles crecientes de HMGB1 se correlacionan con un aumento en la activación de los receptores RAGE y TLRs (51), reconocidos receptores proinflamatorios (52). Por otra parte, Kim y colaboradores han demostrado cómo la proteína HMGB1 nuclear regula la transcripción de diferentes genes, incluyendo los proinflamatorios y tienen un efecto deletéreo en células nerviosas en un modelo de neurodegeneración(53). Los trabajos de Davalos y colaboradores estudiaron además los efectos de HMGB1 y su capacidad de inducir senescencia en cultivo celular, demostrando que la sobreexpresión o depleción de esta proteína es capaz de inducir senescencia mediante la activación de la vía p53. Además demuestran que es necesario que haya un aumento en la expresión de HMGB1 para la regulación de la expresión de IL-6 y MMP3 (dos factores SASP), y que su localización no sea nuclear. (54)

1.3 El envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas.

El envejecimiento constituye el principal factor de riesgo para desarrollar enfermedades del sistema nervioso, y en particular, enfermedades neurodegenerativas (55). El aumento actual de la esperanza de vida resulta en un incremento en la incidencia y prevalencia de estas enfermedades, que son un grupo de patologías asociadas a la edad con una prevalencia estimada entre 1,5 y 2,5 % de la población general, pudiendo elevarse al 50% en personas con más de 85 años (55). Constituyen un grupo de varias decenas de enfermedades caracterizadas por la degeneración y muerte de poblaciones

neuronales específicas, con el consiguiente deterioro funcional de las partes afectadas, lo que resulta en enfermedades bien conocidas como Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson, la ELA o la enfermedad de Huntington, entre otras.

Al igual que el envejecimiento, las enfermedades neurodegenerativas tienen como característica su cronicidad y progresión inexorable. A pesar de décadas de investigación biomédica no existen tratamientos efectivos para tratarlas, e incluso para enlentecer de manera significativa su progresión. Durante años, el foco de estudio estuvo casi exclusivamente en las poblaciones neuronales vulnerables, sin considerar su entorno celular, en particular las células gliales. Actualmente, se considera que el componente inflamatorio de las patologías neurodegenerativas es un concepto clave en neurociencias que podría dar lugar al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas inmunomoduladoras (56).

1.4 Senescencia celular en la neurodegeneración.

En particular, la senescencia celular en el sistema nervioso central (SNC) ha comenzado a ser estudiada más recientemente, y por ello aún falta mucho para elucidar los distintos mecanismos subyacentes a la aparición de éstas células y sus potenciales efectos nocivos sobre el sistema nervioso. Sin embargo, el SNC no escapa a las características del envejecimiento celular, y la vejez es uno de los factores de riesgo principales de varias enfermedades neurodegenerativas (18, 56, 57).

En trabajos recientes sobre el envejecimiento celular del sistema nervioso, la senescencia se ha descrito en diferentes tipos celulares tales como astrocitos, microglias y neuronas (58-63). Los trabajos pioneros de senescencia en Alzheimer han observado la aparición de astrocitos senescentes, y han descrito la adquisición de un fenotipo transcriptómico diferencial en los mismos, que acompañan un proceso de senescencia adquirido tras inducción por estrés oxidativo (58, 59, 63). Además se han observado

presencia de astrocitos senescentes que presentan un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) característico en el cerebro envejecido (64). Por otra parte trabajos previos donde se realizan análisis morfológicos de la microglía durante el envejecimiento normal en ratones, han mostrado una reducción en la complejidad de sus prolongaciones, y área total de las mismas, así como también un aumento en los sitios de contacto con neuronas dopaminérgicas (60). Además se observan aumentos en la relación microglía/neuronas, y un aumento en el tamaño somal. Esto sugiere un intento por compensar las capacidades disminuidas de la microglía envejecida por falta de complejidad. El envejecimiento microglialtambién se ha observado en otras enfermedades degenerativas y psiquiátricas como el Alzheimer y la esquizofrenia (61). Finalmente, otro trabajo ha mostrado un aumento significativo del arresto proliferativo en células microgliales expuestas a condiciones inflamatorias (65).

1.5 La Esclerosis Lateral Amiotrófica.

La ELA fue descrita en 1869 por el neurólogo J.M. Charcot como un síndrome clínico de parálisis y atrofia muscular progresiva y la lesión de los fascículos axonales antero-laterales (esclerosis lateral) de la médula (66). Es una enfermedad neurodegenerativa paradigmática que afecta principalmente a las motoneuronas superiores e inferiores del SNC (figura 4). La enfermedad afecta principalmente a individuos de edad avanzada (aproximadamente 60 años). El 90% de los pacientes con ELA fallecen en un lapso de 3 a 5 años, como consecuencia de una parálisis generalizada y paro respiratorio. Para personas entre 60 y 69 años, la incidencia de ELA es de 15 casos cada 100.000, por lo que la misma se incrementa con el envejecimiento progresivo de la población (67). Los síntomas característicos de ELA son debilidad y atrofia muscular progresiva, seguido por parálisis progresiva, como consecuencia de la pérdida incesante de motoneuronas; fasciculaciones asociadas a la denervación muscular y exaltación de

los reflejos tendinosos, que reflejan la pérdida de control inhibitorio por la degeneración de la vía corticoespinal (67).



Figura 4. Neuronas motoras afectadas selectivamente en la Esclerosis Lateral Amiotrófica. La degeneración de las neuronas motoras en la corteza motora lleva a signos clínicamente aparentes de anormalidades de las neuronas motoras superiores: reflejos de los tendones hiperactivos, signos de Hoffmann, signos de Babinski, y clonus. La degeneración de las neuronas motoras del tronco y la médula espinal causan atrofia muscular, debilidad y fasciculación. (Imagen adaptada de Brown y colaboradores (67)).

En este trabajo de tesis hemos usado un modelo animal de ELA como una forma de estudiar la neurodegeneración y, en particular, profundizar en la caracterización de la emergencia de fenotipos senescentes en células gliales en el microambiente celular degenerativo que rodea a las neuronas más vulnerables en la médula espinal durante el transcurso de la ELA (68).

La mayor parte de los casos de ELA son esporádicos y no reconocen causas genéticas (67). Sin embargo, un 10-20% de los casos de ELA son familiares y están asociados a mutaciones en genes específicos (67). Entre las más estudiadas, diferentes mutaciones en los genes de la superóxido dismutasa 1 (SOD1), TDP-43, FUS o C9Orf7225. En 1994, Gurney y colaboradores marcaron un hito en el estudio de la ELA, generando un modelo de ratón que sobreexpresa una mutación puntual, G93A, de la SOD1 humana(68). Estos ratones desarrollan, luego de 120 días de vida, una neurodegeneración muy similar a la observada en los pacientes con ELA (68). Al igual que los pacientes, los animales muestran una degeneración y muerte progresiva de motoneuronas del asta ventral de la médula espinal y la corteza motora, acompañada de reactividad glial que se correlaciona con la parálisis (68).

El desarrollo de modelos murinos de ELA generó un aumento exponencial del conocimiento sobre los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la muerte de las neuronas motoras y por ende a la progresión de la enfermedad. Nuestro laboratorio, junto con otros, fue pionero al describir una cantidad significativa de procesos celulares y moleculares que dan lugar a la constitución de un microambiente celular neurodegenerativo alrededor de las motoneuronas espinales que degeneran en la ELA

(69-74). Sin embargo, una caracterización más profunda de la emergencia de fenotipos gliales senescentes en este microambiente es clave para comprender de mejor manera como la sensencia celular puede contribuir a la patogenia de la neurodegeneración. Esta mejor comprensión es fundamental, ya que la senescencia en los procesos de neurodegeneración podría constituir un blanco terapéutico prometedor para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamientos que tengan como objetivo modificar este ambiente degenerativo y tratar el avance de la enfermedad.

1.6 Senescencia celular en la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

Se han estudiado marcadores de senescencia y daño oxidativo del ADN en el córtex motor y lóbulo prefrontal de la corteza cerebral en pacientes con ELA, donde se observa una expresión de p16 en astrocitos y p21, tanto en astrocitos como en neuronas piramidales (72). De manera similar se ha observado que los astrocitos muestran marcadores de senescencia en el modelo de ELA de ratones hSOD1^{G93A} (75). En otro trabajo se han estudiado los niveles de la proteína p53, observándose un aumento en regiones selectivamente vulnerables SNC en la ELA. Aquí se observa una actividad aumentada de la unión p53-ADN en dichas regiones y un aumento en la expresión de p53 se observa en las neuronas motoras del SNC (76).

Más recientemente, en nuestro grupo de trabajo, se describió que durante el proceso degenerativo en la médula espinal en modelo de ratas de ELA, ocurre la emergencia de fenotipos senescentes de microglía y astrocitos en el ambiente que rodea a las motoneuronas en degeneración (72). Estas células expresan marcadores típicos de senescencia como p16, p53 y la pérdida de Lamina B1.En este trabajo previo, p16 también se observa aumentado en los astrocitos y neuronas motoras en estadios tardíos de la enfermedad en la médula espinal (72). Por otra parte, en un cultivo de microglias aisladas de médulas espinales de rata SOD1 sintomáticas, se observa una transición

hacia un estado celular senescente, caracterizada por la expresión de marcadores típicos como p16, p53, metaloproteasa 1 (MMP1), además de una elevada actividad β-gal y cambios morfológicos característicos de las células senescentes (72).). Además, la aparición de fenotipos gliales senescentes se correlaciona positivamente con la progresión ineluctable de la enfermedad en estos modelos animales de ELA. Esto sugiere que la emergencia de células gliales senescentes en el microambiente celular neurodegenerativo podría contribuir de manera significativa al mantenimiento del ambiente tóxico para las neuronas y potencia los mecanismos inflamatorios característicos de la enfermedad.

Sin embargo, estos estudios son incipientes, y como mencionamos más arriba, estas células podrían ser blanco de terapias senolíticas que busquen su eliminación, y por lo tanto es necesario seguir profundizando en la comprensión de los fenotipos gliales senescentes en el contexto de la neurodegeneración.

2. Objetivos.

2.1 Objetivo general.

Caracterizar la senescencia celular en cultivo de microglía BV2 con TMZ y caracterizar con mayor profundidad la senescencia microglial en un contexto de neurodegeneración.

2.2 Objetivos Específicos.

1. Caracterizar microglías senescentes en la línea celular BV2 mediante daño químico del ADN.

Para ello se utilizará una droga quimioterapéutica (el TMZ) para provocar el arresto celular. Para estudiar el fenotipo adquirido nos valdremos de la citometría de flujo para la

medición de la actividad β -gal, así como de la microscopía confocal e inmunomarcación, para observar proteínas fundamentales en la transición hacia una célula senescente.

2. Profundizar en la caracterización de la microglía senescente emergente en la médula espinal de un modelo murino de ELA, con ratones con la mutación hSOD1^{G93A}.

A partir de un modelo murino de ELA estudiaremos la médula espinal por técnicas de inmunohistoquímica y microscopía confocal para diferentes marcadores de células senescentes y microglías. Para ello utilizaremos en particular marcadores tales como: lba1, p16, p21, lámina B1 y HMGB1. Además estudiaremos la morfología nuclear, elemento clave en la adquisición de un fenotipo senescente.

3. Estrategia experimental.

3.1 Línea celular BV2.

Las células BV2 son un tipo de línea celular inmortalizada de microglía murina. La línea celular BV2 retiene una morfología microglial y características funcionales, sin embargo el ratio metabólico y proliferativo de las BV2 *in vitro* es mucho mayor al de otros tipos microgliales.(77)

Ante tratamientos con LPS estas células expresan un patrón inflamatorio similar a la microglía obtenida a partir de un cultivo primario. Sin embargo, la respuesta es, en general, de menor intensidad. Se observó también que, la microglía BV2 activada comparte la expresión del 90% de los genes inflamatorios con la microglía primaria, y el 42% con microglía obtenida directamente del hipocampo de ratón (77).

También se ha observado, que las células BV2 son capaces de activarse en presencia de citoquinas como IFN-γ, lo cual es importante para demostrar que estas células son capaces de responder frente a otros estímulos inmunes.

Por último, la línea celular BV2 activada con LPS puede inducir una respuesta inflamatoria en astrocitos *in vitro*. Esto se relaciona con la capacidad de la microglía primaria de promover un fenotipo inflamatorio en astrocitos *in vivo* (78)



3.2 Temozolomide (TMZ) como inductor de la senescencia en BV2.

Figura 5. Estructura química del Temozolomide (TMZ).

El Temozolomide (TMZ) es un agente alquilante del ADN que altera el ciclo celular. En presencia de una secuencia de tres guaninas (G) continuas (GGG), el TMZ es capaz de alquilar la G del medio. Esta metilguanina producida es procesada por la vía que repara los errores de replicación GT. Esto genera sucesivos fallos, debido a la falta de complementariedad, lo que resulta en continuos ciclos de escisión/inserción que generan una pequeña hendidura en el ADN, resultando en la inhibición del ciclo celular en la fase S.

3.3 Estudio de la toxicidad y viabilidad celular en células tratadas con TMZ.

Para hallar el mejor tratamiento que no presente una toxicidad elevada en las células tratadas con TMZ, se estudió la viabilidad celular con ioduro de propidio (IP) mediante la técnica de citometría de flujo, para todos los tratamientos con TMZ. El protocolo de tratamiento se realizó con concentraciones desde 100 a 500 µM.

3.4 Estudio de la actividad β-galactosidasa en BV2 tratadas con TMZ.

Para lograr hallar el mejor tratamiento que pueda transformar el fenotipo de las células BV2 normales a senescentes, se estudió la actividad β -gal en diferentes condiciones de administración de TMZ. La actividad β -gal de la microglía BV2 se observó mediante la técnica de citometría de flujo. El protocolo de tratamiento incluyó concentraciones desde 100 a 500 μ M.

3.5 Caracterización del fenotipo senescente en BV2 tratadas con TMZ.

Una vez obtenido el tratamiento adecuado que permitió inducir un fenotipo senescente en la microglía BV2, se caracterizó en mayor profundidad el fenotipo observado en las células. Para ello, se utilizó un kit de tinción citoquímica, para identificar células β-gal positivas por técnicas de microscopía de campo claro. Asimismo, se estudió su morfología para poder elucidar si ésta corresponde a un posible fenotipo senescente.

También se analizó la presencia de marcadores específicos para proteínas relevantes de la senescencia celular en la microglía BV2 senescente, mediante técnicas de inmunocitoquímica. En particular corroboramos el arresto celular con la proteína Ki67, marcador de proliferación, y observamos la expresión del marcador de senescencia, lámina B1. Luego de marcadas las células se observaron por microscopía confocal.

3.6 El ratón hSOD1^{G93A} como modelo de ELA.

Para el estudio de la senescencia celular en microglías se utilizó el modelo de neurodegeneración murino hSOD1^{G93A}. Este modelo se genera a partir de la sobreexpresión de la proteína hSOD1^{G93A} en ratones y recapitula características fisiopatológicas de la ELA en humanos. Esto parece deberse a una toxicidad asociada a la capacidad que tiene la proteína SOD1 mutada de generar agregados proteicos (68).

Además de la degeneración de la neurona motora, el modelo hSOD1^{G93A} se caracteriza por presentar neuroinflamación en el estadío sintomático que involucra tipos celulares no neuronales, principalmente astrocitos y microglía, lo que lo acerca a la

condición patológica en humanos. Estas características fisiopatológicas del modelo lo hacen adecuado para el presente trabajo (68).

3.7 Caracterización del fenotipo senescente microglial en la médula espinal de ratón.

Como se observa en la figura 4, la degeneración de motoneuronas en la ELA ocurre en el asta ventral de la médula espinal. Por lo tanto, se estudió el fenotipo senescente de la microglía localizada en el asta ventral de la médula espinal del ratón hSOD1^{G93A} en estadío sintomático. Para ello, se realizaron marcaciones con anticuerpos por inmunohistoquímica y se analizaron los resultados utilizando técnicas de microscopía confocal. Los marcadores específicos utilizados fueron: lba1, para identificar a la microglía, y p16, p21, lámina B1, y HMGB1 como marcadores de senescencia.

4. Materiales y métodos.

4.1 Células BV2.

Mantenimiento.

La línea celular BV2 fue cultivada en botellas de 75 cm² en medio DMEM (Sigma, USA), con 10% suero bovino inactivado (30 minutos a 60 °C) (Gibco, USA), 100 µg/mL de penicilina (Sigma, USA) y 100 U/mL de estreptomicina (Sigma, USA). Los cultivos fueron mantenidos en una estufa a 37°C, 5% CO₂ y humedad saturada. A las células se les cambió 2/3 del medio cada 2-3 días y luego de 7 días en cultivo, cuando alcanzaron 100% confluencia, fueron sub-cultivadas. Para ello, las células fueron despegadas mecánicamente utilizando *scrappers* y el contenido total de la botella se dividió en 3 botellas de 75 cm².

Replaqueo.

Para los experimentos, las células fueron replaqueadas en multipocillos. Las células BV2 se plaquearon en multiplacas de cultivo de 6 pocillos, con una densidad de 50.000 células/ pocillo.

4.2 Tratamiento con TMZ.

Como mencionamos previamente, se utilizó esta droga para lograr un arresto celular en células BV2 que permita desarrollar un fenotipo senescente.

Luego de pasadas 72 horas del plaqueo de las células en multiplacas, se realizaron los siguientes tratamientos con TMZ:

- 100, 200, 300, 400, 500 µM de TMZ durante:
- A. 1 pulso de 24 horas.
- B. 2 pulsos de 4 horas

Las lecturas de la actividad β -gal y de viabilidad celular con ioduro de propidio fueron realizadas 24, 48 y 72 horas (hs) post tratamiento.

La solución stock de TMZ fue preparada en DMSO puro, y las posteriores diluciones se realizaron en el medio de cultivo. La droga se agregó en una concentración menor al 1% del volumen final para evitar la toxicidad del DMSO. En todos los experimentos se incluyó el tratamiento con el vehículo de TMZ como control (DMSO).

4.3 Evaluación de la actividad β -galactosidasa y viabilidad celular.

4.3.1 Citometría de flujo.

La citometría de flujo es una técnica que se utiliza para medir características morfológicas y de fluorescencia de una célula individual o partícula. El tamaño, la granularidad y la fluorescencia son características de las células que se pueden observar con esta técnica utilizando anticuerpos o tinciones.

El principio de la citometría de flujo radica en la emisión de fluorescencia y la dispersión de la luz proveniente de la fuente de excitación (en general un láser) a través

de la partícula en movimiento. La dispersión de la luz está directamente relacionada a la estructura y las propiedades morfológicas de las células, mientras que, la cantidad de fluorescencia emitida está directamente relacionada a la cantidad de sonda fluorescente presente en la célula.



Figura 6. Representación esquemática de los componentes de un citómetro de flujo. (Imagen adaptada de cellsignal.at/applications/flow-cytometry/flow-cytometry-overview)

Los componentes fundamentales de los citómetros de flujo son los fluidos, los componentes ópticos y el componente electrónico. Los fluidos son los responsables de dirigir a las partículas hacia el foco de luz. El componente óptico se encarga de enfocar la luz sobre la partícula y transmitir la dispersión de luz y fluorescencia hacia una red electrónica. Por otra parte, el componente electrónico se encarga de detectar la señal y convertirla en datos digitales proporcionales a la intensidad de luz dispersada. Finalmente se requiere de una computadora para analizar los datos (79).

Luego de pasadas 24, 48 o 72 hs de los distintos tratamientos se realizó la tinción con C12FDG. El C12FDG es un sustrato de la enzima β -galactosidasa, y ha sido modificado de forma tal que incluye un residuo lipofílico de 12 carbonos. Una vez dentro de la célula, el sustrato es clivado por la enzima produciendo un producto fluorescente que es bien retenido por las células, probablemente tras la incorporación de la cola lipofílica en la membrana citoplasmática. El C12FDG es el principal componente del *kit* que utilizamos.

Previo a la utilización de C12FDG, las células se trataron con cloroquina para eliminar la actividad basal de β-gal que pueda haber en la célula.

Finalmente, se utilizó el reactivo PETG para inhibir la actividad β-gal y detener la reacción catalizada por la enzima.

Se utilizaron placas de 6 pocillos. Como control del experimento uno de los pocillos fue tratado con vehículo (DMSO). Para los controles simple marca necesarios para la citometría de flujo uno de los pocillos no fue incubado con C12FDG, el cual se utilizó para la marcación simple con IP, y otro solo fue marcado con C12FDG sin colocar IP al momento de procesar la muestra para la medición en el equipo.

Protocolo de tinción con C12FDG.

- Retirar el medio de las placas y colocar 1 mL de cloroquina (300 μM) por pocillo, durante 30 minutos.
- Retirar la cloroquina e incubar con la solución de C12FDG (10 μM, 1mL por pocillo) durante 30 minutos.
- 3. Descartar y levantar en PBS 1X con PETG 1 mM.
- 4. Agregar 1 µL de IP en control, simple marca y muestras.

Una vez realizado el procedimiento utilizamos el citómetro AttuneNxT (Thermo Fisher Scientific). Para el análisis de las muestras en el citómetro se realizaron controles simple marca para cada una de las tinciones (IP y C12FDG), para, de ésta forma, definir las diferentes poblaciones: la población negativa para IP se corresponde con las células viables, la población C12FDG positiva constituye la población con actividad β-gal. La adquisición de los datos fue realizada con el programa AttuneNxT Software.

Mientras se realizó la adquisición de los eventos, realizamos el gráfico de FSC/SSC donde observamos tamaño y granularidad de las células. Definimos nuestra población de interés descartando los detritos celulares mediante este gráfico (ratio FSC/SSC bajo). Luego realizamos el gráfico de FSC-A/FSC-H para estudiar la relación entre la altura del pico de la señal (H) y el área debajo de tal pico (A), y descartar los acúmulos celulares. Cuando las células pasan como singulete existe una correlación entre el FSC-H y el FSC-A por lo que se observará como una recta. No obstante, cuando pasan como dobletes esta proporcionalidad desaparece, por lo que estudiar mediante este gráfico nos permitirá seleccionar sólo las células que pasan como singulete. Seguidamente, utilizamos los gráficos para definir los límites de IP y C12FDG. Seleccionamos las poblaciones negativas para ambos marcadores utilizando los controles simple marca para ambas tinciones y a partir de ahí se definió la región para la marca positiva.

Luego, analizamos las muestras. Primero, analizamos la muestra tratada con vehículo, que representa el control del experimento. A partir del mismo, se basarán las futuras conclusiones respecto a los cambios que el TMZ tenga sobre los parámetros a estudiar. Por último, pasamos nuestras muestras tratadas con TMZ bajo las distintas condiciones experimentales.

El análisis tras la adquisición de los datos, fue realizado con el programa FlowJo.

4.3.2 Citoquímica.

La técnica de coloración para β -gal se realizó sobre los multipocillos tratados con el vehículo y el TMZ 48 hs post tratamiento (dado que se observa la mayor proporción de células β -gal por citometría de flujo). Se utilizó el *kit* Cell Signaling (#9860). Como controles utilizamos las mismas células BV2 plaqueadas y mantenidas en las mismas condiciones y tratadas con el vehículo (DMSO). A ambas condiciones se le realizó el mismo protocolo para la tinción citoquímica.

En este caso la solución de X-gal es el sustrato para la enzima β -galactosidasa que va a generar color, por lo que es el reactivo fundamental en este *kit*.

Protocolo.

- 1. Remover el medio de las placas y lavar una vez con PBS 1X.
- Agregar 1 mL de la solución de fijación por pocillo de 35 mm y dejar 10-15 minutos a temperatura ambiente.
- 3. Lavar 2 veces con PBS 1X.
- Agregar 1 mL de la solución de tinción por pocillo de 35 mm e incubar 24 hs en estufa a 37 °C sin CO₂. Observar en microscopio de campo claro para seguir el desarrollo de color.

Solución de tinción.

Por cada pocillo de 35 mm combinar:

- 930 µL de solución de tinción 1X
- 10 µL de solución A 100X
- 10 µL de solución B 100X
- 50 µL de la solución X-gal stock 20 mg/mL

4.4 Inmunocitoquímica células BV2.

La inmunomarcación, en este caso para células de cultivo, es una técnica que se basa en la interacción antígeno-anticuerpo, que tiene como objetivo detectar un antígeno de interés (proteína o macromolécula específica) dentro de un tejido o cultivo celular, que nos permite luego visualizar la marca por microscopía. Se utiliza un anticuerpo primario que es capaz de reconocer al antígeno de interés. En general, se utiliza un anticuerpo secundario, conjugado a un fluoróforo, capaz de reconocer el anticuerpo primario. Este es el caso de la inmunomarcación indirecta utilizada en esta oportunidad (figura 7).



Figura 7. Esquema del funcionamiento de la inmunomarcación indirecta. (Imagen adaptada de novusbio.com/applications/icc)

Se realizó una tinción por inmunocitoquímica de las células BV2 tratadas con TMZ y vehículo, utilizando anticuerpos para proteínas que son marcadores de senescencia celular.

Protocolo.

- Incubar las células con PFA 4% en PBS durante 20 minutos a 4 °C. Este paso se utilizó para fijar a las células.
- Bloquear las células fijadas con seroalbúmina bovina (BSA) 5% en PBS 1X pH 7.4 durante una hora a temperatura ambiente. Este paso se realiza para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos.
- Incubar las células con los siguientes anticuerpos primarios: Ki67 (Abcam, Ab11181, conejo, 1/200) o lámina B1 (conejo Abcam, Ab16048, 1/200), diluidos en

BSA 1% en PBS 1X pH 7.4. Las placas de células se incuban durante toda la noche a 4°C.

- 4. Lavar las placas 3 veces con PBS 1X.
- 5. Incubar las células con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 546 (Thermo Fisher Scientific, 1/1000) durante 2 hs a temperatura ambiente en BSA 1% en PBS 1X. En este paso también se agrega DAPI como intercalante de ADN, para observar los núcleos.

Las imágenes fueron adquiridas utilizando el microscopio confocal ZEISS LSM 800. Se realizaron z-stacks de las células utilizando el objetivo 63x. Luego estas fueron procesadas con el software Zen (black edition) y analizadas con el software ImageJ.

4.5 Animales.

Se utilizaron animales provenientes de la colonia transgénica de ratones que sobreexpresan la hSOD1^{G93A}. Se utilizaron ratones transgénicos heterocigotas. Estos animales se obtienen de la cruza de machos hSOD1^{G93A} heterocigotas con hembras no transgénicas. La progenie resultante está constituida por 50% animales transgénicos y 50% no transgénicos. Para determinar cuáles crías portaban el gen se realizó el genotipado de las camadas utilizando como método la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico extraído de la cola de los animales de 21 días. Las inmunomarcaciones de las médulas espinales de ratón se realizaron a partir de animales transgénicos.

4.6 Inmunohistoquímica de médula espinal.

La médula espinal disecada fue puesta en sacarosa y luego congelada para ser seccionada con el criostato Leica en cortes de 20 µm de espesor.

El análisis de marcadores específicos mediante inmunohistoquímica de la médula espinal de ratones hSOD1^{G93A}, y WT se realizó de la siguiente manera:

Protocolo:

- Los tejidos se permeabilizaron y bloquearon con BSA 5% –Triton X-100 0,5% en PBS 1X pH 7.4. durante 1 h a temperatura ambiente.
- Para los casos en que era necesario desenmascarar el antígeno se realizó, previo a la permeabilización y bloqueo, el reclutamiento antigénico en buffer citrato de sodio 10 mM pH 6 durante 5 minutos a 95°C con agitación (350 rpm).
- Los cortes se incubaron durante toda la noche con los diferentes anticuerpos (Tabla
 1), en una solución de BSA 1%- Tritón X-100 0,5% en PBS 1X pH 7.4.
- Luego de varios lavados con PBS 1X pH 7.4, las secciones fueron incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados a Alexa Fluor 488, 546 o 633 (Thermo Fisher Scientific, 1/1000) durante 2 hs a temperatura ambiente.

| Reconoce | Host | Dilución | Identificación |
|----------|------------|----------|----------------------|
| p16 | ratón | 1/100 | Abcam (Ab54210) |
| p21 | conej o | 1/1000 | Abcam (Ab188224) |
| lba1 | conej o | 1/400 | wako (01919741) |
| lba1 | ratón | 1/400 | Milipore (MABN92) |
| HMGB1 | ratón | 1/400 | Abcam (Ab79823) |

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados para la inmunohistoquímica.

Las imágenes fueron adquiridas utilizando el microscopio confocal ZEISS LSM 800. Se realizaron z-stacks de los cortes de médula con el objetivo 63x, 1,4 NA en aceite. Luego estas fueron procesadas con el software Zen (black edition) y analizadas con el software imageJ.

4.7 Microscopía confocal.

La microscopía confocal es una técnica de observación microscópica que tiene como ventajas, una mayor resolución y contraste debido a que elimina la luz procedente de las zonas fueras de foco y permite tomar imágenes a diferente profundidad lo que posibilita una reconstrucción tridimensional de la muestra (80).



Figura 8. Esquema de los componentes y funcionamiento del microscopio confocal. (Imagen adaptada de cellsignal.at/applications/flow-cytometry/flow-cytometry-overview)

En la figura 8 observamos todos los componentes que integran un microscopio de láser confocal. El sistema láser es la fuente de excitación que pasa por una apertura que se sitúa en un plano confocal, que tiene un punto de escaneo sobre la muestra. Una segunda apertura se posiciona frente al detector (el tubo fotomultiplicador). A medida que el láser es reflejado por el espejo dicroico, y la muestra es escaneada en un plano focal, la fluorescencia emitida secundariamente por los puntos de la muestra, pasa por el espejo dicroico haciendo foco en lo que se denomina el foco confocal en la apertura del detector.

Además, la fluorescencia emitida que se da en puntos sobre y debajo del plano focal del objetivo no es confocal a la apertura, de esta manera la mayoría de ésta no es detectada por el fotomultiplicador, y no contribuye a la imagen resultante. El filtro del espejo dicroico y el filtro de excitación cumplen funciones similares a un microscopio de epifluorescencia. Re-enfocar el objetivo cambia los puntos de emisión y excitación sobre la muestra a otro plano que se vuelve el plano confocal con la apertura de la fuente de luz y el detector.

4.8 Análisis cuantitativo de células microgliales en la médula espinal.

El conteo de células Iba1+, HMGB1+, p16+, p21+ se llevó a cabo cuantificando el número de células que expresan dichos marcadores en el asta ventral de la médula espinal lumbar de los animales hSOD1^{G93A} y WT.

El conteo se realizó manualmente en al menos 8 secciones histológicas de 20 µm, por animal (n=5). Para hacer el conteo de los núcleos se utilizó la herramienta "cell counter" del software ImageJ. Para identificar los núcleos p16+, p21+, HMGB1+, Iba1+, se observó la colocalización con DAPI.

4.9 Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron con el software Graphpad. El test de dos muestras (t-student) fue realizado entre grupos. Todos los resultados fueron expresados como la media ± el error estándar de la media (SEM), considerando p<0.01 estadísticamente significativo.

4.10 Consideraciones éticas.

Todos los estudios en animales fueron realizados en estricta conformidad con los requerimientos de la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Instituto Pasteur de Montevideo; y bajo las actuales normas éticas de regulación.

5. Resultados

5.1 El tratamiento con TMZ es capaz de inducir la senescencia en un modelo de células BV2.

Uno de nuestros objetivos era poner a punto un modelo de células microgliales senescentes, que nos permitiera contar con una herramienta accesible para el estudio con mayor profundidad de los cambios morfológicos y estructurales, pero también en un futuro moleculares, que cursan las células microgliales cuando están en el proceso de volverse células senescentes. En este proyecto trabajamos con una línea celular bien caracterizada de microglía murina, como son las células BV2 (77).

Para obtener un cultivo de células microgliales senescentes, las células BV2 fueron tratadas con TMZ. Este compuesto, alquilante del ADN, es capaz de provocar el arresto celular en células cancerígenas (12).

Con el fin de optimizar las condiciones del cultivo y seleccionar las dosis apropiadas de TMZ, se realizaron curvas dosis-respuesta, tratando las células con concentraciones crecientes entre 100 y 500 μ M. Se estudió la respuesta bajo dos tratamientos diferentes, por un lado, las células fueron tratadas en 2 pulsos de 4 horas cada uno, o 1 pulso por 24 horas. Luego se analizó por citometría de flujo los niveles de actividad β -gal en la población de células BV2 así como también se evaluó la viabilidad celular a diferentes tiempos (24, 48 y 72 hs post tratamiento).

En la figura 9A se observa el análisis cuantitativo de la variación en viabilidad celular y la actividad obtenida luego de los tratamientos con concentraciones crecientes de TMZ. La línea roja observada en los gráficos corresponde al tratamiento con TMZ en la modalidad de 1 pulso durante 24 horas, mientras que la línea azul, corresponde al tratamiento con 2 pulsos por 4 horas. En los paneles de la izquierda se observa la viabilidad celular expresada como el porcentaje de células IP negativas (% células vivas).

Se observó una relación de la concentración-muerte similar en ambas condiciones, observándose una muerte celular significativa en las concentraciones más elevadas (500 µM). Las gráficas de la columna de la derecha muestran el análisis cuantitativo de variación en la actividad β-gal, representando el porcentaje de células senescentes después de los diferentes tratamientos. El tratamiento con TMZ indujo un aumento en la actividad β-gal de manera dosis dependiente, llegando a un máximo del 92.2% de las células con actividad β-gal positiva luego del tratamiento con 300 μM de TMZ. Para dosis más altas (400 y 500 µM) se observa una disminución en el porcentaje de células analizado tanto 24 cómo senescentes para ambos tratamientos, 48 horas post-tratamiento. Esto puede explicarse por la alta toxicidad que presentan los tratamientos con estas altas dosis del agente alquilante. Los porcentajes de células senescentes alcanzados durante el tratamiento con 1 pulso por 24 horas, superan a los alcanzados luego del tratamiento de 2 pulsos de 4 horas. Obtenidos estos resultados, se concluye que dosis a partir del cual se obtiene mayor porcentaje de células senescentes viables, es la de 300 µM de TMZ, dado en 1 pulso durante 24 horas, y estudiando el cultivo luego de 48 horas post-tratamiento.

En la figura 9B se muestra el análisis por citometría de flujo de la viabilidad celular y la actividad β -gal para el tratamiento elegido, 300 μ M. En los paneles superiores observamos gráficos de punto representativos luego del análisis por citometría de flujo de la marcación con IP para la concentración de 300 μ M. Durante 24 horas, medido 48 horas post tratamiento, en comparación con células BV2 tratadas con el vehículo (DMSO). Tanto las células tratadas con el vehículo como con TMZ, se observa una muerte celular de entre el 15 y el 20%. Esta muerte celular responde a la alta tasa proliferativa que presentan las células BV2, en donde generalmente la muerte celular basal es elevada. En los paneles centrales e inferiores, se observa el análisis por citometría de flujo y

microscopía de campo claro, la actividad β -gal y los cambios morfológicos que sufren las células con el tratamiento con TMZ, respectivamente. En los paneles inferiores se observa que el tratamiento con 300 μ M de TMZ, produjo una inducción de la actividad β -gal en el 92.2% de las células analizadas. En comparación, en las células tratadas con el vehículo, solo se observa un 23% de las células BV2 que presentan actividad β -gal. Las imágenes de microscopía de la derecha muestran el análisis de los cambios morfológicos en las células BV2 tratadas con TMZ (imagen de paneles inferiores) en comparación con las células BV2 tratadas con el vehículo. Por el contrario, en las células BV2 tratadas con 300 μ M de TMZ, se observan cambios morfológicos como el aumento del tamaño celular, lo que es concordante con la literatura respecto a la adquisición de un fenotipo senescente en cultivo.



Figura 9. Caracterización de una línea de microglía senescente por daño del ADN. Células BV2, una línea de microglía murina, fueron expuestas a diferentes concentraciones y tiempos de temozolomide (TMZ), un agente alquilante del ADN. A) Las gráficas representan el análisis de células BV2 viables (gráficas de la izquierda) y senescentes (gráficas de la derecha) expuestas a diferentes concentraciones (eje x) y tiempos de exposición con TMZ (líneas azules y rojas). Las células fueron analizadas luego de 24 hs (gráficas superiores), 48 hs (paneles centrales) o 72 hs (paneles inferiores) luego de ser tratadas con TMZ. Las líneas rojas representan células tratadas una sola vez y durante 24hs con TMZ. Las líneas azules muestran células tratadas en dos pulsos de 4 hs cada uno, posterior a lo cual se removió el medio de cultivo y se sustituyó por medio sin TMZ. **B**) Estudio de la expresión de β -gal por citometría de flujo. Los paneles superiores muestran el análisis por citometría de flujo de células BV2 tratadas con 300 µM (concentración elegida como óptima para inducir senescencia) de TMZ (gráfica derecha) y células tratadas con vehículo (DMSO - gráfica izquierda). Las células fueron marcadas con ioduro de propidio para evaluar la viabilidad celular. Los análisis posteriores se realizaron en las células viables, en donde se analizó la expresión de β-gal mediante el kit C12FDG. En los paneles centrales se observa el análisis de β-gal de células proliferantes tratadas con vehículo. La figura de la derecha muestra una microfotografía representativa de contraste de fase de las células analizadas. Los paneles inferiores muestran el análisis de citometría de flujo (gráficas de la izquierda) y expresión de β-gal (panel derecho).

5.2 La microglía senescente en cultivo presenta alteraciones en la morfología nuclear característica en la senescencia celular.

Para el estudio del fenotipo celular en las células microgliales senescentes inducidas con el tratamiento con TMZ, realizamos un ensayo colorimétrico para observar la actividad β-gal y por otro lado, mediante técnicas de inmunocitoquímica y posterior visualización por microscopía confocal, inmunomarcamos las células con Ki67 y lámina B1. Además, la marcación con DAPI nos permitió analizar la estructura de los núcleos.

En la figura 10A observamos por microscopía de campo claro, la tinción citoquímica para observar la actividad β -gal. En el panel superior de la primera columna, observamos que las células tratadas con el vehículo no presentan cambios morfológicos de significancia y no presentan actividad β -gal significativa. Por el contrario, como se observa en el panel inferior, las células tratadas con 300 μ M de TMZ mostraron un aumento muy marcado de la actividad β -gal, además de observarse cambios morfológicos característicos, como aumento del volumen celular, extensión de procesos e hipertrofia de los núcleos. Las figuras de la derecha son imágenes representativas de microscopía de campo claro en donde se observa con mayor detalle los distintos fenotipos que adquieren las células BV2 senescentes luego de ser expuestas al agente alquilante. Se observa

somas agrandados, activados, y multinucleados, elementos reportados para las células senescentes en la literatura (31).

Para profundizar en la caracterización del fenotipo celular senescente de las células BV2 expuestas a TMZ, realizamos una inmunomarcación para Ki67, un marcador típico de células proliferantes, y lámina B1, un marcador de membrana nuclear que está reportado disminuye su expresión en células senescentes (49). En la figura 10B se muestra la tinción nuclear con DAPI (azul) y la inmunomarcación para Ki67 (rojo) y Lamina B1 (amarillo), para células tratadas con el vehículo y con 300 µM de TMZ. Se observa una disminución en el número de células que expresan Ki67 en las células tratadas con TMZ respecto al control, lo que indica que las células tratadas con el agente alquilante están en arresto celular. Por otra parte, en las células senescentes, se observa un aumento en el tamaño de los núcleos y alteraciones en la lámina nuclear, con invaginaciones y una discontinuidad en la distribución espacial de la expresión de la lámina B1. En la figura 10C se observa una caracterización de la morfología nuclear a mayor aumento mediante microscopía confocal en las células senescentes (los dos paneles inferiores) en comparación con las células tratadas con el vehículo (panel superior). Se observa que los núcleos de las células controles presentan una estructura típica, redondeados y con una expresión de lámina B1 característica, y el contenido genómico se encuentra totalmente comprendido dentro del núcleo. En comparación, las células tratadas con 300 µM de TMZ, se observan regiones con deformaciones de la lámina que se condicen con protuberancias del contenido nuclear (flechas blancas). También se observan invaginaciones de la lámina y roturas con escape del material genético fuera del compartimento nuclear (flechas blancas).



Figura 10. Caracterización morfológica de microglía senescente por daño del ADN. Células BV2, tratados con 300 µM por 24 hs con TMZ. **A)** Los paneles a la izquierda muestran imágenes representativas de microscopía de campo claro, donde se observa la actividad β -gal en células BV2 sin tratar (arriba) y tratadas (abajo). Las células senescentes se observan en celeste. En el panel de la derecha se observan diferentes imágenes representativas de los fenotipos senescentes observados luego de los tratamientos con TMZ 300 µM teñidos con el kit de marcación de la actividad β -gal. **B)** Se observa la marcación por inmunocitoquímica de las células BV2 con Ki67 (rojo), lámina B1 (amarillo), y DAPI (azul), en BV2 sin tratar (paneles superiores) y BV2 tratadas (paneles inferiores). **C)** Se observan representaciónes en 3D de la inmunocitoquímica observada en B con el programa Zen (Black edition), para DAPI y lámina B1 de las células sin tratar (fotos superiores) y tratadas (fotos inferiores). Se identifican con flechas blancas en la marcación con DAPI protuberancias del núcleo e invaginaciones; mientras que las flechas en la lámina B1 muestran pérdida de la expresión de la misma.

5.3 Las células microglíales senescentes en la médula espinal de ratones hSOD1^{G93A} presentan una morfología nuclear alterada

Para profundizar el estudio de las células microgliales senescentes en el contexto de un modelo de neurodegeneración, estudiamos mediante inmunohistoquímica y microscopía confocal, el fenotipo de la microglía senescente de la médula espinal en un modelo murino de ELA, ratones hSOD1⁶⁶⁰. Para la caracterización de la microglía realizamos inmunomarcación utilizando anticuerpos contra marcadores típicos de senescencia, como p16, p21, lámina B1, y HMGB1. (33, 34, 36, 81). El análisis estuvo enfocado en el asta ventral de la médula espinal, en particular en el microambiente celular neuroinflamatorio que rodea a las motoneuronas en degeneración.

Primero, realizamos una caracterización de los marcadores de senescencia p16 y p21 en la médula espinal de ratones hSOD1^{G93A}. En la imagen 11A se observan microfotografías de microscopía confocal representativas, en donde se observa un aumento significativo del número de núcleos positivos p16 y p21, en comparación con los ratones no transgénicos. Para determinar la localización celular de estos marcadores de células senescentes, realizamos una co-marcación para p16 y p21, con DAPI.

En la figura 11B se observan las microfotografías de microscopía confocal representativas con la co-marcación p16/lba1/DAPI (imágenes superiores) y p21/lba1/DAPI (imágenes inferiores) (82). Se observa que la expresión nuclear de p16 se da principalmente en las células microgliales, visto mediante la colocalización con la marcación de lba1 (rojo). Sin embargo, se observa que p21 nuclear no se expresa en la microglía lba1+. Las gráficas de la derecha muestran el análisis cuantitativo de la colocalización lba1/p16 e lba1/p21. Finalmente, en la figura 11C se observan imágenes representativas de microscopía confocal en donde se observó la estructura de los núcleos de las células microgliales que expresan el marcador nuclear de senescencia p16. Se observa que la estructura nuclear de la microglía que expresa p16 la médula espinal de

ratones hSOD1^{G93A} es anormal (paneles inferiores), en comparación con los núcleos de la microglía en ratones no transgénicos (paneles superiores), en los cuales no se observan alteraciones de relevancia y no se detecta la expresión de marcadores de senescencia. En los animales hSOD1^{G93A} se observan morfologías nucleares no redondeadas, roturas de la envoltura nuclear con escape de material genético y diversas protuberancias.



Figura 11. Caracterización del fenotipo y morfología nuclear senescente de la médula espinal de ratones hSOD1^{G93A}. Estudio por microscopía confocal del asta ventral de la médula espinal de ratones hSOD1^{G93A} y ratones no transgénicos. A) Las imágenes superiores muestran la expresión del marcador de senescencia p16 (verde) y DAPI (azul) en ratones no transgénicos (izquierda) y ratones hSOD1^{G93A} (derecha). En las imágenes inferiores se observa la marcación para p21 (en verde) y DAPI (azul). Los gráficos a la derecha de las imágenes muentran el análisis cuantitativo de los marcadores de senescencia p16 y p21, se expresan como media ± error estándar de la media, donde *p<0.01 fue considerado significativo. B) En los paneles superiores se observa la microglía senescente, marcada con p16 (en verde) e lba1 (con rojo). Las fotos superiores muestran en aumento el fenotipo de la microglía observada en las fotos inferiores. A la derecha de los paneles se observan el análisis cuantitativo para ambas marcaciones y se expresan como media ± error estándar de la media, *p<0.01 fue considerado significativo. C) Se observan imágenes en 3D de los núcleos de las células senescentes. En el panel superior se observan imágenes de ratones no transgénicos con DAPI (azul). En los paneles inferiores observamos fotos de núcleos de animales transgénicos marcados con p16 (arriba y en verde) y DAPI. Se observan tres fenotipos nucleares senescentes para cada marcación.

5.4 Las alteraciones nucleares en la microglía senescente en los ratones hSOD1^{G93A} está acompañada de la baja expresión nuclear de HMGB1.

Para continuar con la caracterización de la microglía senescente en los ratones hSOD1^{G93A}, nos preguntamos lo que ocurría con la expresión de HMGB1 en las células microgliales que expresan marcadores de senescencia en la médula espinal. La expresión nuclear de HMGB1 está asociada a la regulación de la expresión de marcadores de senescencia como p53 (54, 83). Pero también puede ser exportada fuera del núcleo y actuar como una proteína con propiedades pro-inflamatorias en su forma acetilada(84). Actualmente se desconoce cuál es el rol de HMGB1 en las células gliales durante la progresión de la ELA. Para investigar sobre su papel en el contexto de la neuroinflamación en la médula espinal de los ratones hSOD1^{G93A}, realizamos inmunomarcaciones para Iba1, p16 y HMGB1. En la figura 12A se observan microfotografías de microscopía confocal representativas, en donde se observa que ocurre una disminución significativa en la expresión nuclear de la proteína HMGB1 (verde) en la médula espinal de los ratones hSOD1^{G93A}, en comparación a los ratones no transgénicos. A su vez se observa como la expresión nuclear de p16 se correlaciona con la disminución de la expresión nuclear de HMGB1, y no se observa una colocalización de ambos marcadores en núcleos. Las gráficas de la derecha muestran el análisis

cuantitativo de la expresión nuclear de HMGB1 y la colocalización de HMGB1 y p16. Para estudiar la pérdida de expresión de HMGB1 en la microglía en animales hSOD1^{G93A}, realizamos una co-marcación de HMGB1 con lba1. En la figura 12B se observa una disminución significativa de la expresión de HMGB1 en la microglía lba1+ en la médula espinal de los ratones hSOD1^{G93A} sintomáticos, en comparación con los controles, en donde casi totalidad de las células microgliales observadas presentan expresión de HMGB1. La gráfica de la derecha muestra el análisis cuantitativo del número de células que presentan ambos marcadores HMGB1 e lba1. Finalmente, en la figura 12C se muestran microfotografías de microscopía confocal representativas en donde se observa la morfología nuclear en aquellos núcleos de microglía que no presentaban expresión de HMGB1. En la microglía de animales hSOD1^{G93A} se observan núcleos con ampollas nucleares y escape de material genético, en comparación con los animales no transgénicos, en donde se observa expresión de HMGB1 en la microglía lba1+ y no se observan alteraciones significativas de la estructura nuclear.



Figura 12. Caracterización del fenotipo senescente nuclear en microglías de la médula espinal de ratones hSOD1^{G93A}. Estudio por microscopía confocal del asta ventral de la médula espinal de ratones hSOD1^{G93A} y ratones no transgénicos. **A)** Las imágenes de la izquierda muestran células marcadas para la proteína HMGB1 (en verde) y p16 (en rojo). A la derecha se muestran el análisis cuantitativo de la expresión de HMGB1 nuclear (panel de la izquierda) y la co-expresión de HMGB1 y p16 (panel de la derecha), los valores se expresan como media ± error

estándar de la media, *p<0.01 fue considerado significativo. **B**) Las imágenes de la izquierda muestran células marcadas con HMGB1 (verde) e Iba1 (rojo) de ratones no transgénicos (izquierda) y hSOD1^{G93A} (derecha). En el panel de la derecha se muestra la cuantificación para la expresión de HMGB1 nuclear en la microglía Iba1+, los valores se expresan como media ± error estándar de la media, *p<0.01 fue considerado significativo. **C**) Se observa imágenes representativas de la morfología nuclear en 3D para la inmunomarcación de HMGB1 (en verde), Iba1 (en rojo), y DAPI (azul) para ratones no transgénicos (fotos superiores) y ratones hSOD1^{G93A} (fotos inferiores). La flecha blanca muestra una ampolla del material genético que escapa a la estructura normal del núcleo.

6. Discusión.

En el presente trabajo, se puso a punto un protocolo novedoso con el fin de obtener células microgliales senescentes a partir de un cultivo de células BV2 de ratón. Por otra parte, se profundizó en la caracterización de la senescencia celular en un modelo murino de ELA, una enfermedad neurodegenerativa sin tratamiento. En particular, la segunda parte de este trabajo se centró en la caracterización de la microglía senescente en el contexto neuroinflamatorio característico de la médula espinal en esta enfermedad. Este trabajo estuvo apoyado por estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, en donde se reportó la emergencia de fenotipos senescentes de microglía y astrocitos en el ambiente que rodea a las motoneuronas en degeneración en un modelo murino de ELA(69-74, 85).

6.1 Generación del modelo de senescencia celular en BV2.

El objetivo de esta primera parte del trabajo, fue poner a punto un protocolo novedoso para generar un modelo de microglía senescente. Este modelo permite contar con una herramienta novedosa y accesible para estudiar con mayor profundidad los cambios a nivel de morfología y estructura que sufren las células microgliales en el proceso de transformación a células senescentes. Particularmente, en nuestro trabajo se logró llevar a cabo un procedimiento original para obtener células senescentes a partir de microglía BV2 luego del tratamiento con un compuesto alquilante del ADN, el TMZ. A partir de este novedoso tratamiento aplicado a células BV2 logramos obtener un 92% de células con elevada actividad β -gal sin presentar una muerte significativa. Estudios

previos han utilizado esta estrategia alquilante para inducir la senescencia de otros tipos celulares, lo que permite el estudio de los procesos moleculares y celulares que sufren las células en la transición al fenotipo senescente e incluso a un fenotipo secretor (86).

Para poner a punto este protocolo, se realizaron dos tipos de tratamientos, el primero incluía el tratamiento con 1 pulso de TMZ por 24 horas, y el segundo de 2 pulsos del mismo compuesto, pero durante 4 horas cada uno, con 24 horas de diferencia entre ambos. Ambos tratamientos se realizaron con diferentes concentraciones crecientes de TMZ. Consistentemente, los tratamientos con 1 pulso de TMZ durante 24 horas provocaron un mayor número de células con actividad β -gal, en iguales concentraciones de TMZ, indicando una mayor capacidad del tratamiento de 24 horas para inducir dicha característica de las células senescentes. Esto podría deberse a que la adquisición del fenotipo senescente en las células no solo depende de una señal inductora determinante. en este caso el daño del ADN, sino que también resulta clave que la señal sea sostenida en el tiempo (87). Esta señal sostenida, permitirá que ocurran un número suficiente de cambios transcripcionales en la célula, que genere un arresto del ciclo celular que sea irreversible y se refleje en un fenotipo senescente (27). Esto podría explicar la disminución de la actividad β -gal en el tratamiento con 2 pulsos, ya que, en ausencia de la señal, un porcentaje de las células podrían ser capaces de revertir el daño, y así alejarse de la vía de arresto celular, mientras que esto no ocurre con un tratamiento sostenido durante 24 horas.

Luego caracterizamos parcialmente el fenotipo senescente obtenido tras el tratamiento óptimo elegido en células BV2. Luego del tratamiento, se observaron diversos cambios morfológicos característicos de células senescentes. Se observó la emergencia de células multinucleadas así como también un aumento del tamaño celular. Esto podría explicarse a una disminución en la expresión de la lámina B1, una característica previamente reportada en las células senescentes (33), que debilitan la lámina nuclear y

facilitan una reorganización de la cromatina (31). En esta misma línea, también se observó en la microglía senescente, la presencia de aberraciones o alteraciones nucleares, evidenciadas por la expresión alterada del marcador nuclear, lámina B1. Diversos trabajos han descrito como las alteraciones en la forma nuclear en células senescentes son dependientes de lámina B1 (31), al tiempo que evidencian una relación entre la disminución en su expresión con una alteración en el perfil transcriptómico y la expresión génica (33). Finalmente, en las células BV2 senescentes, se observó una disminución en la proliferación, analizada por la pérdida de la expresión de Ki67, un marcador típico de las células proliferantes (88). El arresto proliferativo es el principal marcador de células BV2 expuestas a TMZ, consideramos que contamos con un buen modelo celular de glía senescente en cultivo. De todas maneras, se requerirán estudios de mayor profundidad para continuar caracterizando el fenotipo microglial adquirido por alquilación del ADN característica fundamental de la senescencia celular.

6.2 Caracterización del fenotipo microglial senescente en un contexto de ELA en modelo hSOD1^{G93A}.

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la muerte selectiva de las neuronas motoras, dando lugar a una progresiva parálisis y posterior muerte (67). En la fase sintomática de la ELA se constituye el microambiente celular neurodegenerativo formado por células gliales, en particular astrocitos y microglía, que se activan hacia un fenotipo inflamatorio con función aberrante y neurotóxica (67). El análisis de este ambiente degenerativo permitió postular mecanismos patogénicos que subyacen a la progresión y parálisis progresiva en la ELA (67). Uno de los factores de riesgo más importantes para esta enfermedad es la vejez, por lo que la emergencia de células senescentes y un potencial efecto tóxico de estas podría contribuir a la constitución de este microambiente celular neurodegenerativo y la patogenia de la enfermedad.

Recientemente nuestro grupo ha reportado la presencia de células senescentes en la médula espinal de ratas SOD1^{G93A}, observándose un aumento de células gliales p16 y p53 positivas, así como una disminución en la expresión de lámina B1 y también un aumento en factores proinflamatorios asociados a la senescencia, como IL-1β, IL-6, MMP1, en la microglía aislada de la médula espinal de ratas SOD1^{G93A} durante la fase sintomática de la enfermedad (72).

En este trabajo continuamos con la caracterización e identificación de las poblaciones senescentes en la médula espinal del modelo de ratón hSOD1^{G93A} en la fase sintomática de la enfermedad. Previamente, la senescencia en el contexto de la ELA había sido estudiada en el modelo de rata SOD1^{G93A} (72). Si bien se trata de un modelo murino transgénico similar, existen diferencias significativas en lo que respecta a los procesos inflamatorios y la progresión de la enfermedad (89). En este trabajo observamos el aumento del número de células con expresión de p16 en el asta ventral de la médula espinal en ratones hSOD1^{G93A}, respecto a los ratones WT. La activación de la vía p16 es esencial para la inducción de la senescencia en una variedad de tipos celulares (90). En particular, observamos que la mayoría de las células que expresan p16, se corresponden con células microgliales, caracterizadas por la doble marcación p16/lba1, este resultado sugiere que la emergencia de células senescentes en la médula espinal de los ratones SOD1^{G93A}, ocurre principalmente en esta tipo celular, y no tanto en otras poblaciones gliales como los astrocitos. Esto podría ocurrir como consecuencia de la gran activación inflamatoria que ocurre en la microglía durante la fase sintomática de la ELA (91). En condiciones inflamatorias, estas células gliales son las primeras en responder al daño, promoviendo y potenciando la inflamación sostenida en el tiempo (91). La sobreactivación crónica de la microglía podría provocar acumulación de daños en estas células, lo que podría llevar a la adquisición de un fenotipo senescente en el nicho neurodegenerativo (56, 92, 93). Sorprendentemente, pudimos observar que la microglía SOD1^{G93A} no

presenta marcación nuclear para p21. Esto podría significar que la vía de arresto celular que induce el fenotipo senescente en una subpoblación de células microgliales durante la fase sintomática avanzada en la ELA involucra a p16, y no a p21, diferente a lo que ocurre en astrocitos en un modelo de rata, donde se observa un aumento en la expresión de p21 nuclear (72).

Por otra parte, comenzamos a caracterizar la morfología nuclear de las células microgliales senescentes que expresan p16 nuclear. Se observaron morfologías nucleares no redondeadas, roturas de la envoltura nuclear con escape de material genético y diversas protuberancias. Éstas alteraciones de la morfología nuclear, con potencial escape del material genético al exterior del compartimento nuclear, podrían estar jugando un significativo rol pro-inflamatorio (94). La liberación de ADN al exterior puede ser reconocido como un patrón molecular asociado al daño (DAMP, por su sigla en inglés) por sensores de ADN presentes en microglias y astrocitos, y así generar un efecto proinflamatorio (95). Por otro lado, en aquellos núcleos donde no ocurre la rotura de la envoltura nuclear, pero sí una disminución en la expresión de lámina B1, dando lugar a un aumento en el tamaño nuclear o alteraciones en la morfología, podría darse una reorganización de la cromatina, potencialmente concordante con la adquisición de un perfil transcriptómico inflamatorio (31, 48). De esta manera, la emergencia de células senescentes podría contribuir a la adquisición de un fenotipo secretor. Estos fenotipos senescentes contribuyen a la constitución de un microambiente inflamatorio en diferentes patologías crónicas (15, 22). Además, la persistencia de señales que potencialmente promuevan la aparición de nuevas células senescentes, podrían generar un ciclo automantenido de inflamación y toxicidad para las motoneuronas en la médula espinal y así contribuir a la progresión de la ELA (96).

En este trabajo comenzamos a identificar la expresión de una novedosa proteína poco caracterizada en el contexto de la ELA, HMGB1. En condiciones normales, la

expresión nuclear de HMGB1 es abundante y actúa como una proteína de unión al ADN, estabilizando a los nucleosomas y permitiendo una flexibilidad de los mismos, facilitando la transcripción génica (97). Pero, por otro lado, HMGB1 puede considerarse un marcador prominente del fenotipo secretor senescente, SASP, desempeñando un rol significativo en procesos inflamatorios (51, 98). Así es que HMGB1 puede ser exportada fuera del núcleo, y en su forma acetilada, actuar como una proteína con propiedades pro-inflamatorias (54). Esta proteína puede ser secretada por astrocitos, microglía, y neuronas, y su actividad promueve la neuroinflamación y la apoptosis neuronal cuando es acetilada y secretada (84, 99, 100). En este sentido, un trabajo de Gaikward y colaboradores, muestra que en pacientes con la enfermedad de Alzheimer, la secreción de HMGB1 en células senescentes es capaz de inducir la senescencia de astrocitos vecinos y que la inhibición de la secreción de la esta proteína, logra disminuir tanto los niveles de expresión nuclear de p16 en astrocitos, como la producción de factores SASP (92).

En nuestro trabajo observamos que existe una correlación entre el aumento en la expresión nuclear de la proteína p16, y la pérdida de expresión nuclear de HMGB1. En particular, la mayoría de las microglias en la médula espinal sintomática que expresan p16, no mostraron expresión HMGB1 en el núcleo.La pérdida de la proteína HMGB1 en las microglias senescentes p16+, nos brinda una primera aproximación al potencial fenotipo SASP que estas células podrían estar adquiriendo en el microambiente celular neurodegenerativo en la médula espinal de los ratones SOD1^{G93A}. En este sentido la pérdida nuclear podría correlacionarse con un aumento en la expresión de la proteína fuera del compartimiento nuclear, con la posibilidad de que la misma sea finalmente secretada (54). Una vez secretada, HMGB1 podría contribuir a la generación de nuevas células senescentes y a la con la constitución del microambiente neuroinflamatorio mediante su interacción con los receptores RAGE y TLRs en células vecinas, receptores clave en la regulación de la inflamación (84).

Por último también observamos como la pérdida de la expresión nuclear de HMGB1 se correlaciona con la aparición de una morfología nuclear aberrante caracterizada por la presencia de invaginaciones, ampollas y roturas nucleares, lo que podría significar que la senescencia de estas células afecta la morfología nuclear y ésta podría llevar a la reorganización de la cromatina, y un cambio en el perfil transcripcional, siendo HMGB1 potencialmente un gen afectado.

7. Conclusiones.

En este trabajo identificamos la capacidad de TMZ de actuar como inductor de la senescencia en un modelo de microglía BV2, asimismo obtuvimos un protocolo de inducción para la obtención de un 90% de células con actividad β -galactosidasa, arresto celular y adquisición de un fenotipo morfológico característico de la senescencia, con invaginaciones, ampollas y rupturas de la lámina nuclear.

Por otra parte observamos que existe un aumento en un modelo de ELA de ratón de células con características clásicas senescentes como el marcador p16 y p21, y que este aumento está asociado a la adquisición de una morfología nuclear alterada característica en la senescencia celular. Además identificamos una subpoblación de estas células como microglias y observamos que gran parte de la microglía perdía la expresión nuclear de HMGB1 en la fase final de la enfermedad, a la vez que la morfología nuclear de éstas se ve alterada. Esta pérdida de HMGB1 podría coincidir con la adquisición de un fenotipo SASP con potencial inflamatorio.

8. Perspectivas.

Los tratamientos destinados a la eliminación de las células senescentes con drogas senolíticas han cobrado relevancia, en tanto buscan revertir o detener los efectos tóxicos de las mismas, buscando reducir el componente inflamatorio crónico que resulta tóxico en

los tejidos donde se acumulan. Los trabajos de Xu y colaboradores han realizado tratamientos con una combinación de drogas (Dasatinib+Quercetina) que actúan sinérgicamente para matar específicamente células senescentes de progenitores de células lipídicas, y células endoteliales y mesenquimales derivadas de la médula ósea de ratón (101). Complementariamente otro trabajo de Baker y colaboradores utiliza modelos capaces de eliminar células que expresan p16 ante la acción de una droga, demuestran que la eliminación de estas células retarda la aparición de los fenotipos patológicos en tejidos clásicos donde estos se observan y atenúa la progresión de enfermedades relacionadas a ellos (102).

En ese sentido, futuros trabajos pueden valerse de la obtención de este modelo celular para el screening de posibles drogas senolíticas, que permitan la eliminación de células senescentes diferencialmente en particular en el sistema nervioso central. Esto contribuirá a la generación de nuevos tratamientos senolíticos para enfermedades neurodegenerativas.

Por otra parte es importante continuar profundizando en la caracterización de la senescencia celular de ratón en un modelo de ELA:

- Estudiando las características senescentes en otros tipos celulares: astrocitos, neuronas, linfocitos, otras células inmunes.
- Ahondar en la caracterización del fenotipo senescente microglial, ampliando el estudio de los marcadores SASP de la microglía: IL-6, IL-8, MMP 1, Lámina B1.
- Estudiar otros tejidos involucrados en la ELA, como pueden ser las fibras musculares que son inervadas por las neuronas motoras cuya muerte ocurre.
- Profundizar en la patología nuclear asociada a la senescencia en la ELA.

Referencias:

1. Harman D. The aging process. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1981 Nov;78(11):7124-8. PubMed PMID: 6947277. Pubmed Central PMCID: 349208.

2. Harman D. Aging: overview. Annals of the New York Academy of Sciences. 2001 Apr;928:1-21. PubMed PMID: 11795501.

3. Moskalev A, Guvatova Z, Lopes IA, Beckett CW, Kennedy BK, De Magalhaes JP, et al. Targeting aging mechanisms: pharmacological perspectives. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2022 Apr;33(4):266-80. PubMed PMID: 35183431.

4. Nielsen JL, Bakula D, Scheibye-Knudsen M. Clinical Trials Targeting Aging. Frontiers in aging. 2022;3:820215. PubMed PMID: 35821843. Pubmed Central PMCID: 9261384.

5. Robert L, Labat-Robert J, Robert AM. Genetic, epigenetic and posttranslational mechanisms of aging. Biogerontology. 2010 Aug;11(4):387-99. PubMed PMID: 20157779.

6. Mitchell SJ, Scheibye-Knudsen M, Longo DL, de Cabo R. Animal models of aging research: implications for human aging and age-related diseases. Annual review of animal biosciences. 2015;3:283-303. PubMed PMID: 25689319.

7. Klass MR. A method for the isolation of longevity mutants in the nematode Caenorhabditis elegans and initial results. Mechanisms of ageing and development. 1983 Jul-Aug;22(3-4):279-86. PubMed PMID: 6632998.

8. Klass M, Nguyen PN, Dechavigny A. Age-correlated changes in the DNA template in the nematode Caenorhabditis elegans. Mechanisms of ageing and development. 1983 Jul-Aug;22(3-4):253-63. PubMed PMID: 6355679.

9. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. Cell. 2013 Jun 6;153(6):1194-217. PubMed PMID: 23746838. Pubmed Central PMCID: 3836174.

10. Gensler HL, Bernstein H. DNA damage as the primary cause of aging. The Quarterly review of biology. 1981 Sep;56(3):279-303. PubMed PMID: 7031747.

11. Freitas AA, de Magalhaes JP. A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. Mutation research. 2011 Jul-Oct;728(1-2):12-22. PubMed PMID: 21600302.

12. Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. Cancer research. 2001 Mar 1;61(5):1957-63. PubMed PMID: 11280752.

13. Mikhelson VM, Gamaley IA. Telomere shortening is a sole mechanism of aging in mammals. Current aging science. 2012 Dec;5(3):203-8. PubMed PMID: 23387887.

14. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. Nature reviews Molecular cell biology. 2000 Oct;1(1):72-6. PubMed PMID: 11413492.

15. Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. Aging cell. 2009 Jun;8(3):311-23. PubMed PMID: 19627270.

16. Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, Laberge RM, Marquess D, Dananberg J, et al. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. Nature reviews Drug discovery. 2017 Oct;16(10):718-35. PubMed PMID: 28729727. Pubmed Central PMCID: 5942225.

17. Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. Nature. 2016 Nov 10;539(7628):180-6. PubMed PMID: 27830812. Pubmed Central PMCID: 5172605.

18. Baker DJ, Petersen RC. Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives. The Journal of clinical investigation. 2018 Apr 2;128(4):1208-16. PubMed PMID: 29457783. Pubmed Central PMCID: 5873891.

19. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nature reviews Molecular cell biology. 2007 Sep;8(9):729-40. PubMed PMID: 17667954.

20. Campisi J, Kapahi P, Lithgow GJ, Melov S, Newman JC, Verdin E. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. Nature. 2019 Jul;571(7764):183-92. PubMed PMID: 31292558. Pubmed Central PMCID: 7205183.

21. Khosla S, Farr JN, Tchkonia T, Kirkland JL. The role of cellular senescence in ageing and endocrine disease. Nature reviews Endocrinology. 2020 May;16(5):263-75. PubMed PMID: 32161396. Pubmed Central PMCID: 7227781.

22. van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. Nature. 2014 May 22;509(7501):439-46. PubMed PMID: 24848057. Pubmed Central PMCID: 4214092.

23. Burd CE, Sorrentino JA, Clark KS, Darr DB, Krishnamurthy J, Deal AM, et al. Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16(INK4a)-luciferase model. Cell. 2013 Jan 17;152(1-2):340-51. PubMed PMID: 23332765. Pubmed Central PMCID: 3718011.

Fumagalli M, Rossiello F, Clerici M, Barozzi S, Cittaro D, Kaplunov JM, et al. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. Nature cell biology. 2012 Mar 18;14(4):355-65. PubMed PMID: 22426077. Pubmed Central PMCID: 3717580.
Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. 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. 1995 Sep 26;92(20):9363-7. PubMed PMID: 7568133. Pubmed Central PMCID: 40985.

26. Meng A, Wang Y, Van Zant G, Zhou D. Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. Cancer research. 2003 Sep 1;63(17):5414-9. PubMed PMID: 14500376.

27. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. The EMBO journal. 2003 Aug 15;22(16):4212-22. PubMed PMID: 12912919. Pubmed Central PMCID: 175806.

28. Evans MC, Couch Y, Sibson N, Turner MR. Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis. Molecular and cellular neurosciences. 2013 Mar;53:34-41. PubMed PMID: 23110760.

29. Evan GI, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: hot or what? Current opinion in genetics & development. 2009 Feb;19(1):25-31. PubMed PMID: 19181515.

30. Basisty N, Kale A, Jeon OH, Kuehnemann C, Payne T, Rao C, et al. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. PLoS biology. 2020 Jan;18(1):e3000599. PubMed PMID: 31945054. Pubmed Central PMCID: 6964821 following competing interests: JC is a founder and shareholder of Unity Biotechnology, which develops senolytic drugs. All other authors have declared no competing interests.

31. Pathak RU, Soujanya M, Mishra RK. Deterioration of nuclear morphology and architecture: A hallmark of senescence and aging. Ageing research reviews. 2021 May;67:101264. PubMed PMID: 33540043.

32. Shimi T, Butin-Israeli V, Adam SA, Hamanaka RB, Goldman AE, Lucas CA, et al. The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. Genes & development. 2011 Dec 15;25(24):2579-93. PubMed PMID: 22155925. Pubmed Central PMCID: 3248680.

33. Freund A, Laberge RM, Demaria M, Campisi J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. Molecular biology of the cell. 2012 Jun;23(11):2066-75. PubMed PMID: 22496421. Pubmed Central PMCID: 3364172.

34. Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. Genes & development. 1998 Oct 1;12(19):3008-19. PubMed PMID: 9765203. Pubmed Central PMCID: 317198.

35. Li T, Kon N, Jiang L, Tan M, Ludwig T, Zhao Y, et al. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. Cell. 2012 Jun 8;149(6):1269-83. PubMed PMID: 22682249. Pubmed Central PMCID: 3688046.

36. Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG, Torres C, Tresini M. Replicative senescence: a critical review. Mechanisms of ageing and development. 2004 Oct-Nov;125(10-11):827-48. PubMed PMID: 15541776.

37. d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. Nature reviews Cancer. 2008 Jul;8(7):512-22. PubMed PMID: 18574463.

38. Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. Cell. 1996 Apr 5;85(1):27-37. PubMed PMID: 8620534.

39. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. Nature. 2006 Nov 30;444(7119):633-7. PubMed PMID: 17136093.

40. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. The Journal of cell biology. 2018 Jan 2;217(1):65-77. PubMed PMID: 29114066. Pubmed Central PMCID: 5748990.

41. Mounkes LC, Kozlov S, Hernandez L, Sullivan T, Stewart CL. A progeroid syndrome in mice is caused by defects in A-type lamins. Nature. 2003 May 15;423(6937):298-301. PubMed PMID: 12748643.

42. Jeon OH, Kim C, Laberge RM, Demaria M, Rathod S, Vasserot AP, et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. Nature medicine. 2017 Jun;23(6):775-81. PubMed PMID: 28436958. Pubmed Central PMCID: 5785239.

43. Baker DJ, Perez-Terzic C, Jin F, Pitel KS, Niederlander NJ, Jeganathan K, et al. Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. Nature cell biology. 2008 Jul;10(7):825-36. PubMed PMID: 18516091. Pubmed Central PMCID: 2594014.

44. Hanks S, Coleman K, Reid S, Plaja A, Firth H, Fitzpatrick D, et al. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. Nature genetics. 2004 Nov;36(11):1159-61. PubMed PMID: 15475955.

45. Childs BG, Baker DJ, Wijshake T, Conover CA, Campisi J, van Deursen JM. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. Science. 2016 Oct 28;354(6311):472-7. PubMed PMID: 27789842. Pubmed Central PMCID: 5112585.

46. Varela I, Cadinanos J, Pendas AM, Gutierrez-Fernandez A, Folgueras AR, Sanchez LM, et al. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. Nature. 2005 Sep 22;437(7058):564-8. PubMed PMID: 16079796.

47. Osorio FG, Barcena C, Soria-Valles C, Ramsay AJ, de Carlos F, Cobo J, et al. Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF-kappaB activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. Genes & development. 2012 Oct 15;26(20):2311-24. PubMed PMID: 23019125. Pubmed Central PMCID: 3475803.

48. Lukasova E, Kovar ik A, Bac ikova A, Falk M, Kozubek S. Loss of lamin B receptor is necessary to induce cellular senescence. The Biochemical journal. 2017 Jan 15;474(2):281-300. PubMed PMID: 27760841.

49. Lukasova E, Kovarik A, Kozubek S. Consequences of Lamin B1 and Lamin B Receptor Downregulation in Senescence. Cells. 2018 Feb 6;7(2). PubMed PMID: 29415520. Pubmed Central PMCID: 5850099.

50. Bianchi ME, Manfredi AA. Immunology. Dangers in and out. Science. 2009 Mar 27;323(5922):1683-4. PubMed PMID: 19325105.

51. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. American journal of physiology Cell physiology. 2006 Mar;290(3):C917-24. PubMed PMID: 16267105.

52. Ibrahim ZA, Armour CL, Phipps S, Sukkar MB. RAGE and TLRs: relatives, friends or neighbours? Molecular immunology. 2013 Dec;56(4):739-44. PubMed PMID: 23954397.

53. Kim JB, Sig Choi J, Yu YM, Nam K, Piao CS, Kim SW, et al. HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2006 Jun 14;26(24):6413-21. PubMed PMID: 16775128. Pubmed Central PMCID: 6674036.

54. Davalos AR, Kawahara M, Malhotra GK, Schaum N, Huang J, Ved U, et al. p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. The Journal of cell biology. 2013 May 13;201(4):613-29. PubMed PMID: 23649808. Pubmed Central PMCID: 3653366.

55. Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. Nature reviews Neurology. 2019 Oct;15(10):565-81. PubMed PMID: 31501588.

56. Olivieri F, Prattichizzo F, Grillari J, Balistreri CR. Cellular Senescence and Inflammaging in Age-Related Diseases. Mediators of inflammation. 2018;2018:9076485. PubMed PMID: 29849499. Pubmed Central PMCID: 5932453.

57. Saez-Atienzar S, Masliah E. Cellular senescence and Alzheimer disease: the egg and the chicken scenario. Nature reviews Neuroscience. 2020 Aug;21(8):433-44. PubMed PMID: 32601397.

58. Bhat R, Crowe EP, Bitto A, Moh M, Katsetos CD, Garcia FU, et al. Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. PloS one. 2012;7(9):e45069. PubMed PMID: 22984612. Pubmed Central PMCID: 3440417.

59. Mombach JC, Vendrusculo B, Bugs CA. A Model for p38MAPK-Induced Astrocyte Senescence. PloS one. 2015;10(5):e0125217. PubMed PMID: 25954815. Pubmed Central PMCID: 4425668.

60. Shaerzadeh F, Phan L, Miller D, Dacquel M, Hachmeister W, Hansen C, et al. Microglia senescence occurs in both substantia nigra and ventral tegmental area. Glia. 2020 Nov;68(11):2228-45. PubMed PMID: 32275335. Pubmed Central PMCID: 8356201.

61. Streit WJ. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? Trends in neurosciences. 2006 Sep;29(9):506-10. PubMed PMID: 16859761.

62. Vazquez-Villasenor I, Garwood CJ, Heath PR, Simpson JE, Ince PG, Wharton SB. Expression of p16 and p21 in the frontal association cortex of ALS/MND brains suggests neuronal cell cycle dysregulation and astrocyte senescence in early stages of the disease. Neuropathology and applied neurobiology. 2020 Feb;46(2):171-85. PubMed PMID: 31077599. Pubmed Central PMCID: 7217199.

63. Crowe EP, Tuzer F, Gregory BD, Donahue G, Gosai SJ, Cohen J, et al. Changes in the Transcriptome of Human Astrocytes Accompanying Oxidative Stress-Induced Senescence. Frontiers in aging neuroscience. 2016;8:208. PubMed PMID: 27630559. Pubmed Central PMCID: 5005348.

64. Salminen A, Ojala J, Kaarniranta K, Haapasalo A, Hiltunen M, Soininen H. Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. The European journal of neuroscience. 2011 Jul;34(1):3-11. PubMed PMID: 21649759.

65. Yu HM, Zhao YM, Luo XG, Feng Y, Ren Y, Shang H, et al. Repeated lipopolysaccharide stimulation induces cellular senescence in BV2 cells. Neuroimmunomodulation. 2012;19(2):131-6. PubMed PMID: 22248729.

66. Goetz CG. Amyotrophic lateral sclerosis: early contributions of Jean-Martin Charcot. Muscle & nerve. 2000 Mar;23(3):336-43. PubMed PMID: 10679709.

67. Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. The New England journal of medicine. 2017 Jul 13;377(2):162-72. PubMed PMID: 28700839.

68. Gurney ME. Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. The New England journal of medicine. 1994 Dec 22;331(25):1721-2. PubMed PMID: 7832899.

69. Trias E, Diaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Isasi E, Drechsel DA, Lopez N, et al. Phenotypic transition of microglia into astrocyte-like cells associated with disease onset in a model of inherited ALS. Frontiers in cellular neuroscience. 2013;7:274. PubMed PMID: 24399933. Pubmed Central PMCID: 3871969.

70. Trias E, Ibarburu S, Barreto-Nunez R, Varela V, Moura IC, Dubreuil P, et al. Evidence for mast cells contributing to neuromuscular pathology in an inherited model of ALS. JCI insight. 2017 Oct 19;2(20). PubMed PMID: 29046475. Pubmed Central PMCID: 5846907.

71. Trias E, King PH, Si Y, Kwon Y, Varela V, Ibarburu S, et al. Mast cells and neutrophils mediate peripheral motor pathway degeneration in ALS. JCI insight. 2018 Oct 4;3(19). PubMed PMID: 30282815. Pubmed Central PMCID: 6237484.

72. Trias E, Beilby PR, Kovacs M, Ibarburu S, Varela V, Barreto-Nunez R, et al. Emergence of Microglia Bearing Senescence Markers During Paralysis Progression in a Rat Model of Inherited ALS. Frontiers in aging neuroscience. 2019;11:42. PubMed PMID: 30873018. Pubmed Central PMCID: 6403180.

73. Trias E, Kovacs M, King PH, Si Y, Kwon Y, Varela V, et al. Schwann cells orchestrate peripheral nerve inflammation through the expression of CSF1, IL-34, and SCF in amyotrophic lateral sclerosis. Glia. 2020 Jun;68(6):1165-81. PubMed PMID: 31859421. Pubmed Central PMCID: 7269115.

74. Kovacs M, Alamon C, Maciel C, Varela V, Ibarburu S, Tarrago L, et al. The pathogenic role of c-Kit+ mast cells in the spinal motor neuron-vascular niche in ALS. Acta neuropathologica communications. 2021 Aug 13;9(1):136. PubMed PMID: 34389060. Pubmed Central PMCID: 8361844.

75. Das MM, Svendsen CN. Astrocytes show reduced support of motor neurons with aging that is accelerated in a rodent model of ALS. Neurobiology of aging. 2015 Feb;36(2):1130-9. PubMed PMID: 25443290.

76. Martin LJ. p53 is abnormally elevated and active in the CNS of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiology of disease. 2000 Dec;7(6 Pt B):613-22. PubMed PMID: 11114260.

77. Henn A, Lund S, Hedtjarn M, Schrattenholz A, Porzgen P, Leist M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. Altex. 2009;26(2):83-94. PubMed PMID: 19565166.

78. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature. 2017 Jan 26;541(7638):481-7. PubMed PMID: 28099414. Pubmed Central PMCID: 5404890.

79. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. Critical reviews in biotechnology. 2017 Mar;37(2):163-76. PubMed PMID: 26767547.

80. Wilson T. Resolution and optical sectioning in the confocal microscope. Journal of microscopy. 2011 Nov;244(2):113-21. PubMed PMID: 22004276.

81. Barkauskaite V, Ek M, Popovic K, Harris HE, Wahren-Herlenius M, Nyberg F. Translocation of the novel cytokine HMGB1 to the cytoplasm and extracellular space coincides with the peak of clinical activity in experimentally UV-induced lesions of cutaneous lupus erythematosus. Lupus. 2007;16(10):794-802. PubMed PMID: 17895302.

82. Ahmed Z, Shaw G, Sharma VP, Yang C, McGowan E, Dickson DW. Actin-binding proteins coronin-1a and IBA-1 are effective microglial markers for immunohistochemistry. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 2007 Jul;55(7):687-700. PubMed PMID: 17341475.

83. Feng X, Hao J, Liu Q, Yang L, Lv X, Zhang Y, et al. HMGB1 mediates IFN-gamma-induced cell proliferation in MMC cells through regulation of cyclin D1/CDK4/p16 pathway. Journal of cellular biochemistry. 2012 Jun;113(6):2009-19. PubMed PMID: 22275109.

84. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. Journal of leukocyte biology. 2005 Jul;78(1):1-8. PubMed PMID: 15734795.

85. Diaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragnolini A, Martinez-Palma L, Cassina P, et al. Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011 Nov 1;108(44):18126-31. PubMed PMID: 22010221. Pubmed Central PMCID: 3207668.

86. Martinez J, Tarallo D, Martinez-Palma L, Victoria S, Bresque M, Rodriguez-Bottero S, et al. Mitofusins modulate the increase in mitochondrial length, bioenergetics and secretory phenotype in therapy-induced senescent melanoma cells. The Biochemical journal. 2019 Sep 10;476(17):2463-86. PubMed PMID: 31431479. Pubmed Central PMCID: 6735661.

87. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. Nature. 2005 Aug 4;436(7051):725-30. PubMed PMID: 16079851. Pubmed Central PMCID: 1939938.

88. Heatley MK. Ki67 protein: the immaculate deception? Histopathology. 2002 May;40(5):483. PubMed PMID: 12010370.

89. Pioro EP, Mitsumoto H. Animal models of ALS. Clinical neuroscience. 1995;3(6):375-85. PubMed PMID: 9021259.

90. Prieur A, Besnard E, Babled A, Lemaitre JM. p53 and p16(INK4A) independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression. Nature communications. 2011 Sep 13;2:473. PubMed PMID: 21915115.

91. Brites D, Vaz AR. Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity. Frontiers in cellular neuroscience. 2014;8:117. PubMed PMID: 24904276. Pubmed Central PMCID: 4033073.

92. Gaikwad S, Puangmalai N, Bittar A, Montalbano M, Garcia S, McAllen S, et al. Tau oligomer induced HMGB1 release contributes to cellular senescence and neuropathology linked to Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. Cell reports. 2021 Jul 20;36(3):109419. PubMed PMID: 34289368. Pubmed Central PMCID: 8341760.

93. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends in neurosciences. 1996 Aug;19(8):312-8. PubMed PMID: 8843599.

94. Cox DJ, Field RH, Williams DG, Baran M, Bowie AG, Cunningham C, et al. DNA sensors are expressed in astrocytes and microglia in vitro and are upregulated during gliosis in neurodegenerative disease. Glia. 2015 May;63(5):812-25. PubMed PMID: 25627810. Pubmed Central PMCID: 4657478.

95. Daniel C, Leppkes M, Munoz LE, Schley G, Schett G, Herrmann M. Extracellular DNA traps in inflammation, injury and healing. Nature reviews Nephrology. 2019 Sep;15(9):559-75. PubMed PMID: 31213698.

96. Nelson G, Wordsworth J, Wang C, Jurk D, Lawless C, Martin-Ruiz C, et al. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. Aging cell. 2012 Apr;11(2):345-9. PubMed PMID: 22321662. Pubmed Central PMCID: 3488292.

97. Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. European journal of biochemistry. 1973 Sep 21;38(1):14-9. PubMed PMID: 4774120.

98. Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. Journal of internal medicine. 2004 Mar;255(3):320-31. PubMed PMID: 14871456.

99. Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, et al. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. The EMBO journal. 2003 Oct 15;22(20):5551-60. PubMed PMID: 14532127. Pubmed Central PMCID: 213771.

100. Thomas JO, Stott K. H1 and HMGB1: modulators of chromatin structure. Biochemical Society transactions. 2012 Apr;40(2):341-6. PubMed PMID: 22435809.

101. Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, Weigand BM, Palmer AK, Weivoda MM, et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. Nature medicine. 2018 Aug;24(8):1246-56. PubMed PMID: 29988130. Pubmed Central PMCID: 6082705.

102. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. Nature. 2011 Nov 2;479(7372):232-6. PubMed PMID: 22048312. Pubmed Central PMCID: 3468323.