



ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
DE LA USC

Aitor
Picos Martínez

Tesis doctoral

Efectos longitudinales del tratamiento
intermitente con rapamicina sobre la
senescencia replicativa de células
endoteliales humanas HUVEC

Santiago de Compostela, 2025

TESIS DOCTORAL

**EFFECTOS LONGITUDINALES DEL
TRATAMIENTO INTERMITENTE CON
RAPAMICINA SOBRE LA
SENESCENCIA REPLICATIVA DE
CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS
HUVEC**

Autor

Aitor Picos Martínez

Directores: María Dolores Viña Castelao / Manuel Campos Toimil

Tutora: María Dolores Viña Castelao

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS

FINANCIACIÓN Y CONFLICTOS DE INTERÉS

Esta tesis doctoral ha sido financiada por los siguientes proyectos:

- Agencia Estatal de Innovación. “Proyectos de I+D+i–Generación de Conocimiento 2020”. Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-119178-I00).
- Axencia Galega de Innovación. “Consolidación e estruturación de unidades de investigación competitivas e outras acción de fomento 2020-2022”. Xunta de Galicia (ED431B 2020/26. Grupo de investigación GPC GI-1862).
- Axencia Galega de Innovación. “Consolidación e estruturación de unidades de investigación competitivas e outras acción de fomento 2023-2026”. Xunta de Galicia (EDT431C 2023/22. Grupo de investigación GPC GI-1862).
- “V Contratos de Iniciación a la Investigación” (PG062 06/2021).



AGRADECIMIENTOS

“No todo aquel que vaga está perdido”.

J. R.R. Tolkien

Empecé y terminé esta aventura sin conocer el camino. No sabía entonces qué me esperaba, y tampoco lo sé ahora. Sospecho que siempre será así, y que gran parte de la gracia de todo esto que es vivir consiste en descubrir qué viene después.

No sé qué viene después, y creo que tampoco quiero saberlo. Pero agradezco lo que ha sido, que es mucho, y a todas las personas que lo han hecho posible.

Gracias a mis directores de tesis: gracias por las oportunidades, por cada una de ellas, por la confianza y por el apoyo, por el consejo, por la curiosidad, y por estar siempre ahí.

A mis compañeras de laboratorio, que son mis amigas: gracias por el tiempo compartido, por el ejemplo, por la complicidad, y por el café.

A toda mi familia, la de sangre y la que se elige: gracias por ser raíces y pilares, por caminar conmigo, correr conmigo, y divagar hasta el infinito. Por explorar juntos. Por dejarme ser.

A mis compañeros y profesores del ciclo: gracias por un año que recordar.

A mis compañeras de registros: gracias por abrirme un nuevo camino.

Gracias a María. Siempre.

Gracias al camino, por hacer que me pierda. Por todas y cada una de las personas que encontré en él.

“Sólo el que se atreve a perderse encuentra nuevos caminos”.

Jorge Luis Borges

A la pasión

Resumen	1
Resumo	2
Abstract	3
Abreviaturas	5
1. Introducción	13
1.1. Envejecimiento	13
1.1.1. Perspectiva demográfica y socioeconómica	13
1.1.2. Perspectiva biológica	15
1.1.3. Impacto de las “claves del envejecimiento”	17
1.1.3.1. Niveles jerárquicos de las claves del envejecimiento	20
1.1.3.2. Críticas al modelo de las claves del envejecimiento.....	21
1.1.3.3. Contribuciones y valor heurístico del modelo	22
1.2. Senescencia y envejecimiento	23
1.2.1. Definición y características	23
1.2.2. Senescencia replicativa y otros tipos de senescencia.....	24
1.3. Senescencia endotelial	29
1.3.1. Papel del endotelio en la homeostasis vascular	29
1.3.2. Relación entre senescencia y disfunción endotelial	30
1.4. Senoterapias	34
1.4.1. Senolíticos	34
1.4.2. Senomorfos	35
1.5. mTOR y envejecimiento	36
1.5.1. Descubrimiento de mTOR	36
1.5.2. Ruta de mTOR.....	36
1.5.2.1. Reguladores de mTOR	37
1.5.2.2. Efectores de mTOR	38
1.5.3. Modulación de mTOR, envejecimiento y senescencia	41
1.5.3.1. Modulación genética.....	41
1.5.3.2. Modulación farmacológica	42
1.5.4. Perspectivas futuras: mTOR como diana en el envejecimiento.....	43
1.5.4.1. Inhibición de mTOR frente a enfermedades relacionadas con la edad.....	43
1.5.4.2. Desafíos y consideraciones para la traslación clínica	45
1.6. Limitaciones actuales en el tratamiento del envejecimiento	46
1.6.1. Falta de evidencia clínica en la modulación del envejecimiento	46
1.6.2. Falta de biomarcadores para ensayos clínicos en envejecimiento	47
1.6.3. Avances en modelos <i>in vitro</i> para el estudio del envejecimiento	49
2. Justificación e hipótesis	53
3. Objetivos	57

3.1.	Objetivos	57
3.1.1.	Objetivo general	57
3.1.2.	Objetivos específicos	57
4.	Material y métodos	61
4.1.	Materiales	61
4.2.	Cultivo celular.....	65
4.2.1.	Cultivo de células HUVEC.....	65
4.2.2.	Diseño experimental.....	65
4.2.3.	Cultivo de células THP-1, MRC-5 y HUV-EC-C	66
4.3.	Western blot.....	67
4.3.1.	Extracción de proteínas	67
4.3.2.	Cuantificación de proteínas	68
4.3.3.	Separación por electroforesis en gel SDS-PAGE.....	68
4.3.4.	Transferencia a membranas de PVDF, bloqueo e incubación con anticuerpos.....	68
4.3.5.	Revelado y análisis densitométrico	69
4.4.	RT-PCR y RT-qPCR	69
4.4.1.	Extracción de ARN	69
4.4.2.	Síntesis de ADNc	70
4.4.3.	PCR semi-cuantitativa en gel de agarosa	70
4.4.4.	RT-qPCR	71
4.5.	Citometría de flujo.....	72
4.5.1.	Análisis del ciclo celular	72
4.5.2.	Producción de ERO y NO	72
4.6.	Ensayo de proliferación con MTT	73
4.7.	Actividad β-galactosidasa asociada a senescencia.....	73
4.8.	Inmunocitoquímica.....	74
4.9.	Ensayo de migración mediante técnica de raspado	74
4.10.	Ensayo de angiogénesis <i>in vitro</i>	75
4.11.	Determinación del SASP mediante array de membrana	75
4.12.	Análisis estadístico y representación de los resultados.....	75
5.	Resultados	79
5.1.	Efectos del tratamiento semanal con rapamicina sobre la señalización intracelular.....	79
5.1.1.	Efecto de la rapamicina sobre las vías PI3K/AKT/mTOR, eNOS y MAPK	79
5.1.2.	Efecto de la rapamicina sobre marcadores de autofagia.....	81
5.2.	Efecto de la rapamicina en la duración de los cultivos de células HUVEC	82
5.2.1.	Efecto de la rapamicina en el PDL máximo alcanzado por las células HUVEC en cultivo.....	82
5.2.2.	PDL acumulado en cada pase experimental	83
5.3.	Proliferación, ciclo celular y marcadores de senescencia	84
5.3.1.	Efecto de los pases y la rapamicina sobre la proliferación.....	84
5.3.2.	Impacto de los pases y la rapamicina en la distribución del ciclo celular	85
5.3.3.	Efecto de los pases y la rapamicina en la actividad de SA- β -Gal.....	87

5.3.4.	Efecto de los pases y la rapamicina sobre los inhibidores de cinasas dependientes de ciclina p16 ^{INK4a} y p21 ^{Cip1}	89
5.4.	Identidad celular y función endotelial	91
5.4.1.	Confirmación de la identidad endotelial por RT-PCR.....	91
5.4.2.	Efecto de los pases y la rapamicina en la expresión proteica de VE-cadherina y α -SMA	93
5.4.3.	Efecto de los pases y la rapamicina sobre la capacidad de migración	97
5.4.4.	Efecto de los pases y la rapamicina sobre la formación de estructuras vasculares.....	99
5.5.	5.5. Estrés oxidativo y SASP	99
5.5.1.	Efecto de los pases y la rapamicina sobre los niveles de ERO y NO.....	100
5.5.2.	Efecto de los pases y la rapamicina sobre la expresión de moléculas de adhesión	102
5.5.3.	Efecto de los pases y la rapamicina sobre la expresión de citocinas proinflamatorias.....	103
5.5.4.	Efecto de los pases y la rapamicina sobre el perfil de secreción de citocinas	104
5.6.	Efectos del SASP sobre monocitos THP-1	106
5.6.1.	Efecto del MC de células HUVEC sobre la producción de ERO en monocitos THP-1	106
5.6.2.	Efecto del MC de células HUVEC sobre la vía de JAK2/STAT3 y la expresión de moléculas de adhesión en monocitos THP-1	107
6.	Discusión	111
6.1.	Discusión	111
6.1.1.	Inhibición de las vías de mTOR por el tratamiento intermitente con rapamicina	112
6.1.2.	Inhibición de mTOR y autofagia en el tratamiento intermitente con rapamicina	113
6.1.3.	Efecto antisenescente del tratamiento intermitente con rapamicina	114
6.1.4.	Conservación de la identidad y función endotelial	118
6.1.5.	Efecto del número de pases y del tratamiento con rapamicina sobre el equilibrio redox y el SASP	119
6.1.6.	Efectos del SASP de HUVEC sobre monocitos THP-1	122
6.2.	Limitaciones del estudio.....	124
6.3.	Perspectivas futuras.....	124
7.	Conclusiones	129
8.	Bibliografía.....	133
9.	Tabla de figuras	163
Anexo I	167

Resumen

El envejecimiento constituye el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y otras patologías crónicas no transmisibles. La senescencia celular, entendida como una detención irreversible del ciclo celular acompañada de un fenotipo secretor proinflamatorio, desempeña un papel central en el deterioro tisular asociado a la edad. En el contexto vascular, la senescencia endotelial compromete la homeostasis, la función de barrera y la capacidad angiogénica, contribuyendo a la disfunción endotelial. La vía mTOR, reguladora clave del crecimiento y el metabolismo celular, se ha implicado en la progresión del envejecimiento y la senescencia celular, siendo la rapamicina uno de los compuestos con mayor potencial antienvjecimiento descritos. No obstante, su administración continua puede generar efectos adversos.

Esta tesis evalúa el efecto de un régimen intermitente de rapamicina, también denominada sirólimus (10 nM, 24 h/semana) sobre la senescencia replicativa en células endoteliales humanas (HUVEC). El objetivo general fue determinar si la inhibición periódica de mTOR puede atenuar los marcadores de senescencia sin alterar la identidad ni la función endotelial. Se analizaron la activación de las vías mTORC1/mTORC2, MAPK y eNOS; los marcadores p16^{INK4a}, p21^{Cip1} y SA-β-Gal; la proliferación, migración y angiogénesis; el equilibrio redox; y la composición del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, del inglés *Senescence Associated Secretory Phenotype*), así como su efecto paracrino sobre monocitos THP-1.

Los resultados muestran que el tratamiento intermitente con rapamicina inhibe parcialmente mTORC1 sin comprometer la función de mTORC2 ni alterar la autofagia. Este tratamiento retrasa la senescencia replicativa, preserva la capacidad proliferativa y permite mantener la identidad y función endotelial. Además, reduce los niveles de estrés oxidativo y modula selectivamente el SASP, disminuyendo la secreción de algunas citocinas proinflamatorias y atenuando la activación de monocitos. Sin embargo, la reprogramación del secretoma es incompleta, persistiendo señales proinflamatorias residuales.

En conjunto, estos hallazgos demuestran que la inhibición intermitente de mTOR mediante rapamicina podría representar una estrategia eficaz para retrasar la senescencia endotelial y conservar la función vascular, con el potencial de minimizar los efectos secundarios derivados de la inhibición continua. Este trabajo aporta evidencia experimental relevante para el desarrollo de intervenciones antienvjecimiento basadas en la modulación temporal de mTOR y establece una base para futuras investigaciones en modelos complejos y contextos traslacionales.

Palabras clave: gerociencia, senescencia replicativa, disfunción endotelial, rapamicina, mTOR, SASP.

Resumo

O envellecemento constitúe o principal factor de risco para o desenvolvemento de enfermidades cardiovasculares e outras patoloxías crónicas non transmisibles. A senescencia celular, entendida como unha detención irreversible do ciclo celular acompañada dun fenotipo secretor proinflamatorio, desempeña un papel central no deterioro tisular asociado á idade. No contexto vascular, a senescencia endotelial compromete a homeostase, a función de barreira e a capacidade angiogénica, contribuíndo á disfunción endotelial. A vía mTOR, reguladora clave do crecemento e do metabolismo celular, está implicada na progresión do envellecemento e da senescencia celular, sendo a rapamicina un dos compostos con maior potencial antienvellecemento descritos. Non obstante, a súa administración continua pode xerar efectos adversos.

Esta tese avalía o efecto dun réxime intermitente de rapamicina, tamén chamado sirólimus (10 nM, 24 h/semana) sobre a senescencia replicativa en células endoteliais humanas (HUVEC). O obxectivo xeral foi determinar se a inhibición periódica de mTOR pode atenuar os marcadores de senescencia sen alterar a identidade nin a función endotelial. Analizouse a activación das vías mTORC1/mTORC2, MAPK e eNOS; os marcadores p16^{INK4a}, p21^{Cip1} e SA-β-Gal; a proliferación, migración e angiogénese; o equilibrio redox; e a composición do fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, do inglés *Senescence Associated Secretory Phenotype*), así como o seu efecto paracrino sobre monocitos THP-1.

Os resultados mostran que o tratamento intermitente con rapamicina inhibe parcialmente mTORC1 sen comprometer a función de mTORC2 nin alterar a autofaxia. Este tratamento atrasa a senescencia replicativa, preserva a capacidade proliferativa e permite manter a identidade e función endotelial. Ademais, reduce os niveis de estrés oxidativo e modula de maneira selectiva o SASP, diminuíndo a secreción de certas citocinas proinflamatorias e atenuando a activación de monocitos. Porén, a reprogramación do secretoma é incompleta, persistindo sinais proinflamatorias residuais.

En conxunto, estes achados demostran que a inhibición intermitente de mTOR mediante rapamicina podería representar unha estratexia eficaz para atrasar a senescencia endotelial e conservar a función vascular, co potencial de minimizar os efectos secundarios derivados da inhibición continua. Este traballo achega evidencia experimental relevante para o desenvolvemento de intervencións antienvellecemento baseadas na modulación temporal de mTOR e establece unha base para futuras investigacións en modelos complexos e contextos traslacionais.

Palabras chave: xerociencia, senescencia replicativa, disfunción endotelial, rapamicina, mTOR, SASP.

Abstract

Aging constitutes the main risk factor for the development of cardiovascular diseases and other chronic non-communicable disorders. Cellular senescence, defined as an irreversible arrest of the cell cycle accompanied by a pro-inflammatory secretory phenotype, plays a central role in age-associated tissue deterioration. In the vascular context, endothelial senescence compromises homeostasis, barrier integrity, and angiogenic capacity, contributing to endothelial dysfunction. The mTOR pathway, a key regulator of cell growth and metabolism, has been implicated in the progression of aging and cell senescence, with rapamycin identified as one of the compounds with the highest anti-aging potential. However, its continuous administration can lead to adverse effects.

This thesis evaluates the effect of an intermittent rapamycin (sirolimus) regimen (10 nM, 24 h/week) on replicative senescence in human endothelial cells (HUVEC). The main objective was to determine whether periodic mTOR inhibition can attenuate senescence markers without altering endothelial identity or function. The study analyzed the activation of mTORC1/mTORC2, MAPK, and eNOS pathways; the expression of p16^{INK4a}, p21^{Cip1}, and SA- β -Gal; proliferation, migration, and angiogenesis; redox balance; and the composition of the senescence associated secretory phenotype (SASP), as well as its paracrine effects on THP-1 monocytes.

Results show that intermittent treatment with rapamycin partially inhibits mTORC1 without compromising mTORC2 activity or affecting autophagy. This treatment delays replicative senescence, preserves proliferative capacity, and allows to maintain endothelial identity and function. It also reduces oxidative stress levels and selectively modulates SASP, decreasing the secretion of certain pro-inflammatory cytokines and attenuating monocyte activation. However, secretome reprogramming remains incomplete, with residual pro-inflammatory signaling persisting.

Overall, these findings demonstrate that intermittent mTOR inhibition by rapamycin could represent an effective strategy to delay endothelial senescence and preserve vascular function, with the potential to minimize adverse effects associated with continuous inhibition. This work provides relevant experimental evidence for the development of anti-aging interventions based on temporal modulation of mTOR and establishes a foundation for future research in complex models and translational contexts.

Keywords: geroscience, replicative senescence, endothelial dysfunction, rapamycin, mTOR, SASP.

Abreviaturas

4E-BP1 – Proteína de unión al factor de iniciación de la traducción eucariota 4E, *Eukaryotic initiation factor 4E-Binding Protein 1*

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AKT – Transformación de la cepa Ak, *Ak strain Transforming*

AMPK – Proteína cinasa activada por adenosín monofosfato, *AMP-activated Protein Kinase*

ANOVA – Análisis de varianza, *Analysis Of Variance*

APOB –Apolipoproteína B

ATG –Gen relacionado con la autofagia, *Autophagy-related Gene*

ATM – Ataxia-telangiectasia mutada, *Ataxia-Telangiectasia Mutated*

ATR – Ataxia telangiectasia y proteína relacionada con Rad3, *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein*

BCL – Proteína del linfoma de células B, *B-cell Lymphoma protein*

BHE – Barrera hematoencefálica

BSA – Albúmina de suero bovino, *Bovine Serum Albumin*

CD144 – Grupo de diferenciación 144, *Cluster of Differentiation 144 / VE-cadherin*

CD31 – Grupo de diferenciación 31, *Cluster of Differentiation 31 / PECAM-1*

CXCL – Ligando de quimiocina con motivo C-X-C, *C-X-C motif chemokine ligand (GRO)*

DAF-FM – Diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína

DEPC – Dietilpirocarbonato

DEPTOR – Proteína que interactúa con mTOR y que contiene el dominio DEP, *DEP domain-containing mTOR-interacting protein*

DMEM – Medio Eagle modificado por Dulbecco, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido, *Dimethyl Sulfoxide*

EDTA – Ácido etilendiaminetetracético

EGM-2 – Medio de crecimiento endotelial-2, *Endothelial Growth Medium-2*

eIF4E – Factor de iniciación eucariota 4E, *Eukaryotic Initiation Factor 4E*

EndMT – Transición endotelio a mesénquima, *Endotelial to Mesenchymal Transition*

eNOS – Sintasa de óxido nítrico endotelial, *Endothelial Nitric Oxide Synthase*

ERO – Especies reactivas de oxígeno

ET-1 – Endotelina-1, *Endothelin-1*

FBS – Suero fetal bovino, *Fetal Bovine Serum*

FIP200 – Proteína de 200 kDa que interactúa con la cinasa de la familia FAK, *FAK family kinase-Interacting Protein of 200 kDa*

FKBP12 – Proteína de unión a FK506 12, *FK506-Binding Protein 12*

FRB – Dominio de unión a rapamicina-FKBP, *FKBP-rapamycin-binding domain*

FT – Factor tisular

GAPDH – Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*

H2AX – Miembro X de la familia de histonas H2A, *H2A histone family member X*

H₂DCFDA – 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

HALE – Esperanza de vida saludable ajustada, *Healthy Adjusted Life Expectancy*

HBSS – Solución salina equilibrada de Hanks, *Hank's Balanced Salt Solution*

HUVEC – Células endoteliales de la vena umbilical humana, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

ICAM-1 – Molécula de adhesión intercelular-1, *Intercellular Adhesion Molecule-1*

IGF-1 – Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1, *Insulin-like Growth Factor 1*

IIS – Senescencia inducida por inflamación, *Inflammation Induced Senescence*

IL-1 β ,6,8 – Interleucina-1 β ,6,8

IP – Ioduro de propidio

iPSC – Células pluripotentes inducidas, *Induced Pluripotent Stem Cells*

ITP – Programa de Pruebas de Intervenciones, *Intervention Testing Program*

JAK – Cinasa Jano, *Janus Kinase*

KLF2 – Factor tipo Krüppel 2, *Krüppel-like Factor 2*

LC3 – Proteínas asociadas a microtúbulos 1A/1B Cadena ligera 3, *Microtubule-associated proteins 1A/1B Light Chain 3*

MAPK – Proteína cinasa activada por mitógenos, *Mitogen Activated Protein Kinase*

MC – Medio condicionado

MCP-1,3 – Proteína quimioatrayente de monocitos-1,3, *Monocyte Chemoattractant Protein-1,3 (CCL2, CCL7)*

METEI – Expedición médica a la isla de Pascua, *Medical Expedition To Eastern Island*

MMP – Metaloproteínasa de matriz, *Matrix Metalloproteinase*

mSIN1 – Proteína que interactúa con la proteína cinasa activada por estrés (SAPK) de mamíferos, *Mammalian Stress-activated protein kinase (SAPK)-Interacting protein*

mSLT8 – Letal para mamíferos con proteína sec-13 8, *Mammalian Lethal with sec-13 protein 8*

mTOR – Diana mecanística de la rapamicina, *Mechanistic Target Of Rapamycin*

MTT – Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio, *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

NADP – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

NF-κB – Factor nuclear Kappa, potenciador de la cadena ligera de las células B activadas, *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NIA – *National Institute of Aging*

NO – Óxido nítrico

OIS – Senescencia inducida por oncogenes, *Oncogen Induced Senescence*

P62/SQSTM1 – Secuestrosoma 1, *Sequestosome 1*

PAI-1 – Inhibidor del activador del plasminógeno-1, *Plasminogen Activator Inhibitor-1*

PBS – Tampón fosfato salino, *Phosphate-Buffered Saline*

PD – Duplicaciones poblacionales

PDK1 – Proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos 1, *Phosphoinositide-dependent kinase-1*

PDL – Nivel de duplicación poblacional, *Population Doubling Level*

PGI2 – Prostaglandina I2, *Prostaglandin I2*

PI3K – Fosfoinositol 3-cinasa, *Phosphoinositide 3-Kinase*

PIB – Producto Interior Bruto

PIKK – Cinasa relacionada con la fosfatidilinositol-3-cinasa, *Phosphatidylinositol-3-kinase-related kinase*.

PIP₃ – Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, *Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*

PKC α – Proteína cinasa C alfa, *Protein Kinase C alpha*

PRAS40 – Sustrato de Akt rico en prolina de 40 kDa, *Proline-rich Akt Substrate of 40 kDa*

PROTOR – Proteína observada con Rictor-1, *Protein Observed with Rictor-1*

PRR5 – Proteína rica en prolina 5, *Proline-Rich protein 5*

PVDF – Fluoruro de polivinilideno, *Polyvinylidene Fluoride*

RAF – Proteína de fibrosarcoma rápidamente acelerada, *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma protein*

RAPTOR – Proteína asociada a la regulación de mTOR, *Regulatory-Associated Protein of mTOR*

RAS – Proteína del virus del sarcoma de rata, *Rat Sarcoma virus protein*

RC – Restricción calórica

RDA – Respuesta de daño al ADN

REDD1 – Regulado en el desarrollo y respuesta al daño del ADN 1, *Regulated in Development and DNA Damage Response 1*

RHEB – Homólogo de Ras aumentado en el cerebro, *Ras homolog enriched in brain*

RICTOR – Compañero insensible a la rapamicina de mTOR, *Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR*

RT-qPCR – Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa, *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*

S6K – Proteína cinasa ribosomal S6, *Ribosomal protein S6 kinase*

SA- β -Gal – Actividad β -Galactosidasa asociada a senescencia, *Senescence-Associated β -Galactosidase activity*

SASP – Fenotipo secretor asociado a senescencia, *Senescence-Associated Secretory Phenotype*

SD – Desviación estándar, *Standard Deviation*

SGK1 – Cinasa regulada por suero y glucocorticoides, *Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase*

SNC – Sistema nervioso central

SREBP – Proteína de unión al elemento regulador de esteroides, *Sterol Regulatory Element-Binding Protein*

STAT3 – Transductor de señales y activador de la transcripción 3, *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

TAGLN – Transgelina, *Transgelin*

TBS-T – Solución salina tamponada con Tris y Tween 20, *Tris-Buffered Saline with Tween 20*

TGF- β – Factor de crecimiento transformante β , *Transforming Growth Factor- β*

THP-1 – Línea celular monocítica humana de leucemia, *Tohoku Hospital Pediatrics-1*

TIS – Senescencia inducida por terapia, *Therapy Induced Senescence*

TSC – Proteína del complejo de esclerosis tuberosa, *Tuberous Sclerosis Complex protein*

ULK1 – Cinasa activadora de autofagia similar a Unc-51, *Unc-51 like autophagy activating kinase 1*

VCAM-1 – Molécula de adhesión de células vasculares-1, *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*

VEGF – Factor de crecimiento endotelial vascular, *Vascular Endothelial Growth Factor*

vWF – Factor de von Willebrand, *von Willebrand Factor*

α -SMA – Actina alfa del músculo liso, *Smooth Muscle Actin*

γ H2AX – Miembro X de la familia de histonas H2A fosforilada (ser 139), *Phosphorylated H2A histone family member X (ser 139)*

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. ENVEJECIMIENTO

1.1.1. Perspectiva demográfica y socioeconómica

El envejecimiento poblacional constituye un fenómeno demográfico sin precedentes, resultado de la convergencia entre el descenso sostenido de la natalidad y la mejora continua de la supervivencia en prácticamente todas las regiones del planeta (1). La esperanza de vida al nacer se ha incrementado de 46,5 años en 1950 a 73,4 años en 2022, y se proyecta que alcance los 77,2 años en 2050 (1). Este incremento en la longevidad, junto con un descenso sostenido de las tasas de fecundidad, que han caído por debajo del nivel de reemplazo en numerosos países, está transformando profundamente la estructura demográfica global. Las pirámides poblacionales tradicionales están transitando hacia una forma de obelisco, con una proporción creciente de personas mayores y una base juvenil cada vez más estrecha (Figura 1) (2).

En regiones como Europa, este cambio es particularmente pronunciado. En 2023, la proporción de personas de 65 años o más en la Unión Europea superaba ya el 21 %, mientras que la cohorte de menores de 15 años descendía por debajo del 15 % (1). Países como Italia y España exhiben un índice de envejecimiento (definido como la relación entre mayores de 65 años y menores de 15 años) superior al 200 %, indicador de una estructura etaria marcadamente regresiva (3–5).

Aunque Europa alberga actualmente la población más envejecida, Asia, y en particular el este y sudeste asiático, está experimentando un envejecimiento acelerado, con el mayor número absoluto de personas mayores, lo que augura repercusiones económicas y sanitarias significativas a escala global (6).

Las implicaciones sanitarias de esta transición demográfica son profundas. El envejecimiento es el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles. Afecciones como las cardiopatías, los accidentes cerebrovasculares, las demencias y los cánceres ven disparada su prevalencia con la edad, incrementando la mortalidad, pero también la morbilidad, y por tanto, representando una carga sustancial en términos de años de vida ajustados por discapacidad en la población mayor (7). La esperanza de vida saludable (HALE, del inglés *Healthy Adjusted Life Expectancy*) no ha aumentado al mismo ritmo que la esperanza de vida total, lo que implica un periodo de vida más prolongado con limitaciones funcionales y dependencia (8). Esta “morbilidad extendida” ejerce una presión considerable sobre los sistemas sanitarios, incrementando la demanda de atención continua, tratamientos crónicos y cuidados de larga duración.

Pirámides de población, UE 2009 y 2024
(% de la población total)

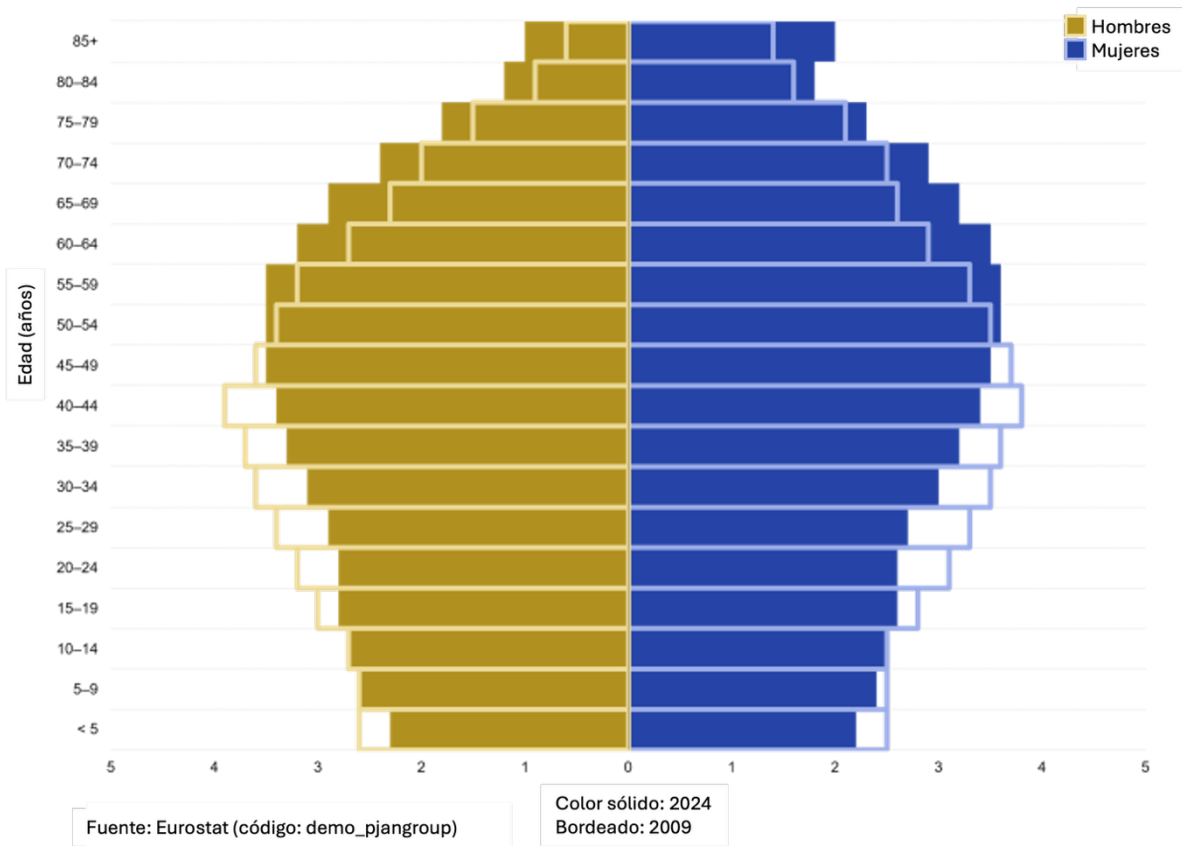


Figura 1 Pirámides de población de la Unión Europea en los años 2009 y 2024.

Distribución porcentual por sexo y grupos de edad en la población total de la UE. Los contornos indican la estructura poblacional de 2009, mientras que las barras coloreadas representan la estimación para 2024 (colores sólidos: hombres en ocre y mujeres en azul). Fuente: Eurostat (código: demo_pjangroup).

El impacto socioeconómico es igualmente significativo. El índice de dependencia demográfica (calculado como la relación entre la población de 65 años o más y la población en edad laboral) pasará del 16 % en 2020 al 28 % en 2050 a nivel mundial, con máximos proyectados superiores al 50 % en la Unión Europea y al 80 % en Japón (5-7). Esta dinámica presiona los sistemas de pensiones y altera los flujos fiscales, ya que se reduce la base tributaria relativa mientras aumenta el gasto público en salud y cuidados. Estudios macroeconómicos sugieren que el envejecimiento podría mermar el crecimiento anual del Producto Interior Bruto (PIB) entre 0,5 y 1,0 puntos porcentuales en las próximas décadas (9). A nivel microeconómico, los hogares enfrentan mayores costes directos (medicación, copagos) e indirectos (pérdida de productividad de los cuidadores), lo que puede exacerbar la desigualdad intergeneracional (10).

La sostenibilidad de los sistemas de salud se ve amenazada por la necesidad de financiar tecnologías y tratamientos médicos cada vez más costosos, adaptar la infraestructura a pacientes crónicos con multimorbilidad y asegurar cuidados de larga duración de calidad (10). Países con

sistemas sanitarios universales ya invierten una porción considerable de su PIB en gasto sanitario, una tendencia que se espera continúe si no se logra comprimir la morbilidad asociada al envejecimiento (11,12).

Frente a este escenario, es crucial la implementación de políticas públicas que promuevan un envejecimiento saludable, fomenten la participación de las personas mayores en la sociedad, y aseguren la sostenibilidad de los sistemas de protección social. Para ello, es imprescindible comprender en profundidad tanto los mecanismos biológicos como los determinantes sociales del envejecimiento. Este conocimiento permitirá desarrollar estrategias efectivas que permitan mejorar la calidad de vida durante la vejez, y mitigar el impacto socioeconómico del envejecimiento poblacional (13,14,15).

1.1.2. Perspectiva biológica

Desde una perspectiva biológica, el envejecimiento se define como un proceso continuo y multifactorial caracterizado por un declive gradual de las funciones fisiológicas, y una reducción de la capacidad del organismo para mantener la homeostasis ante estresores internos y externos (16). Este deterioro es consecuencia de la acumulación paulatina de daño molecular y celular a lo largo del tiempo (4,17). Es fundamental distinguir entre la edad cronológica (el tiempo transcurrido desde el nacimiento) y la edad biológica, que refleja el estado funcional del organismo y puede variar considerablemente entre individuos con la misma edad cronológica (18,19). Investigar los mecanismos determinantes de la edad biológica abre las puertas a desarrollar intervenciones que promuevan un envejecimiento saludable y una mayor calidad de vida en la vejez.

Históricamente, las teorías del envejecimiento se han clasificado en dos grandes grupos: teorías programadas y teorías del daño o error. Las teorías programadas postulan que el envejecimiento sigue un calendario biológico predeterminado, regulado por factores como los ritmos hormonales (teoría endocrina) (20) o la disminución programada de la función inmunitaria (teoría inmunológica) (21). Por otro lado, las teorías del daño o error argumentan que el envejecimiento es el resultado de la acumulación de daños aleatorios causados por factores ambientales y subproductos del metabolismo celular. Ejemplos de estas incluyen la teoría del desgaste, la teoría del ritmo de vida, la teoría de los radicales libres y la teoría del daño somático del ADN (22–24).

El avance en la biología molecular ha permitido integrar estas perspectivas en el marco más amplio y funcional de las claves del envejecimiento. Propuesto inicialmente por López-Otín y colaboradores en 2013, el concepto de las claves del envejecimiento (*Hallmarks of Aging*) identifica una serie de procesos biológicos interconectados que impulsan el envejecimiento. Estos mecanismos, como la inestabilidad genómica, la senescencia celular y la disfunción mitocondrial, contribuyen al deterioro funcional progresivo, y su manipulación experimental parece modular el ritmo del envejecimiento en organismos modelo (25). Posteriormente, en 2023, se han expandido las claves del envejecimiento para abarcar defectos en la autofagia, inflamación crónica y disbiosis (26).

Las claves del envejecimiento no operan de forma aislada; su combinación desencadena el desarrollo de diversas enfermedades. Por ejemplo:

- La inestabilidad genómica y la pérdida de proteostasis contribuyen al desarrollo del cáncer (27).
- La senescencia celular y el fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, del inglés *Senescence-Associated Secretory Phenotype*) juegan un papel clave en la artritis, la aterosclerosis y las demencias (28,29).
- La disfunción mitocondrial, asociada con un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), contribuye al daño oxidativo y a la disminución de la producción de energía celular, y está relacionada con las enfermedades cardíacas isquémicas (30,31).

Esta naturaleza multifacética del envejecimiento explica por qué la mayoría de las personas mayores experimentan multimorbilidad, fenómeno que representa un desafío para los tratamientos médicos que se centran únicamente en órganos o enfermedades específicas.

La gerociencia es un campo de estudio interdisciplinario que investiga la conexión entre el envejecimiento y el desarrollo de enfermedades crónicas asociadas a la edad. Su meta principal es crear intervenciones que no solo retrasen la aparición de múltiples enfermedades, sino que también extiendan la esperanza de vida saludable (32). Este enfoque se basa en la idea de que al manipular, ya sea farmacológica o genéticamente, los mecanismos biológicos fundamentales del envejecimiento, podemos retrasar simultáneamente la aparición de varias enfermedades crónicas y, en consecuencia, alargar significativamente la HALE (33).

Numerosas investigaciones en el campo de la gerociencia han identificado intervenciones que muestran un gran potencial para influir en los procesos de envejecimiento y, consecuentemente, en la salud a largo plazo.

Entre las intervenciones más estudiadas y prometedoras se incluyen:

- Restricción calórica (RC): consiste en una reducción significativa de la ingesta calórica sin llegar a la malnutrición. Se ha demostrado de forma consistente que la RC prolonga la vida y la salud en una amplia gama de modelos animales, desde levaduras y gusanos hasta roedores y primates no humanos. Sus mecanismos de acción son complejos, pero se cree que implican la modulación de vías metabólicas clave y la optimización de la respuesta al estrés celular (23,34).
- Ejercicio físico: el ejercicio regular es una de las intervenciones más robustamente respaldadas para promover la longevidad y la salud asociada, reduciendo la mortalidad por todas las causas entre un 31 y un 35 % y extendiendo la esperanza de vida en aproximadamente 4 años en adultos activos frente a sedentarios (35). También reduce los marcadores circulantes de senescencia y el número de células senescentes (36,37). El efecto pronunciado y robusto del ejercicio ha motivado la

búsqueda de moléculas que actúen como miméticos y proporcionen los beneficios de la actividad física, algunas con resultados muy prometedores (38).

- Activadores de la proteína cinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK, del inglés *AMP-activated Protein Kinase*). AMPK es un sensor energético celular que se activa en condiciones de bajo suministro de energía (como la RC). Su activación promueve el catabolismo y suprime el anabolismo, lo que contribuye a la homeostasis energética y a la salud celular. Compuestos que activan la AMPK, como la metformina (un fármaco ampliamente utilizado para la diabetes tipo 2), están siendo investigados por su potencial para imitar algunos de los efectos beneficiosos de la RC en el envejecimiento y las enfermedades asociadas (39,40).
- Inhibidores de la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR, del inglés *mechanistic Target Of Rapamycin*). mTOR es una cinasa clave que regula el crecimiento, la proliferación y el metabolismo celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes. La inhibición de la vía mTOR, por ejemplo, mediante fármacos como la rapamicina (también denominado sirólimus), ha mostrado resultados consistentes, aumentando la longevidad en modelos preclínicos. Estudios del Programa de Pruebas de Intervenciones (ITP, del inglés *Intervention Testing Program*) del *National Institute of Aging* (NIA)) han demostrado que la rapamicina extiende significativamente la longevidad y mejora la salud en ratones, incluso cuando se administra en etapas avanzadas de la vida (41,42). Además, se han realizado ensayos clínicos con análogos de rapamicina, como el everólimus, en poblaciones de edad avanzada, sugiriendo beneficios en la función inmune y la atenuación de la inflamación sistémica (*inflammaging*), un componente clave del envejecimiento (43).

Estas intervenciones, al dirigirse a vías moleculares conservadas que subyacen al proceso de envejecimiento, ofrecen la posibilidad de impactar positivamente en múltiples aspectos de la salud y de reducir el riesgo de multimorbilidad crónica.

En esencia, la biología nos enseña que el envejecimiento es un proceso complejo y multifactorial, una combinación de mecanismos genéticamente programados y el daño que se acumula en las células con el tiempo. Comprender esto es vital para desarrollar intervenciones biomédicas que no solo nos permitan vivir más años, sino que también extiendan el periodo de saludable (32,44).

1.1.3. Impacto de las “claves del envejecimiento”

En respuesta a la necesidad de un marco integrador que ordene y sistematice los hallazgos empíricos, Carlos López-Otín y colaboradores propusieron en 2013 el modelo de las claves del envejecimiento (*Hallmarks of Aging*), que ha sido ampliamente adoptado en la literatura científica (25). El objetivo de este modelo es proporcionar una estructura conceptual que permita comprender los mecanismos biológicos subyacentes al envejecimiento y su relación con las enfermedades asociadas a la edad.

Para ser considerado una clave del envejecimiento, un proceso biológico debe cumplir tres criterios fundamentales:

- 1) manifestarse durante el envejecimiento normal,
- 2) que su exacerbación acelere el envejecimiento,
- 3) que su reversión o atenuación retrase el envejecimiento y mejore la salud.

Estas claves interactúan de forma compleja y se refuerzan mutuamente, contribuyendo a la degeneración progresiva de la función celular y tisular asociada a la edad.

En su propuesta inicial, López-Otín et al. (2013) (25) identificaron nueve procesos biológicos como característicos del envejecimiento fisiológico en mamíferos:

- **Inestabilidad genómica.** Se refiere a la acumulación progresiva de daño y alteraciones en el material genético de las células, tanto en el ADN nuclear como en el mitocondrial. Este daño compromete la fidelidad de la información genética y la capacidad de las células para funcionar correctamente, contribuyendo a la disfunción celular y tisular.
- **Acortamiento de telómeros.** Los telómeros son estructuras protectoras en los extremos de los cromosomas que se acortan con cada división celular. La pérdida progresiva de estas secuencias teloméricas limita la capacidad replicativa de las células, conduciendo a la senescencia celular y al agotamiento de poblaciones celulares esenciales para la regeneración tisular.
- **Alteraciones epigenéticas.** Implican cambios en los patrones de expresión génica que no se deben a modificaciones en la secuencia del ADN, sino a alteraciones en la metilación del ADN, las modificaciones de histonas y la remodelación de la cromatina. Estas modificaciones desregulan la transcripción génica, afectando la identidad y función celular.
- **Pérdida de proteostasis.** Hace referencia a la disminución de la capacidad celular para mantener la homeostasis proteica. Esto incluye la producción, el plegamiento correcto y la degradación eficiente de las proteínas. La pérdida de proteostasis conduce a la acumulación de proteínas mal plegadas o agregadas, lo que interfiere con la función celular y contribuye a diversas patologías relacionadas con la edad.
- **Desregulación de la detección de nutrientes.** Se produce un desequilibrio en las vías de señalización intracelular que detectan y responden a la disponibilidad de nutrientes, como las vías de la insulina/factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1, del inglés *Insulin-like Growth Factor 1*), mTOR, AMPK y las sirtuinas. Esta desregulación altera la homeostasis metabólica, el crecimiento celular y la respuesta al estrés.

- **Disfunción mitocondrial.** Las mitocondrias, responsables de la producción de energía celular, experimentan una reducción en su eficiencia respiratoria y un aumento en la generación de ERO durante el envejecimiento. El daño acumulado en el ADN mitocondrial y la disminución de la capacidad bioenergética contribuyen significativamente a la disfunción celular y tisular.
- **Senescencia celular.** Es un estado de detención irreversible del ciclo celular en respuesta a diversos tipos de estrés. Las células senescentes no mueren, pero adquieren un SASP que libera factores proinflamatorios, enzimas proteolíticas y moléculas que alteran el microambiente tisular, promoviendo la inflamación crónica y el daño a los tejidos circundantes.
- **Agotamiento de células madre.** La capacidad regenerativa de los tejidos disminuye con la edad debido al agotamiento o la disfunción de las poblaciones de células madre residentes. Esta reducción en el número y la funcionalidad de las células madre compromete la reparación de tejidos y la homeostasis, contribuyendo a la degeneración tisular y a la incapacidad de recuperación frente a lesiones.
- **Alteración de la comunicación intercelular.** Se refiere a los cambios en las señales de comunicación entre las células, que pueden ser de naturaleza hormonal, nerviosa o inmunitaria. Esto incluye un aumento de la inflamación crónica sistémica (*inflammaging*), cambios en la composición de la matriz extracelular y alteraciones en la comunicación entre tejidos, lo que lleva a una interrupción de la homeostasis general del organismo.

El modelo de las claves del envejecimiento fue actualizado y expandido por López-Otín y colaboradores en 2023, una década después de su propuesta inicial. Esta revisión incorporó tres nuevas características clave, elevando el número total a doce y proporcionando una visión más completa y detallada de los procesos biológicos que impulsan el envejecimiento. Además, la nueva versión del modelo introduce una clasificación jerárquica de estas claves, organizándolas en tres niveles según su papel en el proceso de envejecimiento: primarias, antagonistas e integradoras (Figura 2) (26).

- **Macroautofagia deficiente.** La autofagia permite a las células degradar y eliminar componentes disfuncionales, proteínas agregadas y orgánulos dañados. Una macroautofagia ineficiente conlleva la acumulación de desechos celulares, contribuyendo a la disfunción y al envejecimiento.
- **Inflamación crónica (*inflammaging*).** Es un estado persistente de inflamación sistémica de bajo grado que se desarrolla con la edad. A diferencia de la inflamación aguda en respuesta a un estímulo perjudicial, el *inflammaging* es crónico y subclínico, y está vinculado al desarrollo y progresión de múltiples enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y metabólicas relacionadas con la edad.
- **Disbiosis.** Describe las alteraciones en la composición y función de la microbiota, particularmente la intestinal. El envejecimiento se asocia con cambios en el equilibrio de las poblaciones microbianas, lo que puede afectar la integridad de la

barrera intestinal, la absorción de nutrientes, la producción de metabolitos beneficiosos y la modulación del sistema inmune, con implicaciones sistémicas para la salud y el envejecimiento.

BioRender Disease Mechanisms
Hallmarks of Aging

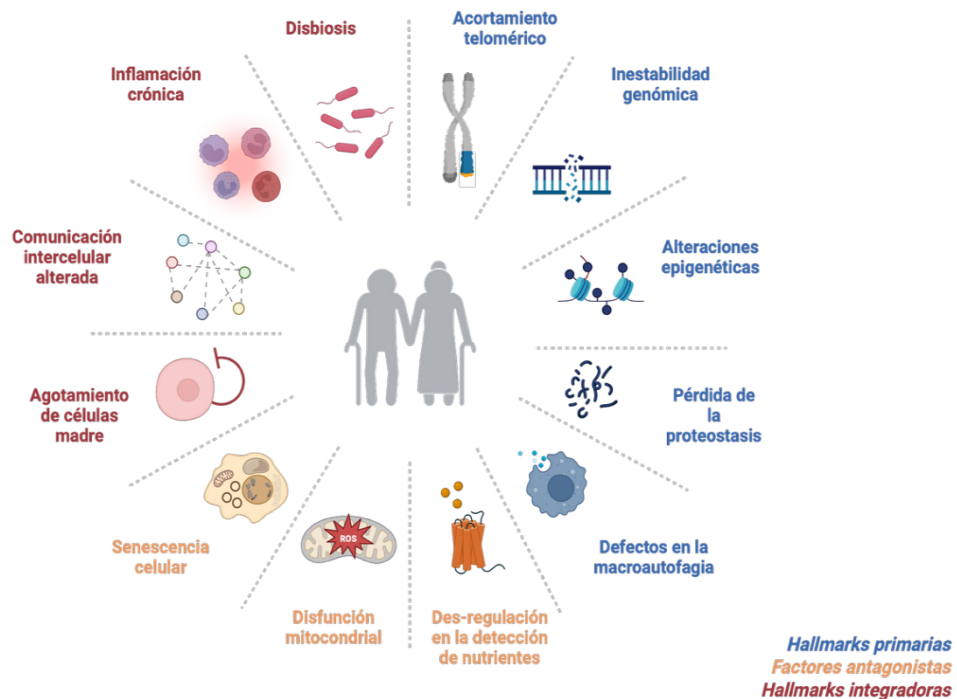


Figura 2 “Hallmarks of aging” o claves del envejecimiento.

Representación esquemática de los principales procesos celulares y moleculares que contribuyen al envejecimiento. Estos mecanismos se agrupan en claves primarias (azul), factores antagonistas (naranja) y claves integradoras (rojo), según su papel en la fisiopatología del envejecimiento. Adaptado de López-Otín et al. (2013) (25) y López-Otín et al. (2023) (26). Imagen creada con BioRender.com.

1.1.3.1. Niveles jerárquicos de las claves del envejecimiento

La inclusión de estas nuevas claves y la reorganización jerárquica enfatiza la complejidad e interconectividad de los procesos del envejecimiento (Figura 2):

- **Claves primarias** (causas del daño): estos son los mecanismos que inician el daño molecular y celular. Incluyen el **acortamiento telomérico**, la **inestabilidad genómica**, las **alteraciones epigenéticas**, la **pérdida de la proteostasis** y **defectos en la macroautofagia**.

- **Claves antagonistas** (respuestas compensatorias): representan los sistemas de respuesta del organismo al daño inicial. Aquí se agrupan la **desregulación de la detección de nutrientes**, la **disfunción mitocondrial** y la **senescencia celular**.
- **Claves integradoras** (responsables finales del fenotipo de envejecimiento): estas son las claves que reflejan la manifestación del envejecimiento a nivel de tejido y organismo, como resultado de la interacción de los niveles primario y antagonista. Incluyen la **disbiosis**, la **inflamación crónica**, la **comunicación intercelular alterada** y el **agotamiento de células madre**.

1.1.3.2. Críticas al modelo de las claves del envejecimiento

A pesar de su amplia aceptación, el modelo ha recibido críticas referentes a diversos aspectos:

- **Causalidad dudosa.** Una de las principales objeciones radica en que no todos los procesos propuestos cumplen con el tercer criterio fundamental para ser una clave: la reversibilidad o atenuación mediante intervención. Si un proceso no puede ser modulado para retrasar el envejecimiento, su papel como causa directa y manipulable se cuestiona (45). Esto abre el debate sobre si algunas claves son meras concurrencias del envejecimiento más que impulsores causales.
- **Jerarquía arbitraria.** La clasificación de las claves en categorías como primarias, antagonistas e integradoras, introducida en la revisión de 2023, se ha cuestionado por su presunta arbitrariedad y la falta de una base empírica sólida. Investigadores como Gems y de Magalhães argumentan que la asignación de algunas claves a una categoría específica (ej. causas primarias o secundarias) carece de suficiente respaldo experimental, sugiriendo que la interconectividad es tan profunda que una jerarquía estricta podría ser una simplificación excesiva (46).
- **Paralelismo forzado con el modelo del cáncer.** Se ha señalado una posible influencia indebida del exitoso marco de las claves del cáncer de Hanahan y Weinberg en la concepción de las claves del envejecimiento. Críticos como Gems y de Magalhães, y Blagosklonny, sugieren que, si bien el modelo del cáncer ha sido un poderoso esquema explicativo, su aplicación directa al envejecimiento podría imponer un encuadre reduccionista. Argumentan que el envejecimiento es un proceso fundamentalmente diferente del cáncer, y que una extrapolación directa podría no ser adecuada para capturar la complejidad inherente al envejecimiento (46,47).
- **Exclusión de procesos relevantes.** El marco original de las claves no abarcaba explícitamente algunos procesos biológicos que se consideran cruciales en el envejecimiento. Ejemplos notables incluyen la inmunosenescencia, el envejecimiento mecánico (cambios en las propiedades físicas de los tejidos) y diversos aspectos endocrinos que influyen en la homeostasis sistémica. En una reunión sobre envejecimiento celebrada en Copenhague en 2022 se propuso la inclusión de nuevas claves, como la disfunción autoinmune y la alteración de las

propiedades mecánicas, para abordar estas omisiones y ampliar la representatividad del modelo (48).

- **Limitaciones para explicar enfermedades concretas.** La capacidad del marco para proporcionar una explicación mecanicista completa de enfermedades específicas relacionadas con la edad, como la enfermedad de Alzheimer o el cáncer, ha sido cuestionada. Blagosklonny argumenta que el esquema actual de las claves del envejecimiento no articula de manera efectiva cómo las claves secundarias o integradoras se combinan para generar patologías complejas, lo que podría limitar su aplicabilidad clínica directa en la comprensión y el tratamiento de enfermedades específicas (47).

1.1.3.3. Contribuciones y valor heurístico del modelo

A pesar de las críticas y las limitaciones inherentes a cualquier modelo simplificado de un proceso tan complejo, el marco de las claves del envejecimiento ha demostrado un valor heurístico considerable y ha realizado contribuciones significativas al campo de la gerociencia.

Sus principales aportaciones incluyen:

- **Organización conceptual y síntesis de conocimiento.** El modelo ha proporcionado una base conceptual útil para organizar la creciente información sobre la biología del envejecimiento. Ha permitido sintetizar hallazgos de diversas áreas en un esquema coherente, facilitando la comprensión y la comunicación dentro de la comunidad científica.
- **Generación de hipótesis y avance experimental.** Al identificar procesos clave, el marco ha estimulado el desarrollo de numerosas hipótesis experimentales dirigidas a desentrañar los mecanismos moleculares subyacentes de cada clave y sus interconexiones. Esto ha catalizado una gran cantidad de investigación básica y traslacional, impulsando el descubrimiento de nuevas vías y dianas terapéuticas.
- **Integración interdisciplinaria.** El modelo ha fomentado la integración de disciplinas que tradicionalmente operaban de forma más aislada, como la biología molecular, la gerontología, la medicina regenerativa y la medicina clínica. Al proporcionar un lenguaje común y objetivos compartidos (dirigirse a las claves del envejecimiento), ha propiciado colaboraciones y enfoques más holísticos.
- **Desarrollo de intervenciones terapéuticas.** Quizás una de sus contribuciones más relevantes ha sido el impulso en la exploración de intervenciones terapéuticas dirigidas a procesos específicos del envejecimiento. La idea de que intervenir sobre una clave en particular podría tener efectos beneficiosos amplios sobre la salud y la longevidad ha llevado al desarrollo y prueba de fármacos y estrategias que buscan modular estos mecanismos, abriendo nuevas vías para el tratamiento de enfermedades asociadas a la edad.

En definitiva, el modelo de las claves del envejecimiento representa una herramienta conceptual valiosa para comprender el envejecimiento biológico. Aunque no constituye un paradigma en su sentido más estricto, es decir, no es una teoría unificada e inmutable, permite sintetizar información compleja y guiar la investigación experimental.

Sin embargo, es crucial reconocer que este marco debe ser complementado con marcos alternativos y abordarse con una actitud crítica. La biología del envejecimiento es intrínsecamente compleja, y la interacción entre las claves y otros factores aún está lejos de ser comprendida en su totalidad. Mantener una perspectiva abierta y estar dispuestos a refinar y expandir nuestro entendimiento permitirá seguir avanzando en nuestra comprensión del envejecimiento y sus múltiples manifestaciones (25,32).

1.2. SENESCENCIA Y ENVEJECIMIENTO

1.2.1. Definición y características

La senescencia celular se define habitualmente como la detención estable e irreversible del ciclo celular que se establece en respuesta a estresores intrínsecos y extrínsecos (49,50). Descrito por primera vez por Hayflick y Moorhead en 1961, este proceso implica un profundo reordenamiento epigenético y transcriptómico que confiere a la célula un fenotipo distintivo, caracterizado por las alteraciones morfológicas, secretoras y la resistencia a la apoptosis (51–53). Estas alteraciones se acompañan de una reprogramación metabólica, que incluye un aumento en la actividad β -galactosidasa lisosomal muy característico de células senescentes (SA- β -Gal, del inglés *Senescence associated β -Galactosidase activity*) (54–57).

Las alteraciones en la secreción celular adquieren un papel especialmente relevante en la senescencia. Las células senescentes liberan activamente citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento y proteasas, conformando en conjunto el SASP (58–60). El SASP tiene efectos pleiotrópicos. Fisiológicamente, participa en procesos como la embriogénesis, la reparación de heridas y la supresión tumoral, reclutando células inmunitarias para la eliminación de las células senescentes. Sin embargo, la acumulación crónica de células senescentes y la persistencia del SASP en los tejidos contribuyen al desarrollo de un microambiente proinflamatorio y proteolítico, implicado en múltiples patologías crónicas asociadas al envejecimiento (50,61,62)

La senescencia celular puede desencadenarse por diversos mecanismos, entre los que se incluyen el acortamiento o daño telomérico, el estrés oxidativo, el daño en el ADN, la disfunción mitocondrial y la activación aberrante de oncogenes (61,63). El fenotipo senescente resultante varía en función tanto del tipo de estímulo que induce la senescencia como de la identidad celular. Algunas células senescentes desarrollan un SASP prominente, mientras que otras no lo expresan; del mismo modo, pueden observarse alteraciones metabólicas y resistencia a la apoptosis en ciertos contextos celulares, pero no de forma universal. Esta variabilidad en el SASP afecta de manera distinta el microambiente tisular y las interacciones celulares, modulando procesos como la inflamación, la remodelación del tejido y la progresión tumoral (64,65).

Actualmente, se entiende que la senescencia celular tiene un doble papel en la biología de los organismos: por un lado, actúa como un mecanismo protector contra el cáncer, al detener la

proliferación de células dañadas. También cumple un papel importante durante el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas (61). Por otro, su acumulación progresiva en tejidos contribuye a la disfunción y deterioro asociados al envejecimiento, lo cual es especialmente relevante en el contexto de enfermedades asociadas a la edad (28).

Este efecto deletéreo ha convertido a la senescencia en un tema de gran interés en el desarrollo de terapias frente al envejecimiento, dirigidas a eliminar o reprogramar células senescentes (66,67).

1.2.2. Senescencia replicativa y otros tipos de senescencia

El descubrimiento de Hayflick y Moorhead en la década de 1960, que demostró que las células humanas en cultivo tienen un número limitado de divisiones, sentó las bases para el concepto de senescencia replicativa (51,52). A partir de este modelo fundacional, se han descrito otros tipos de senescencia inducidos por distintos estresores, lo que ha permitido comprender que la senescencia no es un fenómeno uniforme, sino una respuesta celular heterogénea con diversos desencadenantes y manifestaciones fenotípicas.

Entre los mecanismos inductores de la senescencia celular se incluyen:

Acortamiento de los telómeros y daño al ADN

En la década de 1970, el biólogo ruso Alexey Olovnikov propuso que la incapacidad de la ADN polimerasa para replicar por completo los extremos de los cromosomas, la llamada «teoría de la marginotomía», provoca un acortamiento progresivo de los telómeros que actúa como un reloj interno y limita el número de divisiones celulares (68,69). Dos décadas más tarde, Calvin B. Harley y colaboradores demostraron en fibroblastos humanos la pérdida gradual de nucleótidos teloméricos a lo largo de los pases sucesivos y el papel protector de la telomerasa, enzima identificada inicialmente en protozoos (70), en el mantenimiento de los telómeros en líneas celulares inmortalizadas (71).

El acortamiento telomérico se debe a que la ADN polimerasa requiere un cebador de ARN: cuando se eliminan los cebadores de los fragmentos de Okazaki en la hebra rezagada queda un segmento terminal de ADN monocatenario que no puede copiarse, con la consiguiente pérdida de longitud telomérica (72). Cuando los telómeros alcanzan una longitud crítica, se pierde la protección del complejo *shelterin* y se activa una respuesta de daño en el ADN (RDA) crónica.

La RDA implica una red compleja de vías de señalización que detectan y reparan lesiones genómicas. Las cinasas proteína mutada por ataxia-telangiectasia (ATM, del inglés *Ataxia-telangiectasia mutated*) y proteína relacionada con ataxia-telangiectasia y Rad3 (ATR, del inglés *Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) fosforilan efectores como H2AX, originando focos γ -H2AX que reclutan proteínas reparadoras y amplifican la señal de inestabilidad genómica (73). ATR y ATM modulan además las proteínas de control de ciclo CHK1 y CHK2, garantizando que la célula detenga la división para reparar el daño o, si la reparación fracasa, entre en senescencia o apoptosis (74,75).

La activación persistente de la RDA estabiliza p53 y favorece la transcripción de p21^{Cip1}, que inhibe las cinasas dependientes de ciclina CDK2 y CDK4, deteniendo el ciclo en la transición G1/S (76,77). En paralelo, la vía p16^{INK4a}/RB refuerza este arresto al impedir la transcripción mediada por E2F necesaria para la fase S, estableciendo una barrera robusta a la proliferación (78,79). Aunque no todos los tipos celulares presentan simultáneamente ambas rutas, esta doble vía es fundamental para imponer el fenotipo senescente (80,81) (Figura 3).

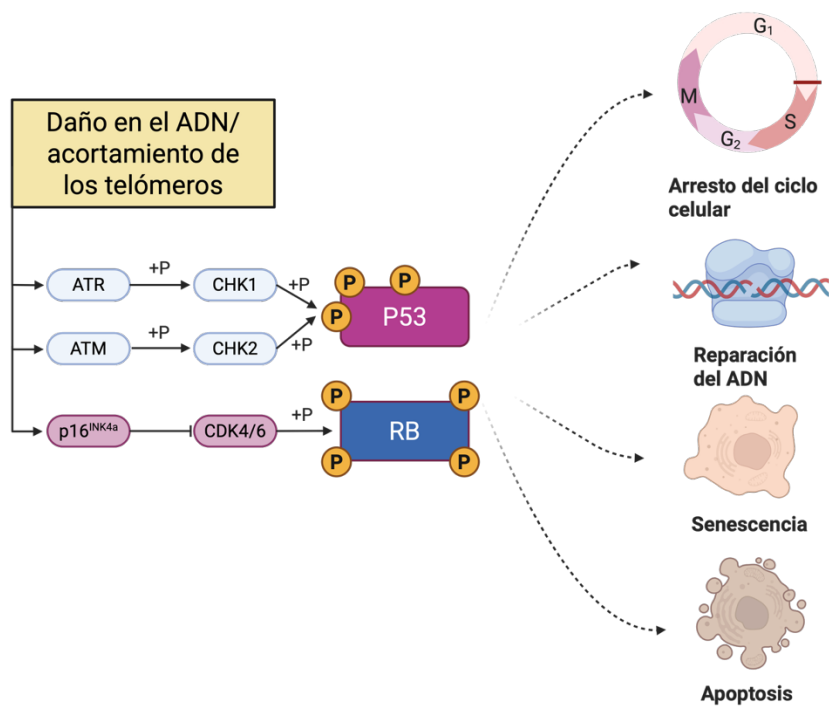


Figura 3 Vías de respuesta al daño en el ADN y acortamiento telomérico.

El daño en el ADN y el acortamiento de los telómeros activan las cinasas ATR/CHK1 y ATM/CHK2, que fosforilan y estabilizan p53. Simultáneamente, la vía p16^{INK4a} inhibe CDK4/6, promoviendo la activación de RB. La activación de p53 y RB conduce a la interrupción del ciclo celular, la reparación del ADN, la senescencia o la apoptosis, en función del contexto celular. Figura adaptada de Picos et al. 2025 (125), elaborada con BioRender.com.

Estrés oxidativo:

El estrés oxidativo, definido como un desequilibrio entre la producción de ERO y la capacidad de los sistemas antioxidantes para neutralizarlas, es un factor crucial en el envejecimiento y en la inducción de senescencia celular. Las ERO, como el anión superóxido (O₂⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (OH⁻), son subproductos normales del metabolismo celular, especialmente de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, considerada la principal fuente endógena de ERO. Sin embargo, su producción excesiva o una defensa antioxidante deficiente conducen a un daño oxidativo en macromoléculas esenciales como lípidos, proteínas y, de manera crucial, el ADN (23,82,83).

La senescencia inducida por estrés oxidativo ocurre cuando niveles elevados y persistentes de ERO provocan un daño celular suficiente para activar las vías de detención del ciclo celular. Aunque dicha senescencia puede estar mediada por el daño directo al ADN (lo que la conecta con la RDA de la senescencia replicativa), también puede desencadenarse por mecanismos independientes del acortamiento telomérico o incluso del daño masivo en el ADN nuclear. Por ejemplo, las ERO pueden inducir lesiones en el ADN telomérico, como 8-oxoguanina (8-oxoG), que, sin acortar el telómero, pueden causar disfunción telomérica y promover la senescencia prematura (84). El daño en el ADN de los telómeros es difícil de reparar debido a las estructuras proteicas compuestas por complejos *shelterin* que los recubren y protegen (85,86).

Además de inducir daño en el ADN y alterar la estructura de la cromatina, las ERO contribuyen a la senescencia celular mediante la oxidación de proteínas y lípidos. Esta oxidación da lugar a la formación de lipofuscina, un pigmento autofluorescente que se acumula progresivamente en el citoplasma. La lipofuscina es especialmente abundante en células postmitóticas y senescentes, y su acumulación se ha asociado no solo con el envejecimiento celular, sino también con la disfunción lisosomal y la alteración del recambio proteico, lo que podría reforzar y perpetuar el fenotipo senescente (86,87).

Los mecanismos moleculares de la senescencia inducida por estrés oxidativo implican la activación de supresores tumorales claves que también participan en otras formas de senescencia. El estrés oxidativo estabiliza y activa p53, a la vez que induce la expresión de p16^{INK4a}, lo cual es fundamental para la entrada en senescencia (86,88). La activación de p53, a su vez, promueve la transcripción de p21^{Cip1}, lo que conduce a una detención irreversible del ciclo celular en fases G1 y/o G2 (Figura 3).

El estrés oxidativo también regula múltiples rutas de señalización, como MAPK, JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR y NF-κB, que amplifican el fenotipo senescente y potencian la expresión del SASP (89,90). En particular, las vías p38-MAPK y MEK/ERK facilitan la inducción de p21^{Cip1} y p16^{INK4a}, a la vez que activan NF-κB, un regulador decisivo del SASP. La activación de NF-κB es necesaria y suficiente para desencadenar la expresión de citocinas clave del SASP, como IL-6 e IL-8 (91).

Activación de oncogenes:

La senescencia inducida por oncogenes (OIS, del inglés *Oncogene-Induced Senescence*) es un mecanismo fundamental de supresión tumoral que se activa en células normales cuando detectan la expresión aberrante o la activación excesiva de oncogenes. Los oncogenes son genes que, cuando están mutados o sobreexpresados, promueven la proliferación celular incontrolada. La OIS actúa como una "barrera de seguridad" para evitar que estas células potencialmente malignas se dividan y formen tumores (81,92).

El desencadenante más estudiado de OIS es la activación de la vía de señalización RAS/RAF/MAPK, frecuentemente por mutaciones en los genes RAS o RAF. La señalización hiperactiva a través de esta vía conduce a un estrés replicativo y, paradójicamente, a la activación de la RDA, aunque no necesariamente por acortamiento telomérico. La RDA, a su vez, activa las vías de los supresores tumorales p53 y p16^{INK4a} y la detención del ciclo celular (81,93).

El papel principal de la OIS es el de un mecanismo de defensa antitumoral robusto, previniendo la progresión de lesiones premalignas a cáncer. Las células senescentes, aunque no sean eliminadas directamente por apoptosis, quedan en un estado de arresto proliferativo, lo que impide que las células dañadas con potencial oncogénico continúen su expansión. Además de la detención del ciclo celular, el SASP asociado a las células senescentes puede contribuir a la eliminación de las células premalignas por parte del sistema inmune, reforzando la función supresora tumoral de la OIS (59,94) (Figura 4).

Sin embargo, si las células senescentes persisten y se acumulan en los tejidos (un fenómeno común con el envejecimiento), el SASP crónico puede generar un microambiente inflamatorio que, paradójicamente, puede llegar a promover el crecimiento tumoral en etapas posteriores, así como contribuir a la inflamación crónica sistémica (*inflammaging*) y al deterioro de los tejidos asociados al envejecimiento (60,94).

A esto se suma que la eliminación de células senescentes por el sistema inmunitario puede verse comprometida en pacientes de edad avanzada o con inmunosenescencia, reduciendo la eficacia del aclaramiento inmunológico posterior al tratamiento frente al cáncer. De hecho, algunas evidencias sugieren que los tratamientos que inducen senescencia en células tumorales pueden provocar, como efecto secundario, una disfunción inmunitaria progresiva si el SASP no se resuelve a tiempo (21,95,96). Esta combinación de senescencia terapéutica persistente y respuesta inmune deteriorada no solo limita el control tumoral, sino que también puede contribuir a la recaída o resistencia a tratamientos posteriores.

Por último, aunque la inducción de senescencia es un mecanismo terapéutico habitual frente al cáncer (TIS, del inglés *Therapy Induced Senescence*), la selección de clones resistentes frente a la terapia, o la reversión del proceso mediante desdiferenciación progresiva, están relacionados con un peor pronóstico y mayor agresividad de la enfermedad (97,98).

Así, la senescencia celular en el contexto oncológico representa una espada de doble filo: si bien puede actuar como barrera inicial contra la proliferación tumoral, su mantenimiento crónico y no resuelto puede interferir con el éxito terapéutico a largo plazo, agravar la inflamación sistémica asociada al envejecimiento y deteriorar la integridad funcional de los tejidos (49,96,99).

Señales inflamatorias crónicas:

La inflamación crónica de bajo grado juega un papel fundamental en la inducción y mantenimiento de la senescencia celular. No solo las células senescentes secretan factores proinflamatorios, sino que las propias señales inflamatorias en el microambiente tisular pueden inducir la senescencia en células sanas, creando un círculo vicioso que acelera el envejecimiento y la patogénesis de enfermedades (100,101). Este tipo de senescencia, a menudo denominada senescencia inducida por inflamación (IIS, del inglés *Inflammation-Induced Senescence*) o, en un sentido más amplio, senescencia inducida por el entorno, destaca la importancia de las interacciones célula-microambiente.

Los mediadores clave en la IIS son las citocinas proinflamatorias, como la interleucina-6 (IL-6), la interleucina-1 beta (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Estas citocinas,

que se encuentran elevadas en el envejecimiento y en diversas patologías crónicas, pueden activar vías de señalización intracelular que convergen en la inducción de senescencia (101,102). NF- κ B es un factor de transcripción central en la respuesta inmune e inflamatoria, y su activación crónica por citocinas puede conducir a la expresión de genes que promueven la detención del ciclo celular, como p21^{Cip1}, y que contribuyen al SASP (89,103).

Esta diversidad en los inductores de senescencia, sus mecanismos moleculares y los fenotipos resultantes refleja la complejidad del proceso y su impacto en la fisiología y patología humanas. La Figura 4 resume los procesos de senescencia celular.

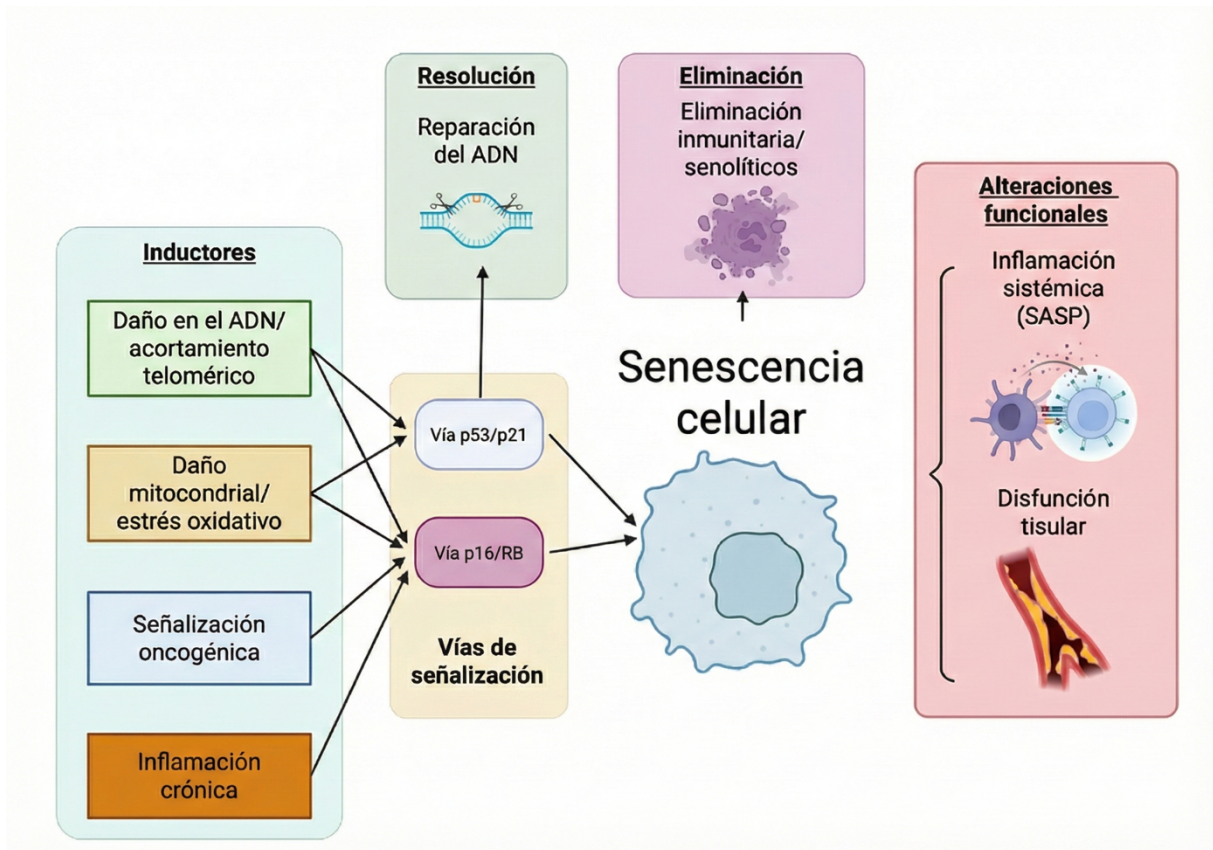


Figura 4 Resumen del proceso de senescencia celular.

Distintos estímulos dañinos, como el acortamiento telomérico, el daño oxidativo, la señalización oncogénica o la inflamación crónica, activan vías de señalización (principalmente p53/p21^{Cip1} y p16^{INK4a}/Rb) que conducen al establecimiento del fenotipo senescente. Este estado puede resolverse mediante reparación del ADN o eliminarse a través de mecanismos inmunitarios o fármacos senolíticos. En ausencia de resolución o eliminación, las células senescentes pueden generar alteraciones funcionales, como inflamación sistémica mediada por SASP y disfunción tisular. El SASP mantiene y amplifica la senescencia celular de manera autocrina y paracrina. Imagen adaptada de Picos et al. 2025 (125) con BioRender.com.

1.3. SENESCENCIA ENDOTELIAL

1.3.1. Papel del endotelio en la homeostasis vascular

El endotelio vascular está constituido por una monocapa de células endoteliales que tapiza la superficie interna de todos los vasos sanguíneos, desde las grandes arterias hasta los capilares más finos. Es un órgano dinámico y multifuncional, esencial para regular el intercambio de moléculas entre la sangre y los tejidos, el tono vascular y múltiples funciones de tipo endocrino e inmunológico (104–106).

En condiciones fisiológicas, el endotelio sano es un guardián activo de la salud vascular, orquestando una compleja red de interacciones para mantener la homeostasis (Tabla 1). Sus funciones primordiales incluyen:

Regulación del tono vascular. El endotelio es el principal regulador del diámetro vascular y, por ende, del flujo sanguíneo y la presión arterial. Produce vasodilatadores como óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI₂) que relajan las células de músculo liso vascular subyacentes. Además, el endotelio también puede producir vasoconstrictores como la endotelina-1 (ET-1) (107). Un balance adecuado entre factores vasodilatadores y vasoconstrictores es crucial para mantener la homeostasis y función del sistema circulatorio.

Mantenimiento de la barrera vascular. Las uniones estrechas y adherentes entre las células endoteliales forman una barrera altamente selectiva que controla el paso de fluidos, solutos, macromoléculas y células (como los leucocitos) entre la sangre y los tejidos circundantes. Esta función de barrera es vital para prevenir el edema y la extravasación inapropiada de componentes sanguíneos (108).

Regulación de la hemostasia y la trombosis. La superficie endotelial es intrínsecamente antitrombótica. Produce inhibidores de la agregación plaquetaria (NO, PGI₂) y anticoagulantes (como la trombomodulina, que activa la proteína C, y el inhibidor del factor tisular - TFPI). Previene así la formación de coágulos sanguíneos (trombos) en condiciones normales (109).

Modulación de la inflamación y la respuesta inmune. El endotelio sano presenta una superficie antiinflamatoria. En reposo, expresa bajos niveles de moléculas de adhesión celular (VCAM-1, ICAM-1, selectinas) que son necesarias para el reclutamiento de leucocitos. Ante estímulos inflamatorios, puede aumentar la expresión de estas moléculas para permitir la respuesta inmune, pero una activación crónica es perjudicial y proaterogénica (110).

Angiogénesis y reparación vascular. El endotelio participa activamente en la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) a partir de vasos preexistentes, un proceso esencial para el desarrollo, el crecimiento tisular y la reparación de heridas. Responde a factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) (111). También contribuye a la reparación del daño vascular mediante la migración y proliferación celular.

Tabla 1 Funciones del endotelio vascular.

Función principal	Ejemplos específicos
Regulación del tono vascular	Producción de NO, PGI2 (vasodilatadores) y ET-1 (vasoconstrictor) (107)
Control de la permeabilidad vascular	Intercambio selectivo de líquidos, solutos y células entre el plasma y los tejidos (108)
Mantenimiento de la hemostasia	Secreción de factores anticoagulantes (trombomodulina, NO), procoagulantes (factor tisular), y fibrinolíticos (t-PA) (109)
Modulación de la inflamación	Expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina), reclutamiento de leucocitos (110)
Función inmunológica	Producción de citocinas (IL-6, IL-8), presentación de antígenos, interacción con células inmunitarias (109)
Angiogénesis y remodelado vascular	Secreción de VEGF, angiopoyetinas y metaloproteinasas de matriz (MMPs) que regulan crecimiento y reparación vascular (111)
Mecanotransducción	Respuesta a fuerzas hemodinámicas como el estrés de cizalla: regulación génica, producción de NO, activación de vías de señalización intracelular (112)
Metabolismo	Influencia sobre metabolismo lipídico, estrés oxidativo, sensibilidad a insulina (113)

1.3.2. Relación entre senescencia y disfunción endotelial

La edad, y la exposición acumulada a diversos factores de estrés endógenos y exógenos pueden detonar la entrada en senescencia de las células endoteliales, lo que altera la función normal del endotelio (66,114).

En el sistema vascular, la senescencia inducida por RDA adquiere un papel destacado. Las células endoteliales sometidas a estrés hemodinámico crónico (estrés de cizalla) muestran un acortamiento telomérico acelerado que dispara una activación persistente de la RDA e induce senescencia (115,116). Las células endoteliales aisladas de adultos mayores presentan telómeros críticamente cortos y una mayor expresión de p21^{Cip1} y p16^{INK4a}, marcadores clave de arresto celular (115,117). Estas células senescentes exhiben una menor biodisponibilidad de

óxido nítrico (NO) por la reducción de la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, del inglés *endothelial Nitric Oxide Synthase*), comprometiendo la homeostasis vascular (118,119).

La disfunción endotelial es un precursor y componente clave de la mayoría de las enfermedades cardiovasculares. La senescencia celular es reconocida como uno de los principales impulsores de esta disfunción asociada a la edad (113,114). Los mecanismos específicos incluyen:

Reducción de la biodisponibilidad de NO:

La disminución en la disponibilidad de NO es uno de los sellos distintivos de la disfunción endotelial senescente. Ocurre por múltiples vías interconectadas:

- **Desacoplamiento de la eNOS.** La enzima eNOS, en lugar de producir NO, empieza a generar O_2^- , debido a la disponibilidad limitada de su cofactor tetrahidrobiopterina (BH_4) o del sustrato L-arginina (120).
- **Aumento del estrés oxidativo.** Las células endoteliales senescentes generan mayores cantidades de ERO, provenientes principalmente de mitocondrias disfuncionales y de la activación de enzimas como las nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasas (NOX). Estas ERO inactivan directamente el NO formando peroxinitrito ($ONOO^-$), una molécula altamente reactiva y perjudicial (86).
- **Reducción de la expresión o actividad de eNOS.** En algunos contextos, la propia expresión o fosforilación activadora de la eNOS puede estar disminuida en las células endoteliales senescentes. La consecuencia directa es una vasodilatación dependiente del endotelio deteriorada, lo que contribuye a la hipertensión arterial y a una perfusión tisular inadecuada (121,122).

Inducción del SASP:

- **Inflamación crónica.** La secreción sostenida de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β y TNF- α contribuye al establecimiento de un microambiente inflamatorio persistente en la pared vascular. Este entorno favorece la disfunción endotelial y el reclutamiento continuo de monocitos y macrófagos, lo que agrava la inflamación local. Estos procesos resultan especialmente relevantes en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis (123,124).
- **Remodelado de la matriz extracelular.** Las MMPs producidas por las células senescentes degradan componentes estructurales como colágeno y elastina, lo que debilita la integridad de la pared vascular. Este proceso promueve la rigidez arterial y puede favorecer la inestabilidad de las placas ateroscleróticas (125,126).
- **Disfunción paracrina.** Los factores secretados como parte del SASP actúan no solo sobre la célula senescente, sino también sobre células adyacentes, incluidas otras células endoteliales, células musculares lisas vasculares y células inmunes.

Esta señalización paracrina puede inducir senescencia o disfunción en dichas células, amplificando así el deterioro vascular (50,127).

Cambio hacia un fenotipo protrombótico:

En condiciones de senescencia, las células endoteliales pierden su capacidad para mantener una superficie vascular antitrombótica. Este cambio se caracteriza por un aumento en la expresión de factores procoagulantes, como el factor tisular (FT) y el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1, del inglés *Plasminogen Activator Inhibitor-1*), lo que limita la fibrinólisis y favorece la formación de coágulos. Paralelamente, se observa una disminución en la expresión de moléculas anticoagulantes clave, como la trombomodulina. Esta alteración del equilibrio hemostático conlleva un incremento significativo del riesgo de trombosis en tejidos envejecidos o dañados (128,129).

Alteración de la función de barrera:

La senescencia de las células endoteliales compromete la integridad de las uniones intercelulares, aumentando la permeabilidad vascular. Esto facilita la infiltración subendotelial de lípidos, especialmente colesterol asociado a partículas de la apolipoproteína B (APOB), y de células inmunitarias, lo que representa un proceso determinante en el inicio de la aterosclerosis (130). Además, en el sistema nervioso central (SNC), la senescencia endotelial y la pérdida de proteínas clave como ocludina y claudina-5 comprometen la barrera hematoencefálica (BHE), permitiendo el paso de moléculas no deseadas y células inmunitarias que pueden agravar enfermedades neurovasculares. Así, la disrupción de la barrera endotelial en contextos senescentes no solo favorece las patologías cardiovasculares, sino que representa también un riesgo significativo en enfermedades neurodegenerativas asociadas con la edad (131–133).

Deterioro de la angiogénesis y la reparación vascular:

Las células endoteliales senescentes muestran una capacidad angiogénica significativamente reducida y a menudo no responden a estímulos proangiogénicos como VEGF. Esto impide la formación de nuevos vasos necesarios para la revascularización de tejidos isquémicos, como en el caso de un infarto, y limita la reparación del daño endotelial, instaurando un ciclo continuo de lesión y disfunción vascular (134). A nivel molecular, se ha observado que las células endoteliales senescentes presentan niveles reducidos de expresión de VEGF y su receptor VEGFR-2, lo que debilita las vías de señalización esenciales para migración, proliferación y supervivencia endotelial. Además, la disminución de la actividad de Nrf2, clave en la respuesta antioxidante y en la regulación de la angiogénesis, empeora aún más este déficit funcional (134).

En conjunto, la senescencia endotelial transforma el endotelio de un protector a un promotor activo de patología vascular. La acumulación de células endoteliales senescentes con la edad impulsa la disfunción endotelial generalizada, creando un entorno propicio para el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis, la hipertensión, la rigidez arterial, la trombosis y la respuesta inadecuada a las lesiones vasculares, todos ellos rasgos característicos del envejecimiento cardiovascular (Tabla 2).

Tabla 2 Alteraciones inducidas por senescencia en la función endotelial.

Función alterada	Alteraciones inducidas por senescencia
Tono vascular	↓ Producción de NO (disfunción de eNOS), ↑ ET-1 → vasoconstricción, pérdida de capacidad vasodilatadora (135,136)
Permeabilidad vascular	↑ Permeabilidad paracelular, desorganización de uniones adherentes, extravasación de proteínas plasmáticas e infiltración leucocitaria (137,138)
Hemostasia	↑ Estado procoagulante: mayor expresión de factor tisular, ↓ expresión de trombomodulina y activadores fibrinolíticos, ↑ actividad plaquetaria (139,140)
Inflamación	↑ SASP: secreción de IL-6, IL-8, MCP-1; ↑ expresión de ICAM-1 y VCAM-1 → reclutamiento leucocitario sostenido (141,142)
Función inmunológica	↓ Respuesta inmunitaria adaptativa, ↑ inmunosenescencia, interferencia en la presentación de antígenos y comunicación con células inmunes (143,144)
Angiogénesis y remodelado vascular	↓ Capacidad de proliferación y migración de células endoteliales, ↓ expresión de VEGF, acumulación de células disfuncionales que interfieren en la reparación vascular (145)
Mecanotransducción	↓ Respuesta a estrés de cizalla: alteración en la activación de eNOS, alteraciones epigenéticas, desregulación de vías dependientes de flujo como factor tipo Krüppel 2 (KLF2) y Nrf2 (146)
Metabolismo	↑ Estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, alteración en la sensibilidad a insulina, ↑ acumulación lipídica subendotelial (125)

1.4. SENOTERAPIAS

La acumulación de células senescentes durante el envejecimiento, sus efectos pleiotrópicos y su papel en el cáncer, así como su inclusión en el modelo de las 12 claves del envejecimiento, han situado a las células senescentes como una potencial diana terapéutica en las enfermedades asociadas a la edad (26,50,147,148).

Existen actualmente dos estrategias terapéuticas, o senoterapias, enfocadas en la senescencia celular: agentes senolíticos, moléculas capaces de inducir apoptosis de manera selectiva en células senescentes; y senomorfos que modulan el SASP con el fin de reducir la carga proinflamatoria que suponen las células senescentes, sin eliminarlas (67,138).

1.4.1. Senolíticos

Los fármacos senolíticos son moduladores de rutas bioquímicas sobreexpresadas en células senescentes, como la vía p53/p21 y las proteínas antiapoptóticas de la familia BCL-2, que promueven la supervivencia de estas células. Al incidir en dianas pro supervivencia específicas de células senescentes, permiten la eliminación selectiva de estas (149) (Figura 4).

La evidencia más sólida del efecto positivo en la longevidad de la eliminación de células senescentes viene del trabajo de Baker y colaboradores en 2016 donde, utilizando modelos murinos transgénicos en los que podían inducir apoptosis selectiva para las células que expresan p16^{INK4a}, mostraron que dicha eliminación aumenta la esperanza de vida, así como diversos parámetros funcionales y de salud (78).

Otros trabajos apoyan esta hipótesis (89,145), y diversos senolíticos se encuentran actualmente en ensayos clínicos con diferentes indicaciones. Entre ellos destacan:

- Dasatinib + quercetina: La asociación de dasatinib, un inhibidor de enzimas tirosin-kinasas, y quercetina, un flavonoide antioxidante y antiinflamatorio, constituye la combinación senolítica más estudiada hasta la fecha. Ha demostrado reducir el número de células senescentes en ensayos clínicos en humanos sin efectos adversos graves, posicionándose como una de las terapias senolíticas más prometedoras (150–152).
- Navitoclax (ABT-263): El navitoclax es un inhibidor oral de BCL-2 que se encuentra en desarrollo frente a ciertos tipos de tumores sólidos (153,154). Estudios posteriores han mostrado que también actúa como un potente senolítico (149,155). Las células senescentes presentan una resistencia intrínseca a la apoptosis, en parte por la sobreexpresión de proteínas de la familia BCL-2 como BCL-2, BCL-xL y BCL-w. Navitoclax inhibe estas dianas, induciendo apoptosis en células senescentes tanto *in vitro* como *in vivo*. A pesar de sus efectos senolíticos prometedores, el uso clínico de navitoclax está limitado por su toxicidad hematológica, especialmente la trombocitopenia, resultado de la inhibición de BCL-xL en plaquetas. Esta limitación ha impulsado la búsqueda de estrategias alternativas, como la formulación dirigida o el desarrollo de compuestos más selectivos para BCL-2 con menor afinidad por BCL-xL (155).

A pesar del entusiasmo generado por las terapias senolíticas, su aplicación clínica presenta importantes limitaciones. Una de las principales preocupaciones es la especificidad: la mayoría de senolíticos conocidos, como navitoclax (ABT-263) o la combinación dasatinib + quercetina, eliminan células senescentes induciendo apoptosis mediante la inhibición de proteínas antiapoptóticas como BCL-2, BCL-xL o PI3K. Sin embargo, muchas células no senescentes también dependen de estas vías para su supervivencia, lo que puede traducirse en efectos tóxicos importantes, por ejemplo, la trombocitopenia ya mencionada debida al navitoclax. Además, dasatinib se asocia con efectos adversos cardiovasculares y hematológicos, y la biodisponibilidad oral y metabolismo de la quercetina son altamente variables, lo que dificulta su uso clínico estándar (67).

Otra limitación es la heterogeneidad de las células senescentes, que presentan distintos perfiles de resistencia en función del tipo celular, el estímulo que las indujo y su entorno tisular. Esto impide que una única molécula actúe de forma eficaz en todos los contextos, dificultando el desarrollo de terapias universales (53). Por otro lado, las células senescentes cumplen funciones beneficiosas en ciertos contextos (como la cicatrización o la embriogénesis), por lo que su eliminación indiscriminada podría alterar procesos fisiológicos importantes (62,156–158). Finalmente, la falta de biomarcadores específicos para identificar y monitorizar las células senescentes en humanos sigue siendo una limitación crítica para su aplicación clínica segura.

1.4.2. Senomorfos

Los fármacos senomorfos, a diferencia de los senolíticos, no eliminan las células senescentes, sino que modulan su fenotipo, suprimiendo características perjudiciales como el SASP, sin inducir apoptosis. Esta estrategia busca minimizar los efectos adversos de las células senescentes conservando sus posibles funciones fisiológicas beneficiosas, como la regulación de la regeneración tisular o la contención tumoral en fases iniciales (29,156).

Uno de los compuestos senomorfos más estudiados es la rapamicina, que ha demostrado suprimir parcialmente el SASP, mejorar la función celular y prolongar la longevidad en múltiples modelos animales (159,160). En particular, la rapamicina reduce la síntesis de proteínas proinflamatorias y modula la bioenergética mitocondrial, lo que revierte en parte el fenotipo disfuncional asociado a la senescencia. A diferencia de los senolíticos, su efecto es más dependiente del contexto y del tiempo de exposición.

Otros ejemplos de agentes senomorfos incluyen la metformina, que activa AMPK y reduce la producción de ERO, y la apigenina, un flavonoide con capacidad antiinflamatoria y antioxidante, que atenúa la expresión de IL-6 e IL-8 en células senescentes (161,162). Además, ciertos inhibidores de JAK/STAT también se han propuesto como senomorfos por su capacidad para suprimir el SASP (163,164).

En conjunto, los senomorfos representan una estrategia terapéutica más conservadora y potencialmente más segura para condiciones donde la senescencia cumple funciones beneficiosas o donde no es factible eliminar completamente las células afectadas. No obstante, se necesitan estudios clínicos de mayor escala para confirmar su seguridad y eficacia en humanos.

1.5. mTOR Y ENVEJECIMIENTO

1.5.1. Descubrimiento de mTOR

En la década de 1960, como parte de una expedición llamada METEI (del inglés *Medical Expedition to Eastern Island*) cuyo objetivo principal era estudiar la salud de una población aislada en la isla Rapa Nui para investigar posibles causas de cáncer relacionadas con el estilo de vida moderno, se aisló una bacteria proveniente del suelo, *Streptomyces hygroscopicus*, capaz de producir un compuesto con una potente actividad antifúngica (165), así como propiedades inmunosupresoras (166) y antitumorales (167). Este compuesto fue denominado **rapamicina**, en honor al nombre indígena de la isla, Rapa Nui (165,168) y fue aprobado como medicamento en 1999 para inmunosupresión en trasplante renal, bajo el nombre genérico de sirólimus (169).

El camino para dilucidar el mecanismo de acción de la rapamicina fue largo y complejo. En 1990, el grupo de Stuart L. Schreiber descubrió que la rapamicina formaba un complejo con la peptidil-prolil isomerasa FKBP12 (del inglés *FK-506 binding protein 12*), lo que mediaba la inhibición de las células T de una forma competitiva, pero con un mecanismo distinto al también macrólido FK-506 (170).

La purificación de la proteína FKBP en levaduras apuntó a un mecanismo de acción para la rapamicina conservado en eucariotas (171). El grupo de George P. Livi, a la vez que otros grupos, demostraron que la disrupción del gen codificante para FKBP en levaduras confería resistencia a la rapamicina, pero resultaba no letal. Al expresar la proteína humana FKBP12 en esta cepa de levaduras, se restableció la sensibilidad a la rapamicina, lo que respalda la existencia de un mecanismo conservado evolutivamente. Este mecanismo implica la formación de un complejo tóxico FKBP12-rapamicina y sugiere la participación de un tercer componente aún desconocido (171–173).

En 1991, el grupo de Joseph Heitman identificó en levaduras dos genes específicos, *tor1* y *tor2*, necesarios para la toxicidad inducida por la rapamicina (172,174). Las proteínas correspondientes TOR1 y TOR2 fueron aisladas poco después (174,175). Apenas un año más tarde, en 1994, tres grupos lograron de manera paralela e independiente aislar e identificar la proteína en mamíferos, conocida como mTOR (176–178).

1.5.2. Ruta de mTOR

mTOR es una serina/treonina cinasa de 289 kDa que pertenece a la familia de las cinasas relacionadas con la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K, del inglés *Phosphatidylinositol-3-kinase-related kinase*). Esta enzima conservada evolutivamente actúa como un centro integrador de diversas señales intracelulares y extracelulares (179).

mTOR es la subunidad catalítica de dos complejos llamados mTORC1 (del inglés *mTOR complex 1*) y mTORC2 (del inglés *mTOR complex 2*) que se diferencian por parte de sus componentes y funciones, así como su sensibilidad a la rapamicina.

- **mTORC1.** Este complejo está compuesto por mTOR, la proteína *RAPTOR* (del inglés *Regulatory-Associated Protein of mTOR*) asociada a la regulación de mTOR, la proteína mLST8 (también conocida como GβL), el inhibidor natural de mTOR (DEPTOR, del inglés *DEP domain-containing mTOR-interacting protein*) y el regulador inhibidor del complejo mTORC1 denominado PRAS40 (del inglés *Proline-rich Akt Substrate of 40 kDa*). mTORC1 es la principal diana de la rapamicina, que se une a la proteína FKBP12 y luego interactúa con mTORC1 para inhibir su actividad. mTORC1 es un sensor clave del estado nutricional y energético de la célula, regulando procesos anabólicos como la síntesis de proteínas y lípidos, e inhibiendo procesos catabólicos como la autofagia.
- **mTORC2.** Formado por mTOR, la proteína RICTOR (del inglés *Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR*), mSIN1 (del inglés *Mammalian Stress-activated protein kinase (SAPK)-Interacting protein*), y mLST8, además de DEPTOR y PROTOR (del inglés *Protein Observed with Rictor-1*). A diferencia de mTORC1, mTORC2 es generalmente considerado insensible a la inhibición aguda por rapamicina, aunque la exposición prolongada a dosis altas de rapamicina puede afectar a su actividad. mTORC2 juega un papel crítico en la organización del citoesqueleto, la supervivencia celular y la regulación metabólica a través de la fosforilación de AKT1 (PKB, proteína cinasa B), la cinasa 1 regulada por suero y glucocorticoides (SGK1, del inglés *Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase*) y la proteína cinasa C alfa (PKCα).

Como núcleo central del metabolismo, mTOR orquesta la homeostasis celular y del organismo al coordinar procesos anabólicos y catabólicos con la disponibilidad de nutrientes, energía, oxígeno y señales de factores de crecimiento. Los efectos pleiotrópicos de mTOR se extienden a funciones celulares fundamentales, incluyendo el crecimiento celular, la proliferación, la motilidad, la supervivencia, la transcripción génica y la síntesis de proteínas (180).

1.5.2.1. Reguladores de mTOR

La actividad de mTOR está finamente regulada por una compleja red de señales aguas arriba que informan a la célula sobre su entorno interno y externo (Figura 5). Estas señales incluyen la disponibilidad de nutrientes, la presencia de factores de crecimiento y el estado energético celular.

Nutrientes

- **Aminoácidos.** La presencia de aminoácidos, particularmente leucina, arginina, glutamina y S-adenosilmetionina, es un potente activador de mTORC1. Los aminoácidos son detectados por proteínas transceptoras en la membrana lisosomal y transmiten esta señal a las GTPasas Rags (RagA-D), que a su vez reclutan a mTORC1 a la superficie del lisosoma, donde interactúa con la GTPasa Rheb (del inglés *Ras homolog enriched in brain*), un activador directo de mTORC1. Estudios recientes han profundizado en los mecanismos de detección de aminoácidos a través del complejo Ragulator y los transportadores SLC38A9 y SLC7A5-SLC3A2 (LAT1-CD98hc) (181–184).

- **Glucosa.** La disponibilidad de glucosa influye en la actividad de mTORC1 a través de varias vías. La glucólisis puede generar metabolitos que regulan la vía PI3K/AKT, un activador clave de mTORC1. Además, la glucosa aumenta la producción de ATP, lo que disminuye la actividad de AMPK, un inhibidor de mTOR (185,186).

Factores de Crecimiento

La **insulina** e **IGF-1** son potentes activadores de la vía PI3K/AKT/mTOR. La unión de estos factores a sus receptores tirosina cinasa en la membrana plasmática activa PI3K, que produce fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3, del inglés *Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*). PIP3, a su vez, recluta y activa la proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 (PDK1, del inglés *Phosphoinositide-dependent kinase-1*) y AKT. AKT fosforila directamente la proteína del complejo de esclerosis tuberosa 2, (TSC2, del inglés *Tuberous Sclerosis Complex protein 2*) en Ser939 y Thr1462. Este componente del complejo TSC (TSC1/TSC2) actúa como inhibidor de la GTPasa Rheb. La fosforilación de TSC2 por AKT inhibe su actividad, permitiendo que Rheb-GTP active mTORC1 (187,188).

Estrés energético

En condiciones de **bajo nivel energético**, como las que se dan durante el ayuno o el ejercicio, la relación AMP:ATP aumenta, activando AMPK. AMPK es un potente inhibidor de mTORC1. La inhibición puede ser indirecta, fosforilando TSC2 en Ser1387, lo que aumenta la actividad del complejo TSC e inhibe Rheb; o directa, fosforilando Raptor en Ser792 y Ser722, lo que inhibe mTORC1 (185,189,190). Esta regulación asegura que los procesos anabólicos sean reprimidos cuando la energía es escasa, priorizando el mantenimiento de la homeostasis energética.

Estrés celular

Diversas formas de estrés celular también modulan la actividad de mTOR.

- **Hipoxia.** Bajo condiciones de hipoxia, la actividad de mTORC1 puede ser inhibida a través de diferentes mecanismos, incluyendo la activación de la proteína regulada en el desarrollo y en la respuesta al daño del ADN 1 (REDD1, del inglés *regulated in development and DNA damage response 1*), que actúa aguas arriba del complejo TSC para inhibir mTORC1 (191,192).
- **Daño al ADN.** El daño al ADN activa cinasas como ATM y ATR, que pueden fosforilar y activar AMPK, llevando a la inhibición de mTORC1 y promoviendo la autofagia para la reparación celular (193,194).

1.5.2.2. Efectores de mTOR

La activación de mTORC1 y mTORC2 desencadena una cascada de eventos de señalización que controlan diversos procesos celulares. En la Figura 5 se representa el esquema principal de las rutas de mTOR. mTORC1 es un regulador clave de la síntesis de proteínas, la

autofagia, la biogénesis de ribosomas, el metabolismo lipídico y la proliferación celular. Sus principales efectores, aguas abajo, son:

- La cinasa de la proteína ribosomal S6 (**S6K**, del inglés *Ribosomal protein S6 kinase*). La fosforilación y activación de S6K por mTORC1 promueve la síntesis de proteínas al fosforilar el ribosoma S6, lo que facilita la traducción de ARNm de los componentes ribosomales y de factores de elongación. S6K también regula la biogénesis de ribosomas y la traducción de ARNm específicos (195).
- La proteína 1 de unión al factor de iniciación de la traducción eucariota 4E (**4E-BP1**, del inglés *Eukaryotic translation initiation factor 4E-Binding Protein 1*). mTORC1 fosforila múltiples sitios en 4E-BP1, lo que provoca su disociación del factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E). eIF4E es esencial para la iniciación de la traducción cap-dependiente. Al liberar eIF4E, mTORC1 promueve la síntesis de proteínas, especialmente la de proteínas implicadas en el crecimiento y la proliferación celular (196).
- La cinasa 1 activadora de autofagia similar a Unc-51 (**ULK1**, del inglés *Unc-51 Like autophagy activating Kinase 1*) y la proteína relacionada con la autofagia 13 (ATG13, del inglés *Autophagy related gene 13*). mTORC1 es un potente inhibidor de la autofagia. Lo hace fosforilando directamente proteínas clave en el complejo de iniciación de la autofagia, como ULK1 y ATG13. La fosforilación de ULK1 por mTORC1 previene la formación del complejo ULK1-ATG13-FIP200, que es esencial para la iniciación de la autofagia (197,198). Cuando la actividad de mTORC1 es baja (por ejemplo, en condiciones de privación de nutrientes), la autofagia se activa.
- La proteína de unión al elemento regulador de esteroides (**SREBP**, del inglés *Sterol Regulatory Element-Binding Protein*). mTORC1 también regula la síntesis de lípidos a través de la activación de SREBP un factor de transcripción clave en la síntesis de colesterol y ácidos grasos (188,199).

mTORC2 juega un papel fundamental en la regulación de la supervivencia celular, el metabolismo y la organización del citoesqueleto. Sus sustratos más importantes incluyen:

- **AKT1**. mTORC2 fosforila a AKT1 en Ser473, lo que es necesario para la activación completa de AKT1. AKT1, a su vez, regula una multitud de procesos celulares, incluyendo la supervivencia celular (mediante la inhibición de proteínas proapoptóticas y la activación de antiapoptóticas), el metabolismo de la glucosa (promoviendo la captación de glucosa y la glucólisis) y la proliferación celular (200,201).
- **SGK1**. mTORC2 fosforila y activa SGK1, que está implicada en la regulación del transporte de iones, la supervivencia celular y el crecimiento (202).
- **PKC α** . mTORC2 también fosforila y activa PKC α , que participa en la organización del citoesqueleto y la migración celular (203,204).

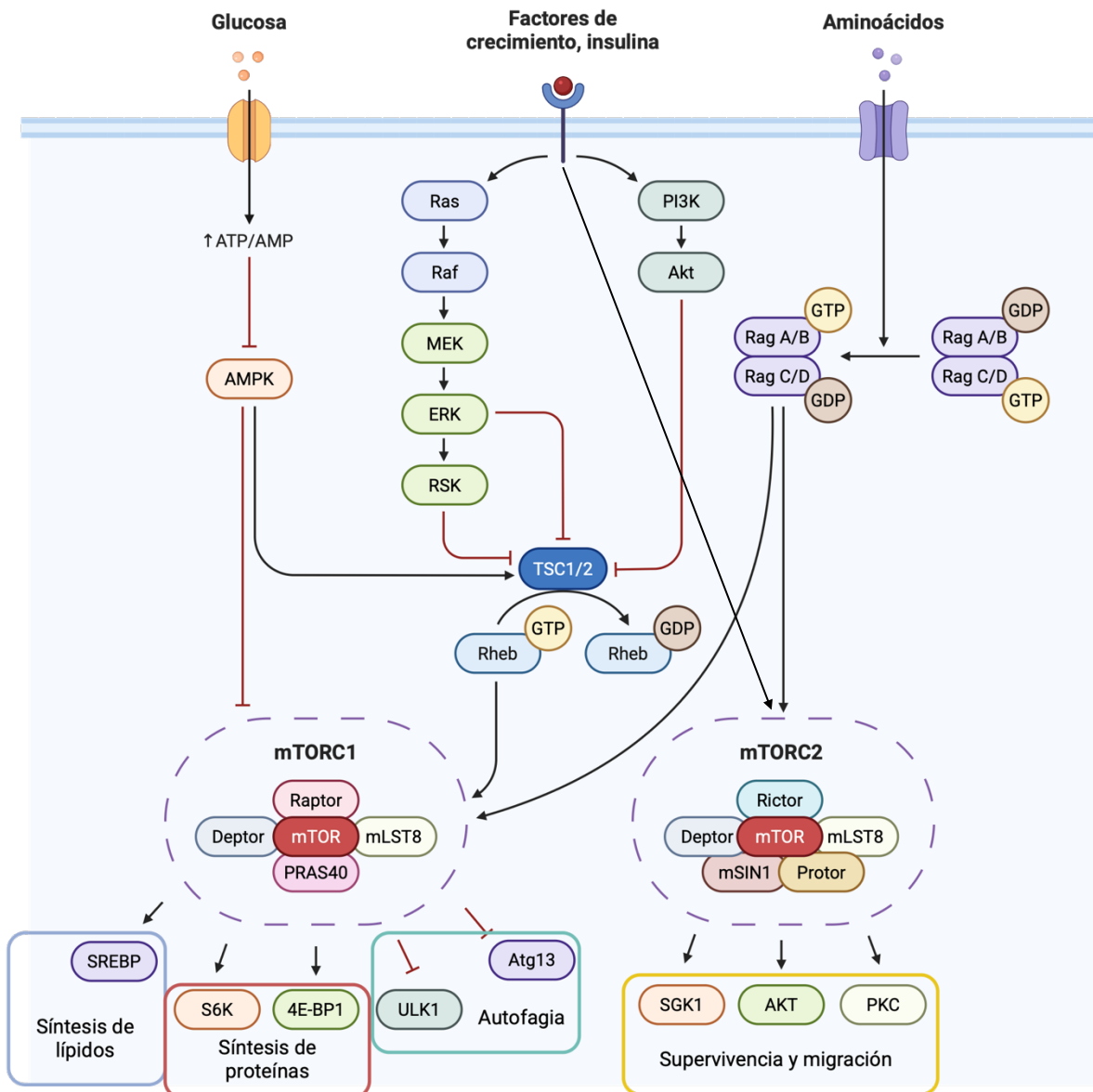


Figura 5 Esquema de la vía mTOR.

La vía mTOR (diana de rapamicina en mamíferos) es un complejo sistema de señalización que integra diversas señales extracelulares e intracelulares para regular el crecimiento celular, la proliferación, el metabolismo y la supervivencia. Involucra dos complejos principales, mTORC1 y mTORC2, que responden a señales como glucosa, factores de crecimiento, insulina y aminoácidos.

mTORC1: Se activa por nutrientes y factores de crecimiento. Promueve el crecimiento celular al aumentar la síntesis de proteínas y lípidos, y al inhibir la autofagia.

mTORC2: Se activa por factores de crecimiento e insulina. Regula la supervivencia celular y el metabolismo mediante la activación de proteínas clave como AKT1 y SGK1.

Figura creada con BioRender.com

1.5.3. Modulación de mTOR, envejecimiento y senescencia

La vía de mTOR se ha consolidado como un objetivo principal en la investigación del envejecimiento debido a su papel integral en la regulación metabólica y celular. Numerosos estudios en organismos modelo han demostrado que la modulación de la actividad de mTOR puede influir significativamente en la longevidad y la salud a lo largo de la vida (41,205–207).

Existe una creciente evidencia de que la actividad de la vía mTOR se desregula con la edad y está implicada en el desarrollo de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como el cáncer, la aterosclerosis, la diabetes y el declive de la función inmunológica (25,43,208). La hiperactividad de mTOR se correlaciona con una disminución en la eliminación de proteínas y orgánulos dañados, lo que contribuye a la acumulación de daño celular asociado al envejecimiento (209,210).

1.5.3.1. Modulación genética

La manipulación genética de la vía mTOR ha proporcionado pruebas contundentes de su implicación en la longevidad en numerosos organismos modelo:

- Levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Uno de los primeros indicios de la relevancia de mTOR en el envejecimiento proviene de estudios en levadura. Se observó que la delección del gen Sch9-homólogo de la proteína S6K en mamíferos, un efector clave de mTORC1-resultaba en una extensión notable de la longevidad. De manera similar, la reducción general de la actividad de TOR, el equivalente de mTOR en levadura, también contribuía a una mayor longevidad (211). Estos hallazgos iniciales sentaron las bases para investigaciones posteriores en organismos más complejos.
- Nematodos (*Caenorhabditis elegans*). En el nematodo *C. elegans*, un modelo muy utilizado en el estudio del envejecimiento, la reducción de la expresión de ceTOR (el homólogo de mTOR) o de daf-15 (el homólogo de RAPTOR) se tradujo en una prolongación significativa de la vida de los gusanos (206,212), lo que puso de manifiesto la conservación de la función de mTOR en la regulación de la longevidad en organismos multicelulares.
- Drosophila (*Drosophila melanogaster*). Los estudios en la mosca de la fruta también han respaldado el papel de mTOR en la longevidad. La supresión genética tanto de TOR como de S6K en *D. melanogaster* ha demostrado extender su vida (213).
- Ratones (*Mus musculus*). La investigación en mamíferos ha corroborado los hallazgos previamente descritos. Se ha demostrado que la delección del gen S6K1 en ratones no solo prolonga su vida, sino que también mejora su salud metabólica general, lo que sugiere un vínculo entre la vía mTOR, el metabolismo y la longevidad. Además, la doble delección de mTOR y mLST8 en heterocigosis también ha mostrado un aumento de la longevidad en ratones (214–216).

Estos estudios proporcionan evidencia directa de la relevancia de mTOR en la longevidad de mamíferos, así como su grado de conservación desde levaduras, pasando por nematodos y moscas de la fruta, lo que subraya su potencial como diana terapéutica frente al envejecimiento humano.

1.5.3.2. Modulación farmacológica

La modulación farmacológica de mTOR, particularmente con la rapamicina, ha sido un área de intensa investigación debido a su potencial traslacional.

- **Rapamicina y análogos (*Rapalogs*).** La rapamicina es actualmente el único fármaco que ha demostrado consistentemente extender la vida en una amplia gama de organismos modelo, incluyendo levaduras, gusanos, moscas y, crucialmente, ratones (41,205,207,217,218). La rapamicina parece ejercer sus efectos sobre la esperanza de vida principalmente a través de la inhibición de mTORC1. En el citoplasma celular, forma un complejo con FKBP12 para, posteriormente, unirse al dominio FRB de mTOR e impedir su interacción con los sustratos. Esta unión del complejo FKBP12-rapamicina sólo es posible en mTORC1, ya que RICTOR bloquea el dominio FRB, impidiendo el acceso (192).

Sin embargo, el tratamiento crónico con rapamicina inhibe también mTORC2, aunque el mecanismo no está claro. Se ha propuesto la unión del complejo FKBP12-rapamicina a la cinasa mTOR antes de que esta forme parte de mTORC2, impidiendo la constitución de este (192,193).

Los mecanismos propuestos para su efecto antienvjecimiento incluyen la mejora de la autofagia (lo que permite la eliminación de proteínas y orgánulos dañados), la optimización metabólica y la reducción de la senescencia celular (219,220). Sin embargo, es importante señalar que la rapamicina tiene efectos secundarios bien documentados, como la supresión inmunológica y la resistencia a la insulina en algunos contextos, lo que plantea desafíos para su uso generalizado como agente antienvjecimiento en humanos (221,222). Para circunnavegar estas limitaciones se plantean regímenes de uso alternativos, como el tratamiento intermitente, con el fin de evitar la inhibición de mTORC2 y los efectos secundarios consecuentes (214,223,224).

Los cotratamientos de rapamicina y metformina, o rapamicina y acarbosa, han mostrado efectos aditivos que podrían deberse al control de dicha resistencia a la insulina (218,225). Se están llevando a cabo estudios con primates no humanos para evaluar el potencial papel geroprotector de la rapamicina en mamíferos superiores, más próximos a los humanos (226,227). Los *rapalogs* como el everólimus y el temsirólimus, con farmacocinéticas mejoradas, están en uso clínico para tratar ciertos tipos de cáncer y prevenir el rechazo de trasplantes.

- **Metformina.** Aunque no es un inhibidor directo de mTOR, la metformina, un fármaco ampliamente utilizado para la diabetes tipo 2, actúa activando AMPK a través de un proceso de desacople del complejo I mitocondrial (228,229). Como se

mencionó anteriormente, la activación de AMPK conduce a la inhibición de mTORC1. Por lo tanto, la metformina indirectamente modula la vía mTOR y se ha asociado con beneficios para la longevidad y la salud en estudios preclínicos y epidemiológicos, lo que sugiere un solapamiento en los mecanismos de acción con la rapamicina (39,40). La metformina es un fármaco muy seguro y económico, y un buen candidato para ensayos clínicos en envejecimiento (162,230). Como limitaciones, cabe señalar los efectos modestos en las dosis ensayadas por el ITP (225,231) y la preocupación por el posible impacto en las adaptaciones producidas por el ejercicio aeróbico en personas mayores (232).

- **Otras moléculas.** Además de la rapamicina y sus análogos, algunas moléculas con efectos indirectos o moduladores sobre la vía mTOR han mostrado eficacia en el ITP para extender la longevidad en modelos murinos. Un caso destacado es la acarbosa, un inhibidor de alfa-glucosidasas que, si bien actúa principalmente sobre el metabolismo de carbohidratos, reduce la señalización de insulina/IGF-1, lo que repercute en una menor activación de PI3K/AKT/mTOR (233). Su administración prolongó significativamente la esperanza de vida, especialmente en machos (234,235), mientras que su combinación con rapamicina mostró un efecto aditivo en la edad mediana y máxima alcanzada por ambos sexos (218). Esta aditividad del efecto podría sugerir la modulación de rutas efectoras distintas con efectos sinérgicos, o dosis infra óptimas de los fármacos con efectos sumatorios en la misma ruta. Se necesitan más estudios para optimizar la dosificación y dilucidar los mecanismos subyacentes, aunque el control de la hiperglucemia inducida por la rapamicina podría ser uno de ellos.

1.5.4. Perspectivas futuras: mTOR como diana en el envejecimiento

La investigación sobre mTOR y su modulación en el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad está en constante evolución, abriendo nuevas perspectivas para la medicina traslacional.

1.5.4.1. Inhibición de mTOR frente a enfermedades relacionadas con la edad

- **Enfermedades neurodegenerativas.** La hiperactividad de mTOR se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. En estos trastornos, mTOR contribuye a la acumulación de proteínas mal plegadas como tau hiperfosforilada y α -sinucleína, al inhibir procesos clave como la autofagia y la degradación proteica. La inhibición de mTOR ha mostrado resultados prometedores en modelos preclínicos de estas enfermedades, al reducir la acumulación anómala de agregados proteicos y mejorar la función cognitiva (236,237). Está por demostrar si los beneficios de la inhibición farmacológica se deben a efectos antiinflamatorios periféricos o efectos a nivel de SNC. El desarrollo de inhibidores de mTOR que crucen eficazmente la BHE permitirá evaluar los efectos centrales con mayor éxito (238–240).
- **Cáncer y síndrome metabólico.** El síndrome metabólico, caracterizado por resistencia a la insulina, obesidad visceral, dislipidemia e inflamación crónica de

bajo grado, se asocia de forma consistente con un mayor riesgo de diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de colon, mama, endometrio, hígado y páncreas (241,242). Esta relación se explica en parte por la hiperactivación de rutas como PI3K/AKT/mTOR, común tanto al síndrome metabólico como a la proliferación tumoral (27,243). La insulina elevada y el IGF-1 promueven el crecimiento celular y la inhibición de la apoptosis, facilitando un entorno favorable a la transformación maligna (244,245).

Así, el cáncer puede considerarse una posible consecuencia tardía de desórdenes metabólicos sostenidos. Dado el papel central de la vía PI3K/AKT/mTOR en la conexión entre el síndrome metabólico y el cáncer, los inhibidores de mTOR han sido propuestos como una estrategia terapéutica dual: por un lado, pueden reducir la proliferación tumoral, y por otro, mejorar parámetros metabólicos, como la sensibilidad a la insulina y la inflamación sistémica (246). Fármacos como la rapamicina y el everólimus, han mostrado eficacia en modelos preclínicos y algunos ensayos clínicos, especialmente en tumores con hiperactivación de mTORC1, como ciertos cánceres de mama, riñón o endometrio (247,248). La frecuente aparición de resistencias es una limitación importante en su aplicación práctica (249,250).

- **Enfermedades renales.** La desregulación de la vía mTOR es un contribuyente clave a diversas enfermedades renales, lo que ha llevado al estudio de los inhibidores de mTOR como posibles terapias. En la enfermedad renal poliquística autosómica dominante, la hiperactivación de mTORC1 promueve el crecimiento y la proliferación de quistes; la rapamicina y sus análogos han mostrado en modelos preclínicos la capacidad de frenar el crecimiento quístico y preservar la función renal, si bien los ensayos clínicos han reportado resultados variados en eficacia sostenida y efectos secundarios (251).

Asimismo, la actividad aberrante de mTOR contribuye a la patogénesis de la nefropatía diabética y otras glomerulonefritis al modular procesos como la glomeruloesclerosis, la fibrosis intersticial y la proteinuria (252). En el ámbito del trasplante renal, los inhibidores de mTOR se utilizan clínicamente para la prevención del rechazo del aloinjerto y para mitigar la nefrotoxicidad de otros inmunosupresores (253). No obstante, la complejidad de la señalización de mTOR en el riñón y los efectos adversos sistémicos, como la aparición de proteinuria o las alteraciones metabólicas, subrayan la necesidad de optimizar los regímenes de dosificación y desarrollar agentes más selectivos para maximizar los beneficios terapéuticos y minimizar los riesgos en el tratamiento de estas enfermedades renales.

- **Enfermedades cardiovasculares.** La desregulación de la vía mTOR ha emergido como un factor patogénico crucial en diversas enfermedades cardiovasculares, lo que ha posicionado a los inhibidores de mTOR como agentes terapéuticos prometedores. La hiperactivación de mTORC1 se ha vinculado con la hipertrofia miocárdica patológica, la disfunción cardíaca postinfarto y la aterosclerosis.

En modelos preclínicos, la inhibición parcial y selectiva de mTORC1 ha demostrado la capacidad de reducir el tamaño del infarto miocárdico, mejorar el remodelado cardíaco funcional y atenuar la hipertrofia cardíaca patológica en respuesta a la sobrecarga de presión (254). Estos efectos se atribuyen, en parte, a la inducción de la autofagia, que facilita la eliminación de proteínas y orgánulos dañados, así como a la reducción de la proliferación de células de músculo liso vascular y la inflamación en el contexto aterosclerótico (125,255,256). En la práctica clínica, los inhibidores de mTOR ya se utilizan en los *stents* liberadores de fármacos para reducir la re-estenosis y en pacientes con trasplante cardíaco para mitigar la vasculopatía del aloinjerto (257–259).

1.5.4.2. Desafíos y consideraciones para la traslación clínica

A pesar de los resultados prometedores, la traslación de la modulación de mTOR a la práctica clínica para el envejecimiento saludable presenta varios desafíos:

- **Efectos secundarios:** Los efectos inmunosupresores y metabólicos de la rapamicina y sus análogos en humanos requieren un balance cuidadoso entre los beneficios y los riesgos, especialmente para el uso a largo plazo en individuos sanos. La investigación se dirige hacia la identificación de regímenes de dosificación optimizados (por ejemplo, dosificación intermitente), terapias combinadas o el desarrollo de nuevos moduladores con perfiles de seguridad mejorados (218,224,260).
- **Selectividad de complejos:** El desarrollo de inhibidores específicos para mTORC1 o mTORC2 podría ofrecer una mayor selectividad y reducir los efectos fuera de objetivo, permitiendo una modulación más precisa de las vías de señalización.
- **Heterogeneidad del envejecimiento:** El envejecimiento es un proceso multifactorial y heterogéneo. La respuesta a la modulación de mTOR puede variar entre individuos, lo que subraya la necesidad de enfoques de medicina personalizada, basados en perfiles genéticos y biomarcadores.

mTOR es una diana terapéutica prometedora para el envejecimiento y las enfermedades asociadas a la edad. Desde su descubrimiento como objetivo de la rapamicina, ha revelado ser un nexo central en la integración de señales celulares que regulan la fisiología a múltiples niveles. La modulación genética y farmacológica de mTOR ha demostrado consistentemente su capacidad para extender la esperanza de vida y el HALE en diversos organismos modelo. Aunque quedan desafíos importantes en la traslación clínica, el continuo avance en la comprensión de sus mecanismos de señalización y el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas abren un camino prometedor hacia intervenciones efectivas para mejorar la salud y la longevidad humanas en el futuro.

1.6. LIMITACIONES ACTUALES EN EL TRATAMIENTO DEL ENVEJECIMIENTO

1.6.1. Falta de evidencia clínica en la modulación del envejecimiento

Una de las principales limitaciones en el campo de la investigación sobre el envejecimiento es la dificultad de trasladar los prometedores hallazgos obtenidos en estudios preclínicos, particularmente aquellos realizados en modelos animales, a ensayos clínicos exitosos en humanos (261–263). Esta brecha traslacional se debe a una serie de factores complejos, comenzando por las diferencias fundamentales en la fisiología, la anatomía y el metabolismo entre los animales de laboratorio y los seres humanos. Los modelos animales, a pesar de su utilidad para la investigación mecanicista inicial, a menudo no replican con precisión la complejidad del proceso de envejecimiento humano ni la manifestación de enfermedades relacionadas con la edad (264). De hecho, muchas afecciones que afectan a los humanos, como los trastornos neuropsiquiátricos, ciertos tipos de cáncer o la enfermedad de Alzheimer, son específicas de la especie, lo que limita la aplicabilidad directa de los resultados animales a la especie humana (263,264).

La alarmante estadística de que más de nueve de cada diez fármacos que muestran resultados prometedores en estudios con animales terminan fallando en los ensayos clínicos subraya la necesidad de adoptar enfoques de investigación más centrados en el ser humano (265).

Las variaciones genéticas, incluso dentro de una misma especie, como se ha observado en estudios con gusanos, pueden llevar a respuestas diferentes ante una misma intervención, lo que sugiere una variabilidad aún mayor en la población humana (266). Esta heterogeneidad resalta las limitaciones de depender exclusivamente de modelos animales para la investigación del envejecimiento y la necesidad de desarrollar estrategias que consideren la complejidad biológica humana.

Por otro lado, el diseño y la ejecución de ensayos clínicos dirigidos a intervenciones anti-envejecimiento en poblaciones humanas presentan desafíos inherentes. La propia naturaleza heterogénea del envejecimiento en humanos, donde los individuos envejecen a ritmos diferentes y experimentan una variedad de condiciones relacionadas con la edad, dificulta la definición de poblaciones de estudio homogéneas y la medición de efectos consistentes de las intervenciones (267,268). Además, la larga esperanza de vida de los seres humanos exige ensayos clínicos prolongados para evaluar el impacto de las intervenciones en los resultados relacionados con el envejecimiento, lo que conlleva importantes desafíos logísticos y financieros.

La dificultad para reclutar y retener a adultos mayores en los estudios de investigación, debido a problemas de movilidad, falta de transporte y deterioro de la salud física y cognitiva, también complica la obtención de evidencia clínica sólida (268,269). El uso de informes de terceros (*proxies*), a menudo necesario para adultos mayores con deterioro cognitivo, introduce posibles sesgos e imprecisiones en los datos recopilados (270).

En contraste con los ensayos típicos centrados en enfermedades específicas, los ensayos de longevidad idealmente deberían tener criterios de inclusión amplios, abarcando incluso a individuos con comorbilidades, lo que requiere enfoques novedosos para el diseño de ensayos

(15,271). Las consideraciones éticas y las dificultades prácticas para realizar ensayos en poblaciones frágiles o muy ancianas también contribuyen a la escasez de evidencia clínica en la modulación del envejecimiento humano (272).

A pesar de estos desafíos, la investigación preclínica ha identificado numerosas intervenciones potenciales que se dirigen a diversas claves del envejecimiento, pero la evidencia clínica robusta en humanos sigue siendo limitada para muchas de ellas (26,267,273,274). Intervenciones como el ejercicio y ciertas modificaciones dietéticas, como la RC, cuentan con una evidencia más sólida en cuanto a la promoción de un envejecimiento saludable en humanos, aunque los mecanismos precisos y los efectos a largo plazo aún se están investigando (36,37,275,276).

El surgimiento de fármacos senolíticos, senomorfos, y terapias frente a mTOR ofrecen vías prometedoras para modular mecanismos específicos del envejecimiento en humanos, pero se necesitan más investigaciones y ensayos clínicos a mayor escala para confirmar su eficacia y seguridad (268,277). Algunos fármacos ya en uso clínico para otras indicaciones, como la metformina y la rapamicina, también están siendo explorados por su potencial para influir en los procesos de envejecimiento, lo que requiere ensayos clínicos diseñados específicamente para evaluar estos efectos en humanos (222,230,278).

1.6.2. Falta de biomarcadores para ensayos clínicos en envejecimiento

Los biomarcadores desempeñan un papel fundamental en la investigación del envejecimiento, ya que ofrecen la posibilidad de medir la edad biológica y evaluar la eficacia de las intervenciones antienvjecimiento de manera más eficiente que los estudios de larga duración basados en resultados clínicos tradicionales (221,279,280). Estos marcadores biológicos pueden proporcionar indicadores tempranos del proceso de envejecimiento y de la respuesta a las terapias, lo que permite a los investigadores monitorizar rápidamente el impacto de una intervención sin la necesidad de ensayos que duren décadas.

Al cuantificar la edad biológica, los biomarcadores pueden servir como criterios de valoración sustitutos en los ensayos clínicos, lo que podría reducir significativamente su duración y costo (15,221). Un ejemplo destacado son los relojes epigenéticos, basado en patrones de metilación del ADN, que han demostrado una alta correlación con la edad cronológica, pero con una relación causal con el envejecimiento aún por determinar (281–283).

La identificación y validación de biomarcadores del envejecimiento son necesarias para acelerar la investigación sobre intervenciones antienvjecimiento en humanos. A pesar de su importancia crítica, la identificación y validación de biomarcadores confiables del envejecimiento se enfrentan a varias limitaciones y desafíos. La complejidad del proceso de envejecimiento, que involucra múltiples vías biológicas interconectadas, dificulta la identificación de marcadores individuales que puedan capturar de manera integral la tasa general de envejecimiento (279,284). La validación clínica de los biomarcadores propuestos sigue siendo un desafío, en gran parte debido a la falta de validación entre poblaciones y a las inconsistencias en las estructuras de los conjuntos de datos. El proceso de validación a menudo carece de financiación suficiente debido a la insuficiencia de incentivos comerciales para las empresas. Además, las vías de aprobación regulatoria para los biomarcadores son complejas y lentas, lo que dificulta la translación de candidatos prometedores en herramientas validadas

clínicamente (284–286). La falta de protocolos estandarizados y el intercambio limitado de datos entre investigadores y empresas también dificultan la validación de posibles biomarcadores en diferentes estudios y poblaciones, lo que restringe su utilidad clínica (287,288).

A pesar de estos desafíos, se han identificado varios candidatos prometedores a biomarcadores, y se está progresando en su desarrollo y validación (221,285,289). La Tabla 3 proporciona ejemplos de posibles biomarcadores del envejecimiento y sus limitaciones actuales.

Tabla 3 Ejemplos de biomarcadores del envejecimiento y estado del arte.

Categoría del biomarcador	Ejemplos específicos	Limitaciones
Relojes epigenéticos	<i>Horvath's age,</i> <i>Hannum's age,</i> <i>PhenoAge,</i> <i>GrimAge</i>	Prometedor; algunos muestran correlación con resultados de salud y esperanza de vida; se necesita más validación en diversas poblaciones y contextos de intervención (292–295).
Telómeros	Longitud de los telómeros	Se podría asociar a algunas enfermedades relacionadas con la edad. La variabilidad en las mediciones y sensibilidad a factores de confusión limita su utilidad (296,297).
Proteínas séricas	GDF-15, STC1, SERPINs	Algunas muestran asociaciones con la edad, la fragilidad y el riesgo de mortalidad. Es necesario estandarizar su medición y establecer la utilidad clínica (64).
Metabolitos	Ácido úrico, niveles de NAD ⁺	Algunos metabolitos parecen mostrar cambios con la edad, pero necesitan una mayor validación y comprensión para tener una utilidad clínica real (298,299).
Marcadores de senescencia celular	p16 ^{INK4a} , SA-β-Gal	Utilizados principalmente en investigación preclínica sobre senescencia, la medición en tejidos sigue siendo un desafío. Requiere técnicas de muestreo invasivas (300,301).
Marcadores funcionales/fisiológicos	Velocidad de la marcha, fuerza de agarre, biomarcadores de imagen cerebral	Reflejan el declive funcional asociado con la edad; útiles como medidas de resultados, pero pueden no capturar los mecanismos biológicos subyacentes del envejecimiento (17,100).

El campo se está moviendo hacia enfoques multiómicos, integrando datos de genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica para desarrollar biomarcadores del envejecimiento más completos y precisos (290,291). Se están realizando esfuerzos continuos para establecer marcos estandarizados y criterios de validación para garantizar la fiabilidad y la utilidad clínica de los biomarcadores del envejecimiento.

La selección y definición de puntos finales relevantes y significativos para los ensayos clínicos de intervenciones antienvjecimiento en humanos representan otro desafío importante. Tradicionalmente, los ensayos clínicos se han centrado en resultados específicos, como la incidencia de una enfermedad en particular o la mortalidad por una causa específica. Sin embargo, el envejecimiento es un proceso complejo y multifactorial que aumenta el riesgo de diversas enfermedades crónicas y deterioros funcionales, lo que dificulta la identificación de un único punto final primario que capture de manera integral los efectos de una intervención antienvjecimiento (302,303).

Una estrategia prometedora es el uso de puntos finales compuestos, que combinan varios resultados clínicamente relevantes en una única medida. Estos puntos pueden incluir la incidencia de múltiples enfermedades relacionadas con la edad (como enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedad de Alzheimer), la discapacidad, la fragilidad y la mortalidad (15,302). La ventaja de los puntos finales compuestos es que pueden capturar el impacto general de una intervención sobre el proceso de envejecimiento, pero su interpretación puede ser más compleja y el peso relativo de cada componente debe definirse cuidadosamente.

1.6.3. Avances en modelos *in vitro* para el estudio del envejecimiento

Los modelos *in vitro* actuales, especialmente los sistemas tridimensionales como organoides y *organ-on-chip*, se están consolidando como herramientas clave para el desarrollo de intervenciones destinadas a retrasar el envejecimiento. Estos modelos reproducen de forma precisa la estructura tisular, la heterogeneidad celular y las interacciones del microambiente, lo que permite observar cambios relacionados con el envejecimiento, como la acumulación de funciones alteradas y deterioro del tejido, reflejando con mayor fidelidad la fisiología humana que los modelos animales tradicionales (304–306).

Los modelos 2D de cultivos primarios ofrecen una herramienta accesible, reproducible y fisiológicamente relevante para estudiar procesos celulares en un entorno controlado. Los cultivos primarios conservan en gran medida las características fenotípicas y funcionales del tejido de origen, lo que los hace especialmente útiles para investigar fenómenos asociados al envejecimiento humano, como la senescencia replicativa. Aunque presentan limitaciones en cuanto a complejidad tridimensional y microambiente, su simplicidad permite aislar variables experimentales y facilita el análisis mecanístico detallado, sentando las bases para validar hipótesis antes de pasar a modelos más complejos (307–309).

Por su parte, los organoides derivados de células humanas han demostrado su capacidad para modelar procesos específicos del envejecimiento, como la agregación patológica de proteínas, disfunción de células madre y alteraciones epigenéticas asociadas. Esto los convierte en herramientas muy útiles para identificar biomarcadores tempranos, y evaluar moduladores farmacológicos en un contexto humano-relevante (304,310). La posibilidad de realizar pruebas

tempranas de seguridad y eficacia en sistemas humanos complejos mejora la translación a posibles aplicaciones clínicas antes de avanzar a ensayos clínicos.

La posibilidad de desarrollar organoides a partir de células de pacientes representa un avance crucial hacia la medicina personalizada, especialmente en el contexto del envejecimiento y las enfermedades asociadas. Estos modelos tridimensionales, derivados de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, del inglés *induced Pluripotent Stem Cells*) o de células madre adultas, permiten recrear *in vitro* la arquitectura y función de órganos humanos de manera más fiel que los modelos tradicionales, conservando las características genéticas del paciente y habilitando el diagnóstico y tratamiento individualizado (311,312).

Los modelos *in vitro* basados en microfluídica, como los sistemas *organ-on-chip*, representan una evolución significativa en el modelado fisiológico de tejidos y órganos humanos. Estos dispositivos integran micro-canales controlados con precisión que permiten simular flujos sanguíneos, gradientes químicos y fuerzas mecánicas, reproduciendo de forma más realista el microambiente celular (313). A diferencia de los cultivos estáticos convencionales, los sistemas microfluídicos permiten estudiar procesos dinámicos clave como la respuesta al estrés mecánico, la migración celular, la interacción entre tejidos o la difusión de nutrientes y fármacos (314–317). En el contexto del envejecimiento, estos modelos ofrecen una plataforma para analizar cómo los tejidos humanos responden a factores degenerativos en condiciones que imitan el entorno fisiológico real, y permiten evaluar intervenciones en tiempo real sobre células derivadas de humanos, incluso de pacientes concretos (318). Así, la microfluídica abre nuevas vías para entender y modular el envejecimiento humano con mayor precisión y relevancia traslacional.

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2. Justificación e hipótesis

El envejecimiento es el principal factor de riesgo para la mayoría de las enfermedades crónicas no transmisibles. Esta realidad ha llevado a considerar el envejecimiento como el "techo biológico" de la medicina moderna, ya que constituye el sustrato común que impulsa el desarrollo y la progresión de múltiples patologías (32).

La identificación de mecanismos causales ha permitido el desarrollo de intervenciones dirigidas a procesos moleculares específicos del envejecimiento (271). Un ejemplo destacado es la identificación de la senescencia celular como un impulsor clave de la disfunción tisular relacionada con la edad, así como herramientas terapéuticas frente a ella (senolíticos y senomorfos) (273,319).

La investigación sobre el envejecimiento y su tratamiento en humanos se encuentra en una etapa crucial y prometedora, aunque existen importantes cuestiones abiertas que deben abordarse para traducir estos conocimientos en intervenciones efectivas que mejoren la salud y la calidad de vida en la edad avanzada. La falta de evidencia clínica sólida en humanos para muchas intervenciones prometedoras, la ausencia de biomarcadores validados para medir la edad biológica y la respuesta al tratamiento, y la dificultad para definir y medir biomarcadores y puntos finales clínicos relevantes representan desafíos significativos.

Las herramientas *in vitro* son clave para afrontar estos desafíos. Los ensayos en células humanas, en particular, permiten estudiar el impacto mecanístico de las intervenciones en un entorno fisiológicamente relevante (271,320).

Las células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC, del inglés *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) son una herramienta inestimable para el estudio de la función endotelial. Estas células mantienen el fenotipo y funciones endoteliales clave en cultivo, y presentan un potencial replicativo limitado que recapitula la acumulación de células senescentes observada con la edad (307–309,321). La incorporación de otros tipos celulares, como células inmunitarias, ofrece una perspectiva integradora de las interacciones celulares en el contexto de la senescencia endotelial (322,323).

La rapamicina es uno de los fármacos más estudiados por sus efectos prolongevidad, con resultados robustos y consistentes en numerosos modelos celulares y animales (41,207,220,324). Los efectos de la rapamicina sobre el estrés celular y la senescencia están bien descritos, pero el uso crónico e ininterrumpido se asocia a efectos secundarios que limitan su potencial frente al envejecimiento, como la inmunosupresión, la desregulación en la glucemia, o la dislipidemia (180,325,326).

La hipótesis de este trabajo es que el tratamiento intermitente con rapamicina puede constituir una alternativa adecuada al tratamiento crónico para el envejecimiento, con el potencial de reducir o eliminar los efectos adversos, manteniendo los efectos antisenescentes en células HUVEC sometidas a estrés replicativo. La menor acumulación de células senescentes y la reducción del SASP asociado tiene potencial traslacional para la prevención de enfermedades cardiovasculares asociadas a la edad.

3. OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1. OBJETIVOS

3.1.1. Objetivo general

Se plantea evaluar el impacto del tratamiento intermitente con rapamicina (10 nM, 24 h/semana) sobre los mecanismos moleculares, celulares y funcionales asociados a la senescencia replicativa y a la identidad endotelial en células HUVEC, así como su efecto en la modulación del estrés oxidativo, el SASP y la interacción con células inmunes. Para alcanzar este objetivo general se proponen los siguientes objetivos específicos:

3.1.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar los cambios en diferentes rutas de señalización en células HUVEC, incluyendo dianas de mTORC1, mTORC2, rutas relacionadas como MAPK y eNOS, y marcadores de autofagia como Beclina-1, p62 y LC3.
2. Analizar el efecto sobre la progresión de la senescencia replicativa en cultivos primarios de células HUVEC, mediante el estudio de la duración del cultivo, la proliferación, el perfil del ciclo celular y la expresión de marcadores clásicos de senescencia (SA- β -Gal, p16^{INK4a}, p21^{Cip1}).
3. Evaluar el impacto sobre la identidad fenotípica y la funcionalidad endotelial, mediante la determinación de la expresión de marcadores endoteliales específicos (PECAM-1, VE-cadherina, vWF), la capacidad migratoria de las células, y la habilidad para formar nuevos vasos.
4. Caracterizar el efecto del tratamiento a largo plazo sobre el estrés oxidativo y el SASP, mediante la cuantificación de la producción de ERO, NO, y moléculas proinflamatorias y de adhesión.
5. Determinar la influencia del medio condicionado (MC) derivado de células HUVEC senescentes con y sin tratamiento sobre la activación de monocitos THP-1 expuestos al SASP, evaluando cambios en la expresión de marcadores de activación y adhesión.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. Material y métodos

4.1. MATERIALES

- Líneas celulares
 - HUV-EC-C (ATCC, ref. CRL-1730)
 - MRC-5 (ATCC, ref. CCL-171)
 - THP-1 (ATCC, ref. TIB-202)
- Medios de cultivo y suplementos
 - Gelatina (SigmaAldrich, ref. G6144)
 - Geltrex™ (Gibco, ref. A1413201)
 - Medio de crecimiento endotelial-2 (EGM-2, del inglés *Endothelial Growth Medium-2*) (Lonza, ref. CC-3162)
 - Medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM, del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Corning, ref. 10-013-CV)
 - Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) (Corning, ref. 10-040-CV)
 - Penicilina/estreptomicina (Corning, ref. 30-002-CI)
 - Suero fetal bovino (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*) (Corning, ref. 35-015-CV)
 - Tripsina-Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0,05 % v/v (GIBCO, ref. 25300062)
- Fármacos
 - Rapamicina (MedChemExpress Cat. No.: HY-10219)
- Kits comerciales
 - *Array* de citocinas humanas (Abcam, ref. ab133998)
 - Kit de síntesis de primera cadena (ThermoScientific, ref. K1622)
 - Kit de tinción SA- β -Gal (Cell Signaling Technology, ref. #9860)
 - NZYtaq II 2 \times Green Master Mix (NZYtech ref. MB35802)
 - SYBR Green Master Mix (K0392, ThermoScientific, ref. K0392)

- Reactivos
 - Albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*) (ThermoScientific, ref. 268135000)
 - Aprotinina (SigmaAldrich, ref. A6279)
 - Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, ref. D1435)
 - Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMFS) (Sigma-Aldrich, ref. 36978)
 - GreenSafe Premium (NZYtech, ref. MB13201)
 - HOECHST 33258 (Sigma, ref. 94403)
 - NZYol (NZYtech, ref. MB18501)
 - Ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) (Sigma-Aldrich, ref. 450243)
 - Papel autoadhesivo (Axygen® UltraClean Sealing Film, UC-500, Corning)
 - Placas de 384 pocillos para PCR (Sigma-Aldrich, ref. BR781346)
 - Reactivo de Bradford (Bio-Rad, ref. #5000006)
 - Sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA) (Sigma, ref. D6883)
 - Sonda diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM) (ThermoFisher, ref. D23844)
 - Sustrato quimioluminiscente Pierce™ ECL (ThermoScientific, ref. 32106)
 - Triton X100 (Sigma-Aldrich, ref. 282103)
- Anticuerpos (Tabla 4)
- *Primers* (Tabla 5)
- Otros
 - Membranas de transferencia PVDF (Bio-Rad, ref. 1620177)
 - Películas fotográficas Super RX-N (Fujifilm)
- El resto de los reactivos empleados fueron de grado analítico.

Tabla 4 Anticuerpos utilizados en western blot e inmunocitoquímica.

Diana	Dilución	Casa comercial	Referencia
α -SMA	1:500	Sigma	F3777
AKT1	1:1000	Cell Signaling	2938
pAKT1 ^{S473}	1:1000	Abcam	ab81283
Beclin-1	1:1000	Abcam	ab207612
EKR1/2	1:1000	Proteintech	66192-1-Ig
pERK1/2	1:1000	Santa Cruz	sc-136521
GADPH	1:1000	SantaCruz	sc-47724
ICAM-1	1:1000	Santa Cruz	sc-8439
IgG anti-conejo HRP	1:5000	Cell Signaling	7074S
IgG anti-ratón Alexa Fluor™ 680	1:1000	Thermofisher	A-21058
IgG anti-ratón HRP	1:5000	Cell Signaling	7076S
peNOS ^{S1177}	1:1000	BD Labs	612393
eNOS	1:1000	BD Labs	612393
LC3	1:1000	CellSignaling	12741S
p16 ^{INK4a}	1:1000	Abcam	ab270058
p21 ^{Cip1}	1:1000	Abcam	ab109520
p62	1:1000	Cell Signaling	5114T
S6K	1:1000	Cell Signaling	34475
pS6K ^{T389}	1:1000	Cell Signaling	9205
VCAM-1	1:1000	Santa Cruz	sc-13160
VE-cadherina	1:200	SantaCruz	sc-9989

Tabla 5 Lista de primers utilizados en PCR semi-cuantitativa y RT-qPCR.

Gen	Secuencia	Tm	Tamaño (pb)
ACTB	s: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'	60,5 °C	234
	a: 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'		
CDKN1A	s: 5'-CAGGTCCACATGGTCTTCCT-3'	59,0 °C	172
	a: 5'-GACACCACTGGAGGGTGACT-3'		
CDKN2A	s: 5'-GCGCTGCCCATCATCATG-3'	59,0 °C	58
	a: 5'-CCAACGCACCGAATAGTTACG-3'		
CXCL8	s: 5'-TTTGCTTGAAGTTTCACTGG-3'	54,0 °C	89
	a: 5'-GTTTTTGAAGAGGGCTGAG-3'		
ICAM1	s: 5'-GTGGCTTGTGTGTTTCGGTTTCATG-3'	63,0 °C	132
	a: 5'-GGTAGCAGCCGCAGTCATAATGG-3'		
IL6	s: 5'-GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC-3'	60,0 °C	81
	a: 5'-GGTACATCCTCGACGGCATCT-3'		
PECAM1	s: 5'-TAAAACGCGGTCCTGTTTCCT-3'	60,6 °C	171
	a: 5'-GGGATCGTGAGGGTCAACTG-3'		
TAGLN	s: 5'-CACCTTCACCGGCTTGGA-3'	60,4 °C	63
	a: 5'-GGCGTGATTCTGAGCAAGCT-3'		
VCAM1	s: 5'-CCTCATTGTCACCTTCCCATTTCAG-3'	63,0 °C	96
	a: 5'-TCTCATTGACTTGCAGCACCCACAG-3'		
vWF	s: 5'-GCACCATAAACGTTGACTTCCA-3'	62,6 °C	95
	a: 5'-GTCGAGCTGCACAGTGACATG-3'		

4.2. CULTIVO CELULAR

4.2.1. Cultivo de células HUVEC

Las células HUVEC se aislaron a partir de cordones umbilicales de pacientes sanos siguiendo un protocolo previamente descrito (327,328), con algunas modificaciones. La autorización para la extracción y utilización se adjunta en el Anexo I.

La vena umbilical se canuló con una aguja roma y se lavó con tampón fosfato salino (PBS, del inglés, *Phosphate-Buffered Saline*) para eliminar restos de sangre. A continuación, se selló el extremo inferior del cordón y se inyectó una solución de tripsina-EDTA al 0,05 % v/v hasta llenar completamente la vena. Se tapó la aguja, y se incubó durante 10 minutos a 37 °C para facilitar la digestión enzimática.

Finalizada la digestión, se cortó el extremo inferior del cordón, y se recogió la suspensión celular en tubos cónicos de 50 mL. Se neutralizó la tripsina añadiendo un volumen equivalente de medio EGM-2 y se centrifugó la suspensión a 200 RCF durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras descartar el sobrenadante, se resuspendió el pellet celular en medio EGM-2 y se sembró en placas Petri previamente recubiertas con gelatina. Este cultivo primario se consideró pase 0.

Los cultivos primarios se mantuvieron en un incubador a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Una vez alcanzado el 80 % de confluencia, las células se subcultivaron en una proporción 1:2, estableciendo así el pase 1 de cada línea celular. A partir de ese momento, se realizaron subcultivos de forma rutinaria al alcanzar 80–90 % de confluencia, sembrando 5×10^5 células por placa en cada pase. El cultivo se mantuvo hasta el agotamiento proliferativo de las líneas celulares.

4.2.2. Diseño experimental

Para evaluar el efecto del tratamiento sobre la progresión de la senescencia replicativa en cultivos primarios de células HUVEC, se obtuvieron líneas celulares independientes de diez donantes sanos. A partir del pase 3, cada línea se dividió en dos condiciones experimentales: un cultivo tratado con rapamicina (10 nM, 24 h/semana) y otro tratado con el vehículo dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,0001 %. En todos los casos, se evitó el tratamiento de los cultivos al menos 48 horas antes de la realización de los experimentos. Los cultivos se mantuvieron hasta el cese de la replicación.

La duración de los cultivos se cuantificó como el nivel de duplicaciones poblacionales (PDL, del inglés *Population Doubling Level*) alcanzado hasta el cese de la proliferación. En los pases 4, 10, 14 y 18 se analizaron marcadores de senescencia, proliferación y ciclo celular, identidad y función endotelial, así como estrés oxidativo y actividad secretora proinflamatoria (Figura 6).

Para evaluar el estado proliferativo de los cultivos en el momento de cada experimento, se analizó el PDL en los pases 4, 10, 14 y 18 de cada cultivo, comparando los valores de PDL

entre grupos en cada pase. El PDL en cada pase calculó como la suma de duplicaciones poblacionales (PD, del inglés *Population Doubling*).

El número de PD en cada pase del cultivo se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$PD_i = \frac{\log_{10} F_i - \log_{10} I_i}{0,301}$$

donde F_i representa el número de células recolectadas al final del pase i , e I_i el número de células sembradas al inicio de este, mientras que 0,301 es el $\log_{10}(2)$. Para cada línea se estimó un porcentaje de adhesión del 80 % (329).

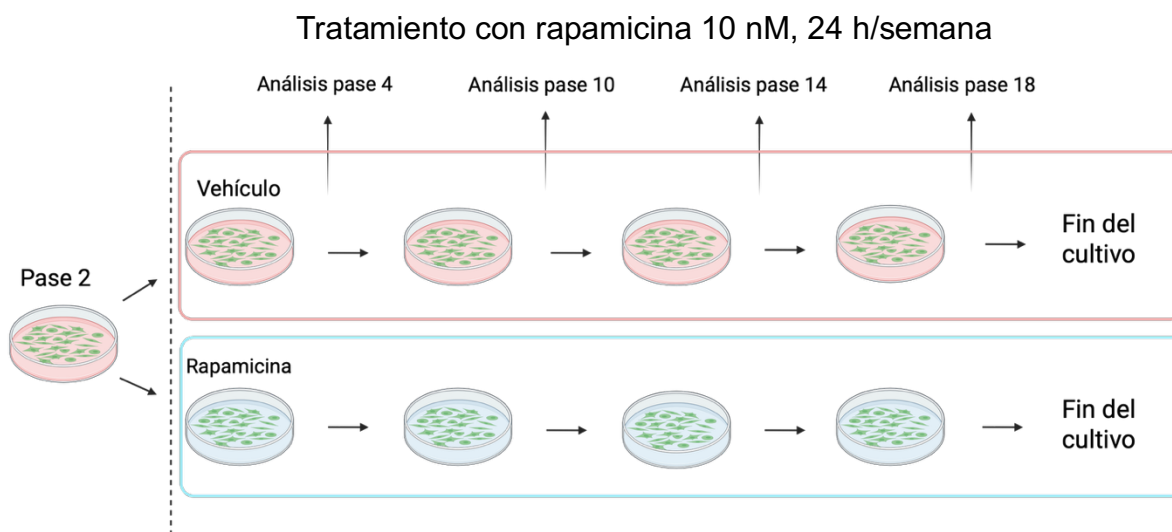


Figura 6 Esquema del diseño experimental.

Cada línea de células HUVEC empleada se dividió en dos cultivos; uno de ellos tratado con rapamicina (10 nM, 24h/semana) y otro control tratado con vehículo (DMSO al 0,0001 %). Los cultivos se mantuvieron hasta el cese de la replicación. En los pases 4, 10, 14 y 18 se evaluaron marcadores de senescencia celular, proliferación y ciclo celular, identidad y función endotelial, estrés oxidativo y SASP.

El MC se obtuvo a partir del cultivo rutinario de células HUVEC, tras la exposición durante 48 horas a las células y en ausencia de fármaco o vehículo. Posteriormente, se centrifugó a 300 RCF durante 5 minutos para eliminar posibles restos celulares y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

4.2.3. Cultivo de células THP-1, MRC-5 y HUV-EC-C

La línea monocítica humana **THP-1** se cultivó en frascos T75 en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de FBS, penicilina (100 µg/mL) y estreptomicina (100 UI/mL). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada, con 5 % de CO₂.

Las células se subcultivaron dos veces por semana mediante dilución en una proporción 1:10. Para la realización de los experimentos, los monocitos THP-1 se sembraron atendiendo a los requerimientos específicos de cada técnica, según se describe en las secciones correspondientes, y se incubaron durante 24 h con MC y medio RPMI completo en una proporción 1:1.

La línea fibroblástica embrionaria humana **MRC-5** se cultivó en placas Petri con medio DMEM suplementado con 10 % de FBS, penicilina (100 µg/mL) y estreptomicina (100 UI/mL), manteniéndose en condiciones estándar de cultivo (37 °C, 5 % CO₂). Las células se subcultivaron una vez por semana en una proporción 1:2.

Las células **HUV-EC-C** se cultivaron siguiendo el mismo protocolo empleado para las células HUVEC primarias.

4.3. WESTERN BLOT

4.3.1. Extracción de proteínas

Las células HUVEC se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 10⁴ células/cm² y se mantuvieron hasta alcanzar la confluencia. Los monocitos THP-1 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 10⁵ células/mL para un volumen final de 2 mL, y se incubaron con MC según lo descrito en el apartado 4.2.3.

Para la caracterización de las rutas relacionadas con mTOR y autofagia, se recogieron muestras en tres tiempos: a las 24 horas de tratamiento (día 1), 48 horas tras retirar el tratamiento (día 3) y 6 días tras retirar el tratamiento (día 7).

Para la extracción de proteínas de células HUVEC, las monocapas confluentes se lavaron con PBS frío sobre hielo y se lisaron con un tampón de lisis (Tabla 6).

Tabla 6 Componentes del tampón de lisis celular.

Reactivo	Concentración
Aprotinina (Sigma-Aldrich)	0,03 % v/v
EDTA (Sigma-Aldrich)	1 mM
NaCl (Sigma-Aldrich)	150 mM
NaF (Sigma-Aldrich)	50 mM
Na ₃ VO ₄ (Sigma-Aldrich)	1 mM
PMSF (Sigma-Aldrich)	1 mM
Tris-HCl (Sigma-Aldrich)	50 mM (pH 7,5)
Triton-X 100 (Sigma-Aldrich)	1 % v/v

Para facilitar la lisis celular, el tapiz celular se desprendió utilizando la punta invertida de una micropipeta y la muestra se homogeneizó mediante pipeteo. A continuación, se centrifugó el homogenado a 7.260 RCF durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante con las proteínas se transfirió a un nuevo vial, descartando el pellet, y se conservó a -20 °C hasta su uso.

Para la extracción de proteínas de los monocitos THP-1, cultivados en suspensión, las células se recogieron en tubos cónicos y se centrifugaron a 200 RCF durante 5 minutos a 4 °C. Posteriormente el pellet celular se lavó con PBS frío sobre hielo y se resuspendió en tampón de lisis. La suspensión se homogeneizó mediante agitación en vórtex para facilitar la lisis celular, continuándose después con el mismo procedimiento descrito previamente para las HUVEC.

4.3.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford utilizando un espectrofotómetro BioMate™ 3 (Thermo Electron). Las lecturas de absorbancia ($\text{Ex} = 595 \text{ nm}$) se interpolaron con una curva de calibración generada con BSA como patrón.

4.3.3. Separación por electroforesis en gel SDS-PAGE

Las proteínas se separaron por tamaño en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se cargaron 10 μg de proteína por pocillo, y se llevó a cabo una electroforesis en dos etapas:

1. Apilamiento: 30 minutos a 50 V para concentrar las proteínas en la parte superior del gel.
2. Separación: 75 minutos a 130 V para la resolución por tamaño molecular.

4.3.4. Transferencia a membranas de PVDF, bloqueo e incubación con anticuerpos

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando un sistema semi-seco Hoefér® SemiPhor™ (Pharmacia Biotech) a 38 mA durante 90 minutos.

Las membranas se bloquearon con una solución de BSA al 5 % p/v en TBS-T 0,2 % durante 2 horas a temperatura ambiente para evitar uniones inespecíficas. Posteriormente, se cortaron según el marcador de peso molecular y se incubaron durante la noche a 4 °C en agitación con el anticuerpo primario correspondiente, preparado en la solución de bloqueo.

Al día siguiente, se recuperaron los anticuerpos primarios y se realizaron lavados de las membranas con TBS-T 0,2 %. Posteriormente, cada membrana se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de lavados adicionales antes del revelado.

Los anticuerpos empleados se detallan en la Tabla 4.

4.3.5. Revelado y análisis densitométrico

Las membranas se secaron brevemente sobre papel de filtro y se incubaron durante 1 minuto con el sustrato quimioluminiscente Pierce™ ECL en oscuridad.

Posteriormente, se montaron en un casete de revelado Hypercassette™ (Amersham Life Science) y se expusieron a películas fotográficas Super RX-N (Fujifilm). Tras la exposición, las películas se revelaron e incubaron secuencialmente con solución de revelado y fijador durante 1 minuto cada una. Finalmente, las imágenes obtenidas se digitalizaron mediante escaneo y se analizaron densitométricamente utilizando el software ImageJ (NIH). Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias tras normalización por el control de carga (GAPDH).

4.4. RT-PCR Y RT-QPCR

Las células HUVEC, MRC-5 y HUV-EC-C se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 10^4 células/cm² y se cultivaron hasta alcanzar la confluencia. Los monocitos THP-1 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 10^5 células/mL para un volumen final de 2 mL, y se incubaron con MC según lo descrito en el apartado 4.2.3.

4.4.1. Extracción de ARN

Las monocapas celulares confluentes de HUVEC, MRC-5 y HUV-EC-C se lavaron con PBS frío sobre hielo y se lisaron con 800 μ L de reactivo NZYol. Las muestras homogeneizadas se recogieron en un vial, donde se incubaron en NZYol durante 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 160 μ L de cloroformo (CHCl₃), se mezclaron por inversión y se dejaron reposar durante 3 minutos. Una vez separadas las fases, las muestras se centrifugaron a 12.000 RCF durante 15 minutos a 4 °C.

Para el aislamiento del ARN, se recogió la fase acuosa en un nuevo vial y se añadieron 400 μ L de isopropanol. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a -20 °C y se centrifugaron nuevamente a 12.000 RCF durante 15 minutos a 4 °C.

Tras descartar el sobrenadante por decantación, el pellet de ARN se lavó con 800 μ L de etanol 75 % en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y se centrifugó a 12.000 RCF durante 10 minutos a 4 °C. Este proceso de lavado se realizó dos veces.

Finalmente, se eliminó el etanol residual y se dejó secar el pellet al aire durante 10 minutos. Una vez seco, el ARN purificado se resuspendió en 50 μ L de H₂O MilliQ estéril tratada con DEPC y se cuantificó mediante espectrofotometría NanoDrop (ThermoFisher). Las muestras de ARN se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Para la extracción de ARN de los monocitos THP-1, cultivados en suspensión, las células se recogieron en tubos cónicos, se centrifugaron a 200 RCF durante 5 minutos a 4 °C, y se lavaron con PBS frío sobre hielo. El pellet celular se resuspendió en NZYol y se homogeneizó mediante agitación en vórtex para facilitar la lisis. El resto del proceso se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito previamente para las HUVEC.

4.4.2. Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando un kit de síntesis de primera cadena, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada reacción, se utilizaron 250 ng de ARN, ajustando el volumen final a 16,5 μL con H_2O MilliQ estéril tratada con DEPC.

A cada muestra se añadieron los reactivos del kit, incluyendo:

- Enzima retrotranscriptasa MMLVRevertAid 200 U/ μL
- Hexámeros aleatorios como cebadores 100 μM
- Inhibidor de RNAsas 20 U/ μL
- Mezcla de dNTPs 10 mM
- Tampón de reacción
 - Tris-HCl pH 8,3 250 mM
 - KCl 250 mM
 - MgCl_2 20 mM
 - DTT 50 mM

La mezcla de reacción se sometió a las condiciones especificadas en la Tabla 7 en un termociclador SureCycler 8800 (Agilent Technologies). El ADNc sintetizado se conservó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso en los ensayos posteriores.

Tabla 7 Condiciones de síntesis de ADNc

Etapas	Temperatura	Tiempo
Incubación inicial	25 $^\circ\text{C}$	5 minutos
Elongación	42 $^\circ\text{C}$	60 minutos
Desnaturalización	70 $^\circ\text{C}$	5 minutos

4.4.3. PCR semi-cuantitativa en gel de agarosa

Para la PCR semi-cuantitativa se empleó el reactivo NZYtaq II 2 \times Green Master Mix. La mezcla de reacción se preparó en hielo, con un volumen final de 9 μL por pocillo y una concentración final de *primers* de 400 nM. Los *primers* empleados se detallan en la Tabla 5.

Posteriormente, la mezcla se distribuyó en una placa de 96 pocillos, añadiendo 1 μL de ADNc sintetizado para alcanzar un volumen final de 10 μL por reacción. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador con las condiciones especificadas en la Tabla 8.

Tabla 8 Condiciones para la PCR semi-cuantitativa

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
30 ciclos		
Desnaturalización	95 °C	30 segundos
Alineamiento	56 °C	30 segundos
Elongación	72 °C	30 segundos
Elongación final	72 °C	5 minutos

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1,5 %, con GreenSafe Premium, a 110 V durante 30 minutos. Posteriormente, las bandas se visualizaron en un sistema de documentación de geles Gel Doc XR+ (Bio-Rad).

4.4.4. RT-qPCR

Para la RT-qPCR se utilizó SYBR Green Master Mix. La mezcla de reacción se preparó en hielo y protegida de la luz, con un volumen final de 9 µL por pocillo y una concentración final de *primers* de 400 nM. Los *primers* empleados se detallan en la Tabla 5.

Una vez preparada, la mezcla se distribuyó en una placa de 384 pocillos, realizando triplicados técnicos para cada *primer* y muestra. A cada pocillo se añadieron 1 µL de ADNc sintetizado, y la placa se selló con papel autoadhesivo.

Las muestras se sometieron a las condiciones mostradas en la Figura 7 utilizando un termociclador QuantStudio 5 (ThermoFisher).



Figura 7 Condiciones para la RT-qPCR.

El análisis cuantitativo se realizó considerando el ciclo umbral (C_T), definido como el ciclo de amplificación en el que la señal de fluorescencia del SYBR Green se distingue de la fluorescencia de fondo.

Los cambios en la expresión génica se calcularon mediante el método de cuantificación relativa (Rq , *Relative quantification*) utilizando la ecuación $2^{-\Delta\Delta C_T}$ y ACTB como gen de referencia:

$$\Delta C_T = C_T (\text{gen diana}) - C_T (\text{gen de referencia})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{tratamiento}) - \Delta C_T (\text{control})$$

$$Rq = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

4.5. CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo se empleó para el análisis del ciclo celular, así como para la determinación de la producción de ERO y NO.

4.5.1. Análisis del ciclo celular

Para evaluar la distribución del ciclo celular, se utilizó tinción con yoduro de propidio (IP) seguida de análisis por citometría de flujo. El IP se intercala en el ADN, emitiendo una fluorescencia proporcional al contenido de ADN de cada célula, lo que permite discriminar las poblaciones celulares correspondientes a las fases G0/G1, S y G2/M (42).

Durante el subcultivo rutinario, se recogieron 10^5 células HUVEC por muestra. Tras dos lavados con PBS, las células se fijaron en frío con una solución de metanol/PBS (1:1) durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, se incubaron con una solución de IP (0,1 mg/mL) y RNAsa (200 U/mL) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La fluorescencia se midió empleando un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences) con excitación a 488 nm y emisión a 585 ± 40 nm.

4.5.2. Producción de ERO y NO

Para evaluar los niveles intracelulares de ERO se empleó la sonda fluorescente H_2DCFDA . Esta sonda es permeable a la membrana plasmática y se desacetila intracelularmente; posteriormente, las ERO oxidan la sonda a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que emite fluorescencia proporcional a los niveles intracelulares de ERO.

Las células HUVEC se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 1×10^4 células/cm² y se cultivaron hasta alcanzar la confluencia. Tras lavar las monocapas con solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés *Phosphate-Buffered Saline*), se incubaron durante 15 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂ en oscuridad con una solución de H_2DCFDA 5 μM disuelta en solución salina balanceada de Hank (HBSS, del inglés *Hank's Balanced Salt Solution*).

Tras la incubación, se eliminó la sonda y se lavaron las células con PBS. Las células se desprendieron con tripsina- EDTA 0,05 %, se centrifugaron a 200 RCF durante 5 minutos y se

resuspendieron en HBSS. La fluorescencia se midió en un citómetro de flujo, con excitación a 485 nm y emisión a 525 nm. Los valores medios de fluorescencia se normalizaron con respecto al valor medio del control.

Para los monocitos THP-1, el método se adaptó para cultivos en suspensión, realizando los lavados e incubación en tubos cónicos, con centrifugaciones intermedias de 5 minutos a 200 RCF.

En paralelo, se determinaron los niveles intracelulares de NO utilizando la sonda DAF-FM (2,5 μ M), empleando el mismo protocolo descrito para H₂DCFDA. La fluorescencia se analizó en el mismo citómetro y en las mismas condiciones.

4.6. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CON MTT

Para evaluar la capacidad proliferativa de las células HUVEC, se realizaron curvas de crecimiento utilizando el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). En el interior de la célula, las enzimas oxidorreductasas mitocondriales reducen el MTT a formazán, un compuesto insoluble que se acumula en forma de cristales. Bajo condiciones adecuadas, la cantidad de formazán generado es proporcional al número de células viables presentes (330).

Las células HUVEC se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 6.000 células/cm². Tras 4 horas de incubación para permitir la adhesión, se añadió MTT (50 μ g/mL) al medio y se incubó durante 2 horas a 37 °C y 5 % CO₂. A continuación, se retiró el medio y los cristales de formazán precipitados se disolvieron con DMSO. La absorbancia se midió a 570 nm con un lector de placas (FLUOstar OPTIMA BMG LABTECH).

El mismo procedimiento se repitió a las 24, 72 y 110 horas, y las lecturas se normalizaron respecto al tiempo 0. Los resultados se expresaron como cociente respecto al tiempo 0.

4.7. ACTIVIDAD B-GALACTOSIDASA ASOCIADA A SENESCENCIA

La actividad SA- β -Gal se evaluó mediante tinción colorimétrica siguiendo las instrucciones del kit comercial proporcionadas por el fabricante. La β -galactosidasa es una enzima lisosomal cuya actividad óptima se sitúa en torno a pH 4; sin embargo, en las células senescentes se detecta actividad en pH 6, lo que permite distinguirlas de las células quiescentes o postmitóticas (62).

Las células HUVEC se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de $1,5 \times 10^4$ células/cm². Una vez alcanzado aproximadamente el 80 % de confluencia, se lavaron con PBS y se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras un nuevo lavado, se incubaron con la solución de tinción durante 16 horas a 37 °C.

Finalmente, las células se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron durante 15 minutos con Hoechst 33258 (200 ng/mL) para marcar los núcleos.

Se adquirieron imágenes de campo claro y fluorescencia (Ex: 352 nm / Em: 461 nm) de tres campos aleatorios por pocillo, en tres pocillos por condición, utilizando un microscopio invertido Olympus IX73.

Las células teñidas de azul se consideraron positivas para actividad SA- β -Gal. El número total de núcleos y el número de células positivas se cuantificaron con el software ImageJ (NIH). Los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas.

4.8. INMUNOCITOQUÍMICA

Las células HUVEC se sembraron sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro previamente tratados con gelatina y dispuestos en placas de 24 pocillos, a una densidad de 2×10^4 células/cm², y se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar la confluencia. Los fibroblastos MRC-5 se sembraron en las mismas condiciones, y se emplearon a una confluencia aproximada del 60 %.

Las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 % v/v durante 5 minutos.

Las monocapas se incubaron con BSA al 1 % p/v en PBS-T 0,5 % durante 1 hora a temperatura ambiente, seguida de una incubación de 3 h con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en la solución de bloqueo, y de 1 hora con el anticuerpo secundario diluido en PBS. Cuando el anticuerpo primario estaba directamente conjugado, se omitió la incubación con el anticuerpo secundario.

Los anticuerpos empleados se detallan en la Tabla 4.

Finalmente, los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 y los cubreobjetos se montaron en portaobjetos utilizando una mezcla de glicerol y PBS (9:1) como medio de montaje. Las muestras se visualizaron en un microscopio Leica DM4 B equipado con sistema THUNDER, y se tomaron imágenes representativas de las distintas condiciones experimentales.

4.9. ENSAYO DE MIGRACIÓN MEDIANTE TÉCNICA DE RASPADO

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de $1,5 \times 10^4$ células/cm² y se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar la confluencia.

El raspado se generó realizando una herida perpendicular a la monocapa con una punta de micropipeta estéril. A continuación, las células se lavaron con PBS para eliminar los restos celulares y se repuso el medio de cultivo.

Se adquirieron imágenes en campo claro en los tiempos 0, 6, 12 y 24 horas tras generación del raspado, utilizando un microscopio invertido Olympus IX73. Para cada condición experimental se analizaron tres pocillos independientes por línea celular, registrando tres campos aleatorios por pocillo.

El área del raspado se cuantificó con el software ImageJ (NIH), y la capacidad de migración se expresó como el área cubierta del raspado a lo largo del tiempo.

4.10. ENSAYO DE ANGIOGÉNESIS *IN VITRO*

La capacidad de las células HUVEC para formar estructuras capilares *in vitro* se evaluó mediante un ensayo de angiogénesis sobre una matriz de membrana basal Geltrex™, rica en laminina y derivada de sarcoma murino Engelbreth-Holm-Swarm (EHS).

El ensayo se realizó siguiendo una técnica en capa fina descrita previamente (331). Se utilizaron placas de 96 pocillos previamente atemperadas a 4 °C, donde se distribuyeron 2 µL de Geltrex por pocillo. La matriz se incubó durante 30 minutos a 37 °C, tras lo cual se sembraron las células HUVEC a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/cm².

Después de 16 horas de incubación, se adquirieron imágenes en campo claro de los capilares formados mediante un microscopio invertido Olympus IX73.

El análisis se realizó de forma cualitativa, con el objetivo de confirmar la retención de la capacidad de formar estructuras capilares a lo largo del cultivo.

4.11. DETERMINACIÓN DEL SASP MEDIANTE ARRAY DE MEMBRANA

La secreción de citocinas en el MC de células HUVEC se evaluó mediante un *array* de membrana comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las membranas se bloquearon durante 30 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se incubaron con las muestras durante la noche a 4 °C. A continuación, se realizaron ciclos de lavados e incubaciones con anticuerpos conjugados con biotina y estreptavidina conjugada con peroxidasa.

Las señales se revelaron mediante quimioluminiscencia en película fotográfica y se cuantificaron por densitometría utilizando el software ImageJ (NIH). La señal de cada punto se normalizó frente a la media de los controles positivos de cada membrana. Los resultados se expresaron como unidades de densidad relativa.

4.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y REPRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

La representación gráfica y el tratamiento estadístico de los resultados se realizó con el programa GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, EE. UU.).

El PDL máximo alcanzado por cada línea celular se utilizó para construir curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Para la construcción de las curvas, se consideró como evento el agotamiento del cultivo, y como tiempo el PDL máximo. Para comparar entre sí las curvas obtenidas en las diferentes condiciones se utilizó la prueba de log-rank (Mantel-Cox). Los datos incluyen 10 líneas celulares independientes por condición (n = 10).

Salvo que se indique lo contrario, los resultados se muestran como la media \pm desviación estándar (SD, del inglés *Standard Deviation*) de entre 4 y 10 líneas celulares independientes. El

análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una o dos vías con el test de comparación múltiple de Tukey, utilizando un intervalo de confianza del 95 % para la hipótesis nula.

5- RESULTADOS

5. Resultados

5.1. EFECTOS DEL TRATAMIENTO SEMANAL CON RAPAMICINA SOBRE LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

5.1.1. Efecto de la rapamicina sobre las vías PI3K/AKT/mTOR, eNOS y MAPK

Con el fin de caracterizar el impacto del tratamiento semanal con rapamicina sobre las vías de señalización intracelular relacionadas con mTOR en células HUVEC, se analizaron mediante western blot los niveles de fosforilación de S6K (diana directa de mTORC1), AKT1 en Ser473 (fosforilación mediada por mTORC2), ERK1/2 y eNOS a las 24 horas de tratamiento (día 1), tras 48 horas (día 3) y tras 6 días (día 7) de lavado del fármaco (Figura 8).

La fosforilación de S6K en Thr389 se redujo aproximadamente un 50% en el día 1 de tratamiento con rapamicina. El grado de inhibición varió considerablemente entre las diferentes líneas celulares. En el día 3 de tratamiento, los niveles de fosforilación se recuperaron completamente, alcanzando valores comparables a los basales. En el día 7 se observó una nueva disminución en la fosforilación de S6K en Thr389, por debajo tanto de los niveles basales como de los registrados en el día 3 (Figura 8A).

En cuanto a la fosforilación de AKT en Ser473, se observó un aumento de aproximadamente el doble respecto al control en el día 1 de tratamiento con rapamicina. Esta activación fue transitoria: los niveles de fosforilación retornaron a valores basales en el día 3 y se mantuvieron estables hasta el día 7. La cinética observada muestra un perfil inverso al de la fosforilación de S6K (Figura 8B).

La activación de la vía MAPK mostró una cinética parcialmente paralela a la de AKT. La fosforilación de ERK1/2 en Thr202/Tyr204 experimentó un aumento leve en el día 1 de tratamiento con rapamicina, y se mantuvo moderadamente elevada hasta el día 3. En el día 7, los niveles de fosforilación habían regresado a valores basales (Figura 8C).

Finalmente, no se observaron cambios significativos en los niveles de fosforilación de eNOS en Ser1177 a lo largo del experimento (Figura 8D).

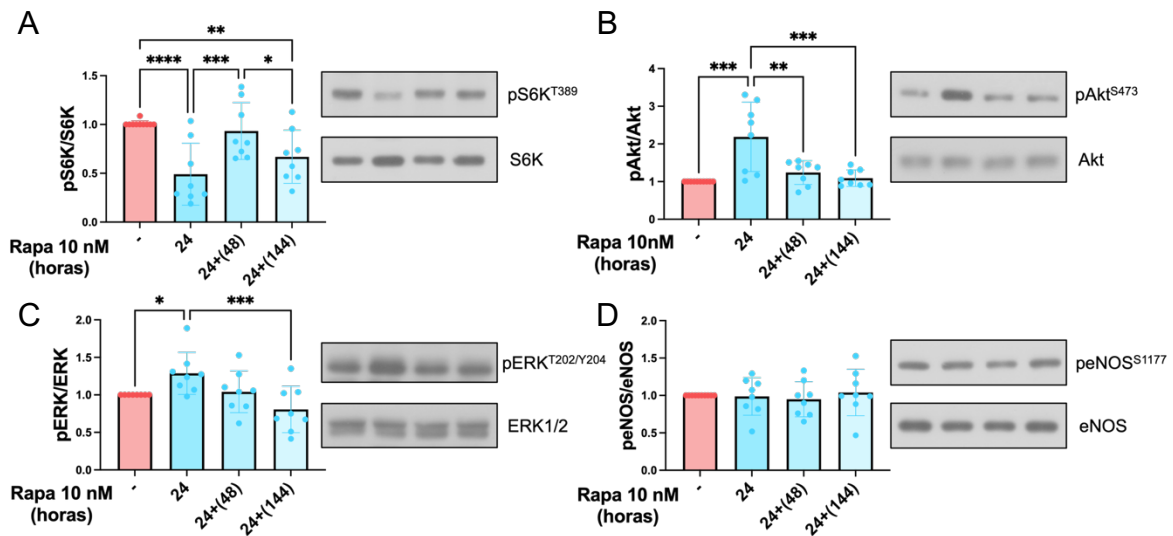


Figura 8 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre las rutas mTOR, PI3K/AKT1, MAPK y eNOS en células HUVEC.

Las células HUVEC fueron tratadas con rapamicina 10 nM durante 24 h y posteriormente mantenidas en cultivo sin fármaco hasta completar la semana. Se evaluaron los efectos del tratamiento en los días 1, 3 y 7 tras la administración, comparándolos con un grupo control no tratado.

A. Ratio de pS6K^{T389}/S6K (ruta mTORC1)

B. Ratio de pAKT1^{S473}/AKT1 (ruta mTORC2)

C. Ratio de pERK1/2^{T202/Y204}/ERK1/2 (ruta MAPK)

D. Ratio de peNOS^{S1177}/eNOS (síntesis de NO)

Las proteínas se analizaron mediante western blot. Las cuantificaciones representan la densitometría relativa normalizada respecto al control de cada experimento. Se muestran los blots representativos junto a las gráficas.

Análisis estadístico: ANOVA de una vía con corrección de Tukey para comparaciones múltiples.

Datos expresados como media \pm SD, n = 8 líneas celulares independientes.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

5.1.2. Efecto de la rapamicina sobre marcadores de autofagia

Con el objetivo de determinar si el tratamiento intermitente con rapamicina induce una activación sostenida de la autofagia en células HUVEC, se evaluaron mediante western blot los niveles de Beclin-1, p62 y la lipidación de LC3 (expresada como la ratio LC3-II/LC3-I) a las 24 horas del tratamiento (día 1), así como a las 48 horas (día 3) y 6 días (día 7) tras la retirada del fármaco.

No se detectaron diferencias significativas en la expresión de Beclin-1 ni de p62, ni en la ratio LC3-II/I en ninguno de los puntos temporales analizados. Aunque se observó cierta variabilidad interindividual entre líneas celulares, los valores promedio se mantuvieron estables en comparación con los controles tratados con vehículo (Figura 9).

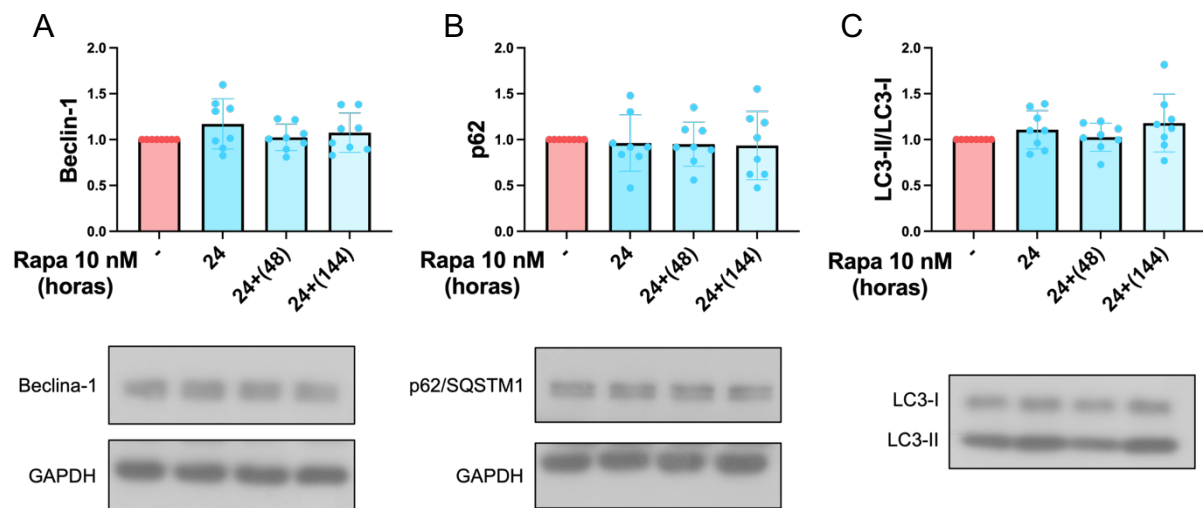


Figura 9 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre marcadores de autofagia en células HUVEC.

Las células HUVEC fueron tratadas con rapamicina 10 nM durante 24 h y posteriormente mantenidas en cultivo sin fármaco hasta completar la semana. Se evaluaron los efectos del tratamiento en los días 1, 3 y 7 tras la administración, comparándolos con un grupo control no tratado.

A. Niveles de Beclina-1

B. Niveles de p62

C. Ratio de LC3-II/LC3-I

Las proteínas se analizaron mediante western blot. Las cuantificaciones representan la densitometría relativa normalizada respecto al control de cada experimento. Las bandas representativas se muestran debajo de cada gráfico, con su correspondiente control de carga.

Análisis estadístico: ANOVA de una vía con corrección de Tukey para comparaciones múltiples.

Datos expresados como media \pm SD, n = 8 líneas celulares independientes.

5.2. EFECTO DE LA RAPAMICINA EN LA DURACIÓN DE LOS CULTIVOS DE CÉLULAS HUVEC

5.2.1. Efecto de la rapamicina en el PDL máximo alcanzado por las células HUVEC en cultivo

Con el objetivo de evaluar el impacto del tratamiento semanal con rapamicina sobre la duración del cultivo, se realizó un análisis de supervivencia en función del PDL máximo alcanzado por cada línea celular.

El grupo tratado con rapamicina mostró una prolongación significativa en la capacidad proliferativa del cultivo en comparación con su control emparejado. El PDL mediano aumentó de 43 en el grupo control a 56 en el grupo tratado, lo que representa un incremento del 30 %. El PDL máximo alcanzado fue de 49 en el grupo control y 64 en el grupo tratado con rapamicina. El análisis estadístico mediante test de log-rank reveló diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0,0004$) (Figura 10).

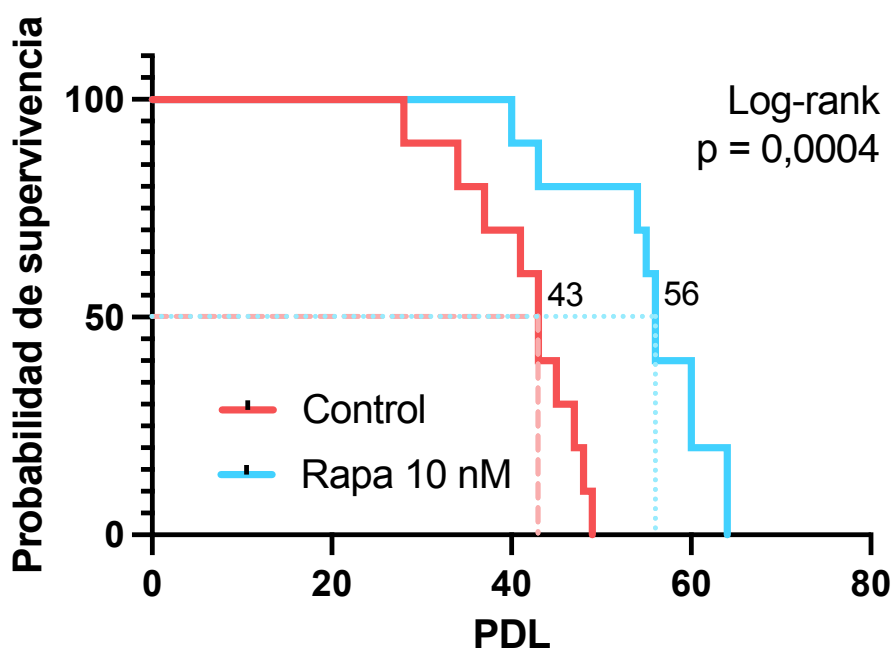


Figura 10 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre los PDL máximos de cultivos de células HUVEC.

Curva de supervivencia de cultivos de células HUVEC en función del PDL máximo alcanzado. La mediana se situó en un PDL de 43 en el grupo control y 56 en el grupo tratado. Los PDL más altos fueron de 49 y 64, respectivamente. Análisis estadístico: test de log-rank. Los datos corresponden a $n=10$ líneas celulares independientes. $p=0,0004$

5.2.2. PDL acumulado en cada pase experimental

Complementando el análisis de la curva de supervivencia, se evaluó el PDL en los pases 4, 10, 14 y 18, en los que se realizaron las distintas determinaciones funcionales y moleculares.

Tanto el grupo control como el tratado mostraron un aumento progresivo de los PDL a lo largo de los subcultivos. El grupo tratado con rapamicina presentó un PDL significativamente mayor en el pase 18 en comparación con su control emparejado (48 frente a 43, $p \leq 0,01$). No se detectaron diferencias significativas en los pases previos (Figura 11).

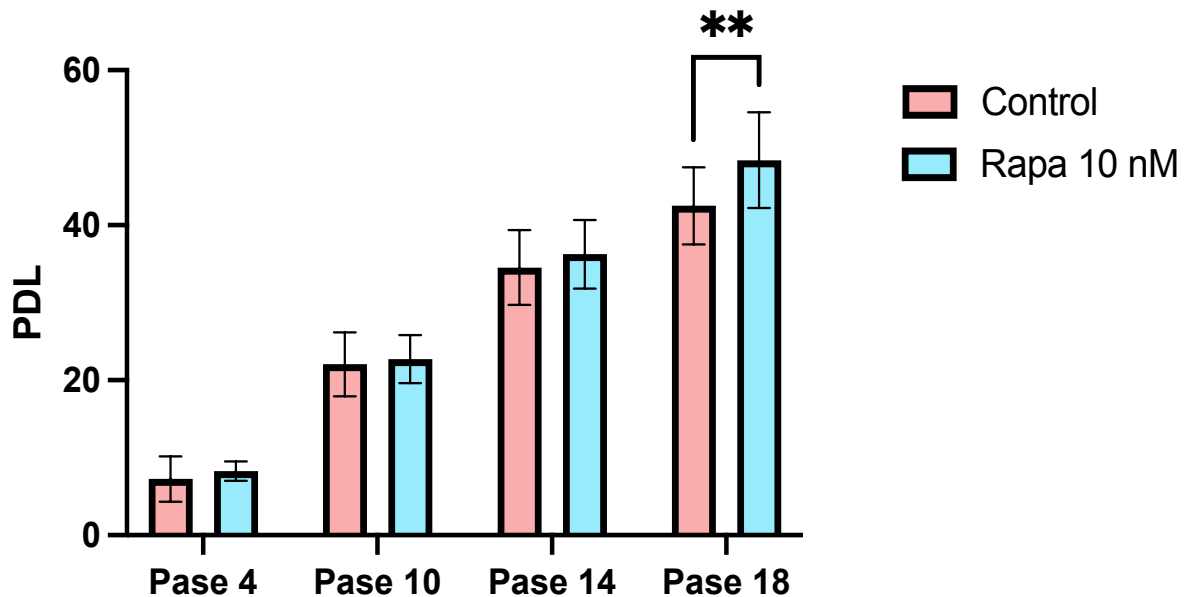


Figura 11 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre los PDL de células HUVEC durante el cultivo.

PDL de los cultivos HUVEC control y tratados semanalmente con rapamicina (10 nM, 24h/semana) en los pases 4, 10, 14 y 18.

Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con corrección de Tukey para comparaciones múltiples. Los datos se expresan como media \pm SD, $n = 10$ líneas celulares independientes. $**p \leq 0,01$

5.3. PROLIFERACIÓN, CICLO CELULAR Y MARCADORES DE SENESCENCIA

5.3.1. Efecto de los pases y la rapamicina sobre la proliferación

La capacidad proliferativa de las células HUVEC se evaluó mediante un ensayo MTT en los pases 4, 10, 14 y 18. En los pases 4 y 10, ambos grupos de cultivo mostraron una proliferación sostenida, sin diferencias significativas entre los controles y los tratados con rapamicina (Figura 12A,B). No obstante, en los pases 14 y 18, las células control exhibieron una reducción progresiva de la proliferación, mientras que el tratamiento con rapamicina mantuvo niveles de proliferación similares a los observados en pases previos. La diferencia entre grupos fue más pronunciada en el pase 18 ($p \leq 0,001$) (Figura 12C,D).

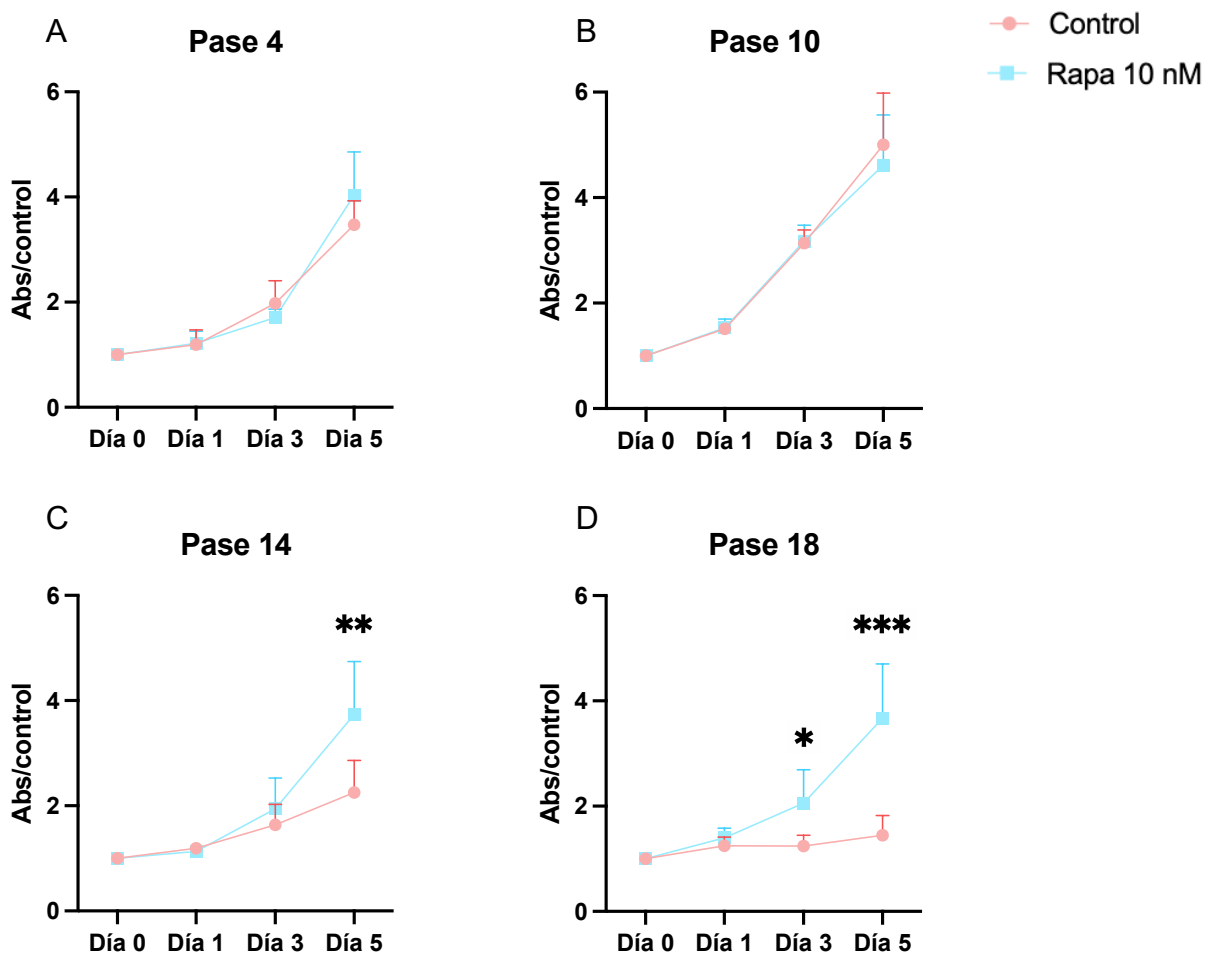


Figura 12 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre la capacidad proliferativa de células HUVEC a lo largo del cultivo.

Curvas de crecimiento celular de HUVEC control y tratadas con rapamicina (10 nM, 24h/semana) evaluadas mediante ensayo MTT en los pases 4 (A), 10 (B), 14 (C) y 18 (D). La proliferación se expresa como cociente de absorbancia respecto al tiempo 0 para cada condición.

Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con corrección de Šidák para comparaciones múltiples. Los datos se expresan como media \pm SD, $n = 10$ líneas celulares independientes.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

5.3.2. Impacto de los pases y la rapamicina en la distribución del ciclo celular

La distribución de las fases del ciclo celular se evaluó mediante tinción con IP y análisis por citometría de flujo en los pases 4, 10, 14 y 18. Durante la mayor parte del periodo experimental (pases 4, 10 y 14), no se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de células en las fases G1, S y G2/M, tanto al comparar los cultivos control con los tratados con rapamicina, como al analizar la progresión a lo largo de los pases (Figura 13A-F).

Sin embargo, en el pase 18 se observó un ligero, pero estadísticamente significativo aumento en el porcentaje de células en fase G1 en el grupo tratado con rapamicina ($p = 0,041$). Este incremento estuvo acompañado de una tendencia a la reducción en la proporción de células en fase S ($p = 0,079$), aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística (Figura 13G,H).

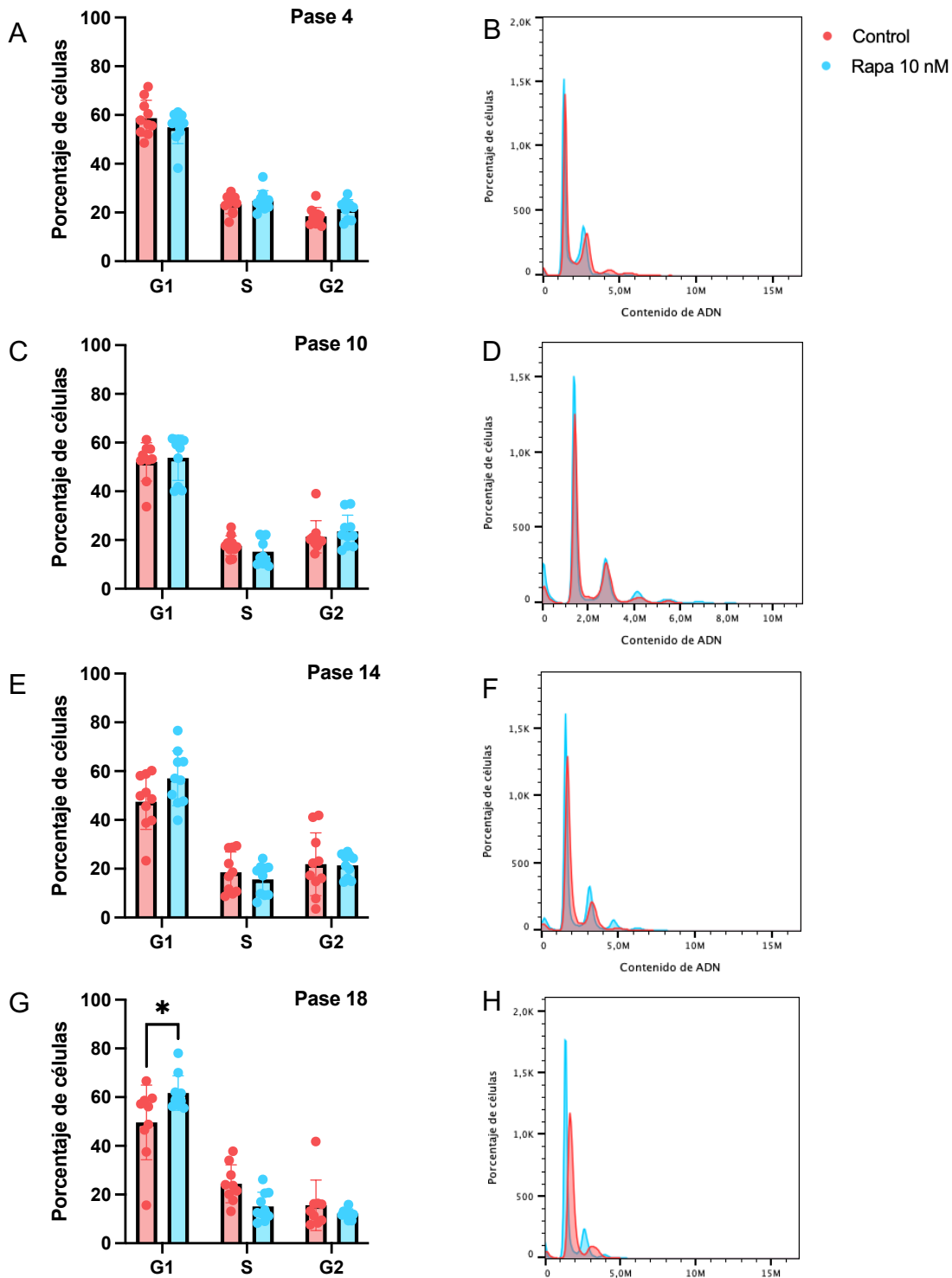


Figura 13 Efecto de los pases y del tratamiento con rapamicina sobre la distribución del ciclo celular en cultivos de células HUVEC.

A, C, E y G: Distribución porcentual de células HUVEC en las fases G1, S y G2 del ciclo celular en los grupos control y tratados con rapamicina (10 nM, 24h/semana), evaluada mediante tinción con IP y citometría de flujo en los pases 4 (A), 10 (C), 14 (E) y 18 (G).

B, D, F y H: Histogramas representativos del contenido de ADN para cada grupo y pase.

Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con corrección de Šidák para comparaciones múltiples. Los datos se expresan como media \pm SD, $n = 10$ líneas celulares independientes.

* $p \leq 0,05$.

5.3.3. Efecto de los pases y la rapamicina en la actividad de SA- β -Gal

La senescencia celular se evaluó mediante la detección de la actividad SA- β -Gal a pH 6. En el grupo control, la proporción de células positivas para actividad SA- β -Gal aumentó progresivamente a lo largo del cultivo, con un incremento evidente a partir del pase 10, que se intensificó en los pases 14 y 18 (Figura 14), siguiendo un patrón característico de la entrada en senescencia replicativa en cultivos celulares.

En contraste, los cultivos tratados con rapamicina mostraron una reducción significativa en la proporción de células con actividad SA- β -Gal en los pases avanzados. Este efecto aumentó progresivamente desde el pase 10 hasta el pase 18, con diferencias estadísticamente significativas en todos ellos (Figura 14).

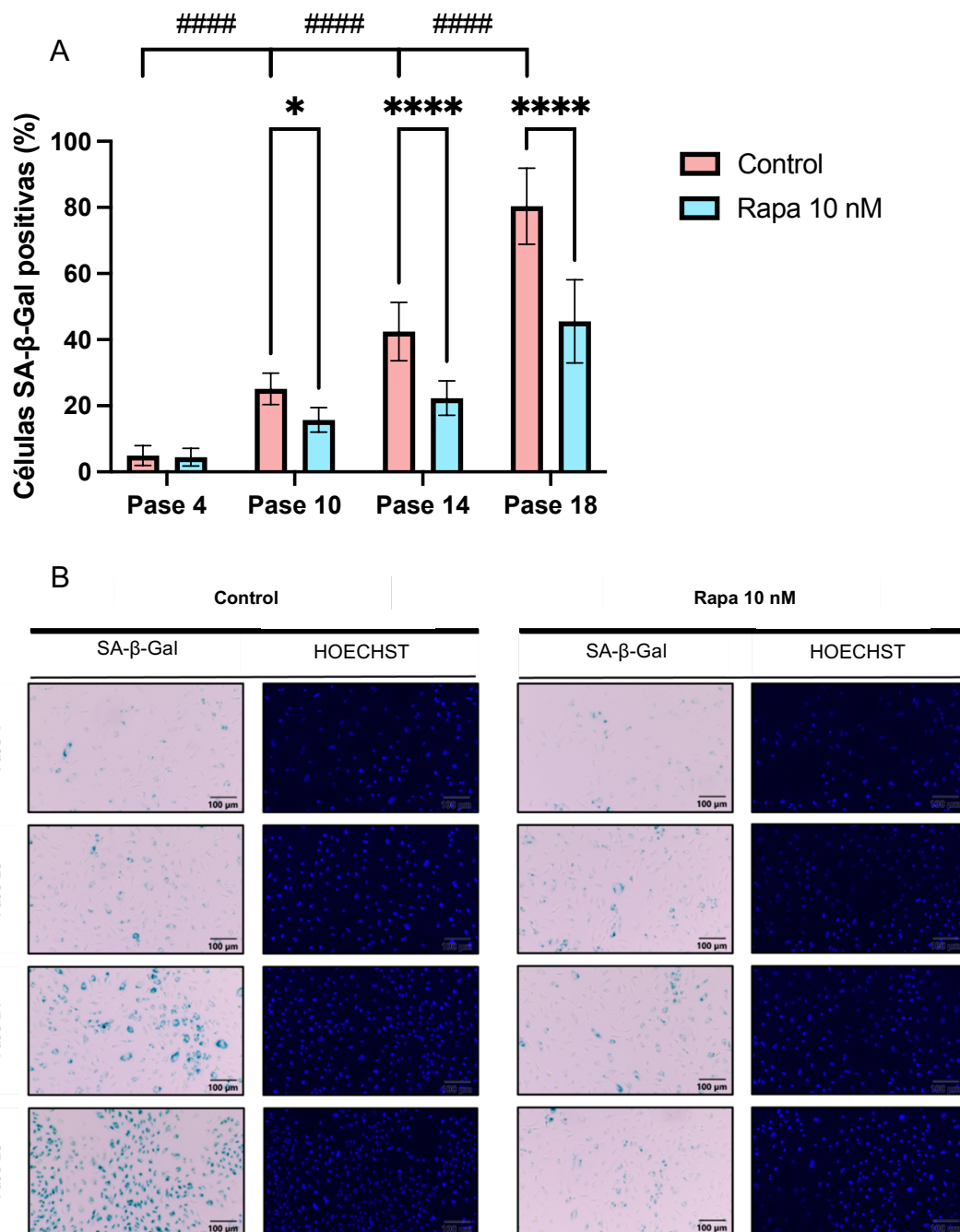


Figura 14 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre la actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia en cultivos de células HUVEC.

A. Porcentaje de células con actividad SA- β -Gal en cultivos HUVEC control y tratados con rapamicina (10 nM, 24 h/semana) en los pases 4, 10, 14 y 18.

B. Imágenes representativas de la tinción con SA- β -Gal (izquierda) y con HOECHST 33258 (derecha), en ambos grupos y todos los pases analizados.

Los valores se expresan como media \pm SD, $n = 10$ líneas celulares independientes.

Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con corrección de Šidák para comparaciones múltiples.

* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,0001$.

$p \leq 0,0001$ (comparaciones entre pases dentro del grupo control).

Barras de escala: 100 μ m.

5.3.4. Efecto de los pases y la rapamicina sobre los inhibidores de cinasas dependientes de ciclina p16^{INK4a} y p21^{Cip1}

Para dilucidar el impacto de la rapamicina en los mecanismos moleculares subyacentes a la senescencia replicativa de las células HUVEC, se analizaron los niveles de los inhibidores del ciclo celular p16^{INK4a} y p21^{Cip1} en los pases 4, 10, 14 y 18.

En las células HUVEC control, los niveles proteicos de p16^{INK4a} y p21^{Cip1} aumentaron de forma dependiente del número de pases. Específicamente, el incremento de p21^{Cip1} fue significativo desde el pase 10, mientras que el aumento en p16^{INK4a} solo alcanzó significación estadística en el pase 18 (Figura 15A,B).

Se observó una marcada heterogeneidad en la inducción de p16^{INK4a} a nivel proteico. En el pase 18, el cambio mediano en los niveles fue de aproximadamente 6 veces, sin embargo, el cambio medio se situó cerca de 50 veces, con algunas líneas celulares individuales mostrando una inducción excepcional de hasta 256 veces respecto al control (Figura 15A). Esta dispersión en la inducción de p16^{INK4a} también se observó a nivel de ARNm (Figura 15C).

El tratamiento semanal con rapamicina mostró una tendencia a reducir la acumulación de p16^{INK4a} a nivel proteico en los pases 14 y 18 (Figura 15A). Asimismo, se observó una reducción significativa en los niveles de ARNm de p16^{INK4a} en el pase 18 (Figura 15C).

En contraste, la acumulación de la proteína p21^{Cip1} fue más progresiva en los controles, y no se apreciaron diferencias significativas en sus niveles proteicos tras el tratamiento con rapamicina (Figura 15B). De manera consistente, la expresión del gen CDKN1A (que codifica p21^{Cip1}) no se vio modificada a nivel de ARNm ni por los pases del cultivo ni por el tratamiento con rapamicina (Figura 15D).

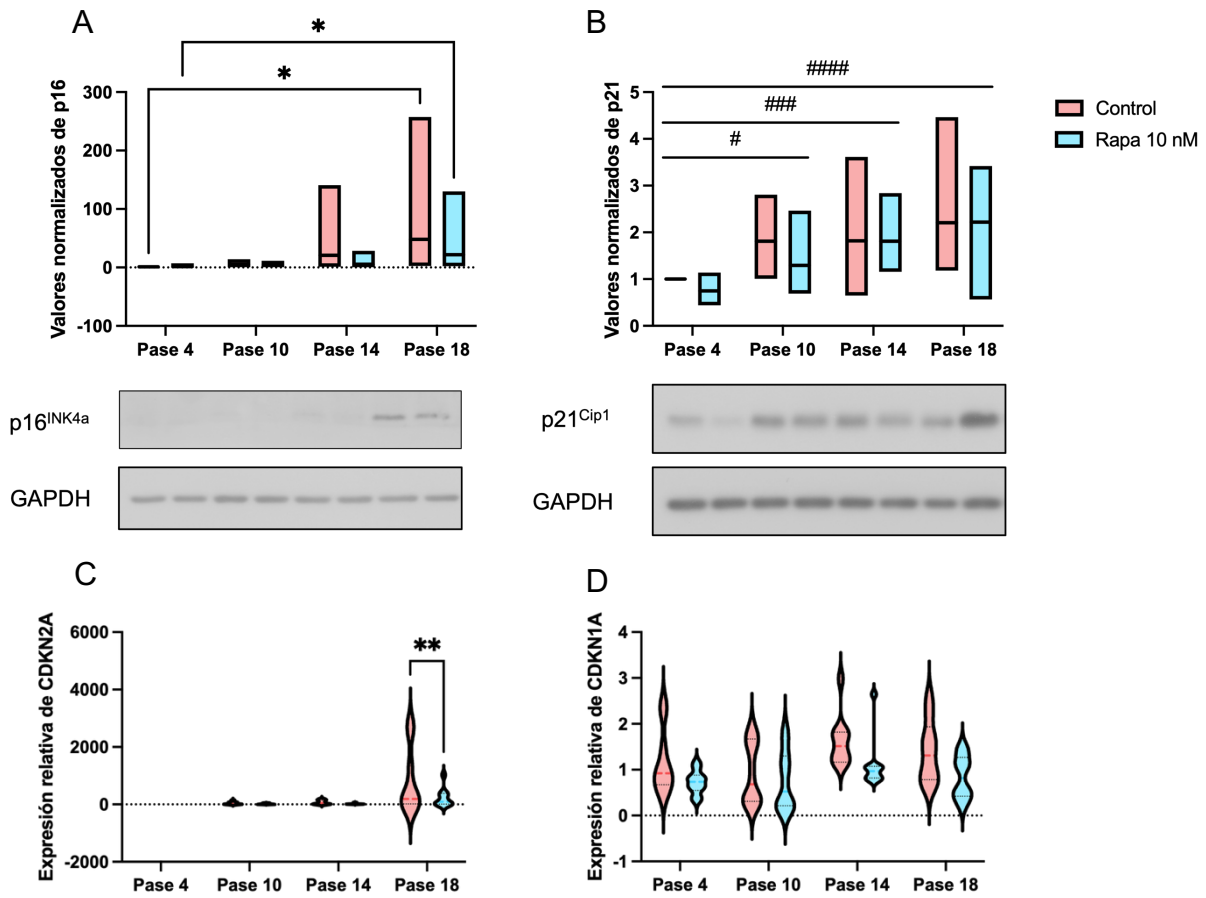


Figura 15 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre la expresión de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclina p16^{INK4a} y p21^{Cip1} en células HUVEC.

Las células HUVEC fueron tratadas con rapamicina (10 nM, 24h/semana) o vehículo, y analizadas en los pases 4, 10, 14 y 18. A. Cuantificación densitométrica de p16^{INK4a} normalizada frente al control de carga y control de pase 4, junto con el blot representativo.

B. Cuantificación densitométrica de p21^{Cip1} normalizada frente al control de carga y control de pase 4, junto con el blot representativo.

C. Análisis de la expresión génica de CDKN2A mediante RT-qPCR.

D. Análisis de la expresión génica de CDKN1A mediante RT-qPCR.

Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con corrección de Šidák para comparaciones múltiples.

Datos expresados como media \pm SD, n = 10 líneas celulares independientes.

**p \leq 0,01.

#p \leq 0,05; ###p \leq 0,001; ####p \leq 0,0001. (comparaciones entre pases en ambos grupos).

5.4. IDENTIDAD CELULAR Y FUNCIÓN ENDOTELIAL

5.4.1. Confirmación de la identidad endotelial por RT-PCR

Con el objetivo de confirmar la conservación de la identidad fenotípica de las células HUVEC durante el envejecimiento replicativo *in vitro* y evaluar el impacto del tratamiento con rapamicina, se analizó la expresión génica de marcadores endoteliales en los pases 4, 10, 14 y 18. Se evaluaron los marcadores de identidad endotelial molécula de adhesión plaquetaria y de células endoteliales (PECAM1/CD31, del inglés *Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*) y factor de von Willebrand (vWF), así como el marcador de diferenciación mesenquimal transgelina (TAGLN), utilizando el gen de β -actina (ACTB) como referencia para la normalización.

Los resultados mostraron expresión de PECAM1 y vWF a lo largo de todos los pases analizados, tanto en el grupo control como en el tratado con rapamicina. El tratamiento no indujo alteraciones evidentes en la expresión de ninguno de estos marcadores clave de la identidad endotelial (Figura 16).

Por el contrario, la expresión del marcador mesenquimal TAGLN se mantuvo constante en niveles muy bajos, siendo inferior en todos los casos a la expresión detectada en líneas celulares de referencia como HUV-EC-C y, especialmente, los fibroblastos MRC-5 (Figura 16).

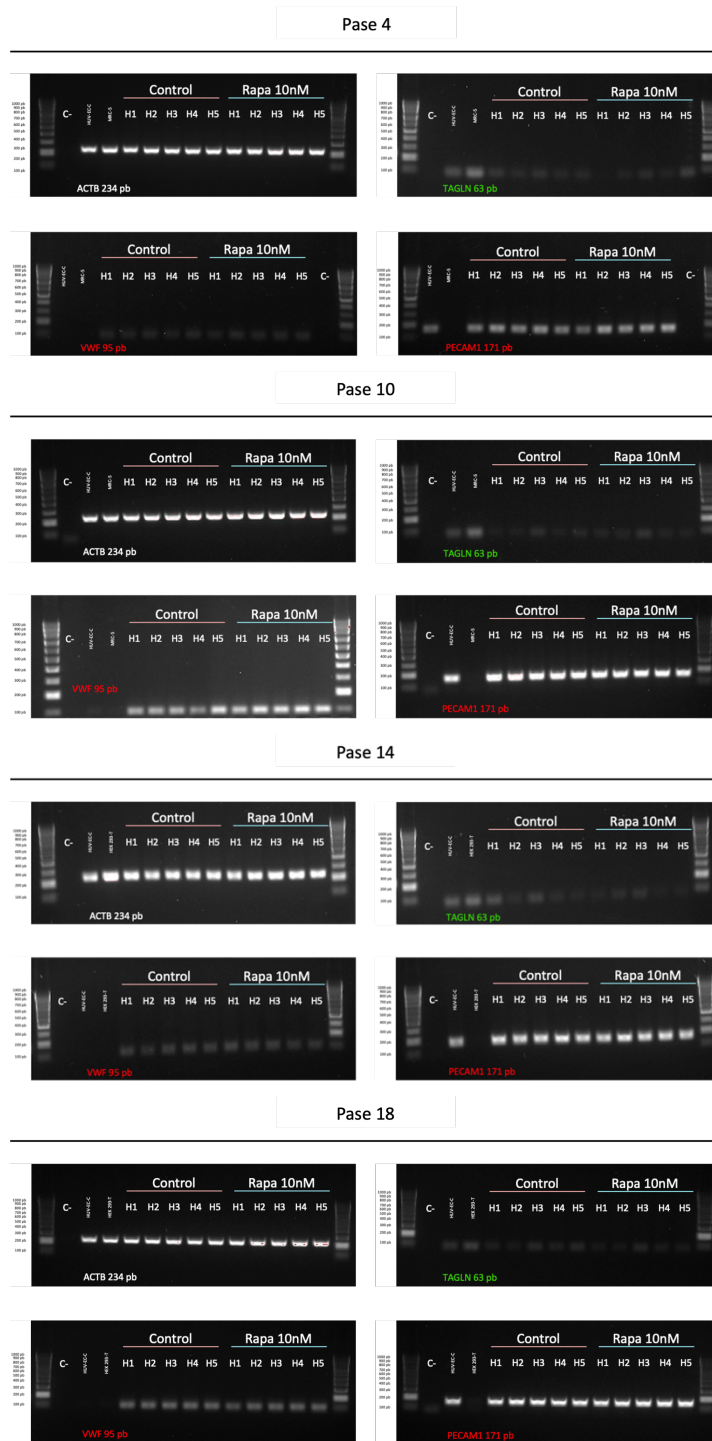


Figura 16 Análisis de la identidad endotelial en cultivos de células HUVEC mediante RT-PCR semicuantitativa.

Se evaluó la expresión de genes marcadores del fenotipo endotelial en células HUVEC control y tratadas con rapamicina (10 nM, 24h/semana) en los pases 4, 10, 14 y 18. Se muestran cinco líneas celulares por condición en cada pase.

Se amplificaron por RT-PCR los siguientes genes:

- ACTB (234 pb).
- TAGLN (63 pb).
- vWF (95 pb) y PECAM1/CD31 (171 pb).

5.4.2. Efecto de los pases y la rapamicina en la expresión proteica de VE-cadherina y α -SMA

Para complementar los análisis a nivel transcripcional y evaluar la identidad celular a nivel proteico y morfológico, se investigó la expresión y localización de marcadores específicos mediante inmunocitoquímica, en los pases 4, 10, 14 y 18. Se analizaron VE-cadherina (CD144), una proteína clave de las uniones adherentes del endotelio, fundamental para el mantenimiento de la integridad de la barrera endotelial, y α -actina de músculo liso (α -SMA), un biomarcador distintivo de la diferenciación mesenquimal y miofibroblástica.

Como controles de especificidad del anticuerpo y de la ausencia de transición endotelio mesénquima (EndMT, del inglés *Endothelial to Mesenchymal Transition*) en HUVEC, se incluyeron fibroblastos MRC-5, conocidos por carecer de VE-cadherina y presentar una expresión constitutiva de α -SMA.

Los resultados de VE-cadherina mostraron una clara expresión localizada en la membrana plasmática en todas las condiciones experimentales y pases analizados, con un patrón continuo de unión célula-célula que se mantuvo hasta el pase 14. En el pase 18 del grupo control, se observó una ligera disminución en la intensidad de fluorescencia y una incipiente discontinuidad en el patrón de unión de VE-cadherina. En contraste, las células tratadas semanalmente con rapamicina mantuvieron una integridad significativamente mayor de las uniones de VE-cadherina en este pase avanzado (Figura 17).

Por otro lado, la expresión de α -SMA fue indetectable en todas las condiciones y pases analizados en los cultivos de HUVEC, tanto en el grupo control como tras el tratamiento con rapamicina (Figura 18). En los fibroblastos MRC-5, se observó una intensa expresión de α -SMA citoplasmática, y la ausencia de expresión de VE-cadherina (Figura 19).

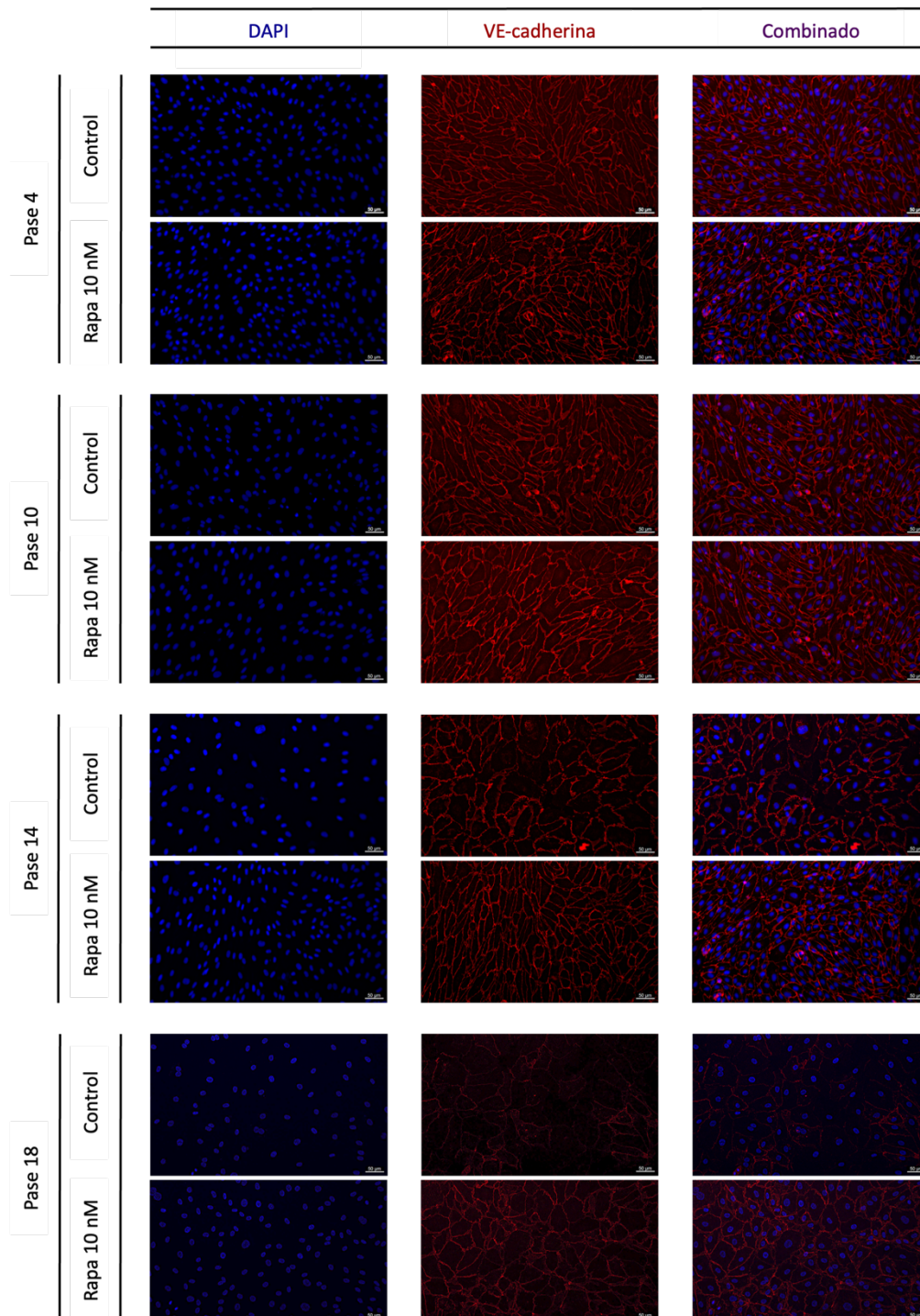


Figura 17 Preservación de la expresión de VE-cadherina en células HUVEC tratadas con rapamicina a lo largo del cultivo.

Inmunocitoquímica de VE-cadherina (rojo) en células HUVEC control y tratadas semanalmente con rapamicina (10 nM, 24h/semana) y analizadas en los pases 4, 10, 14 y 18. Los núcleos (azul) se tiñeron con Hoechst 33258. Las imágenes se capturaron mediante microscopía de fluorescencia a 20x.

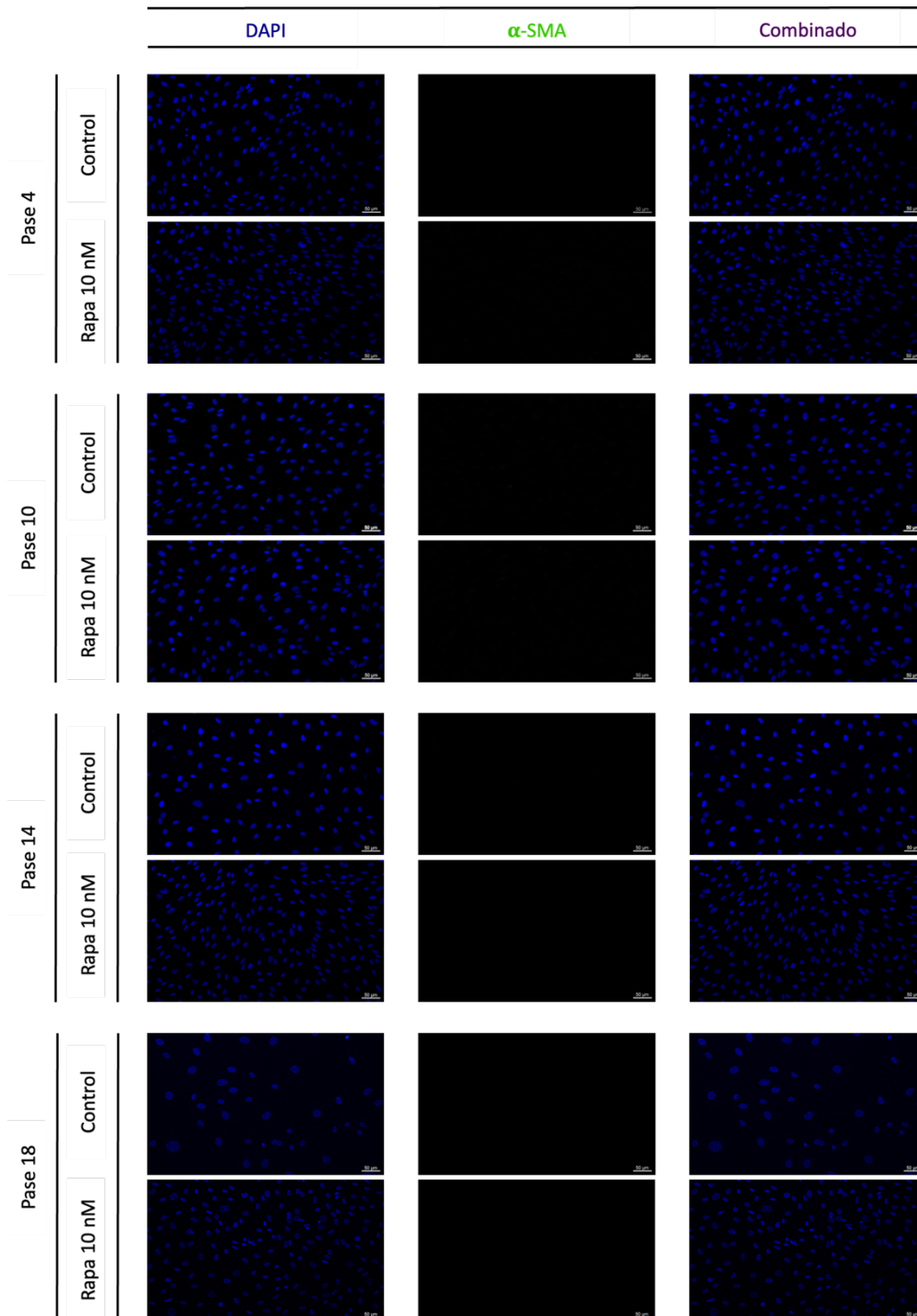


Figura 18 Ausencia de expresión de α -actina de músculo liso (α -SMA) en células HUVEC a lo largo del cultivo.

Inmunocitoquímica de α -SMA (verde) en células HUVEC control y tratadas semanalmente con rapamicina (10 nM, 24h/semana) y analizadas en los pases 4, 10, 14 y 18. Los núcleos (azul) se tiñeron con Hoechst 33258. Las imágenes se capturaron mediante microscopía de fluorescencia a 20x.

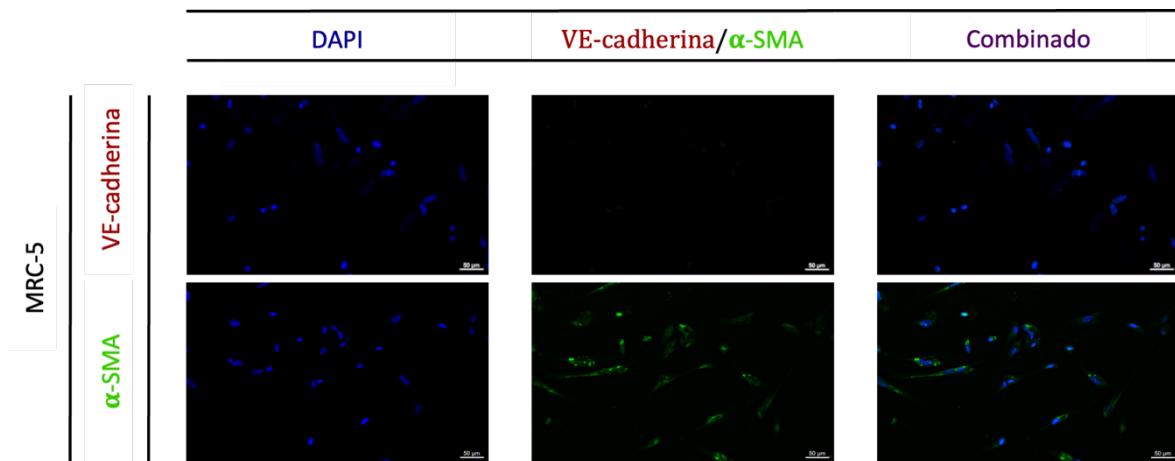


Figura 19 Controles de especificidad para la inmunocitoquímica de VE-cadherina y α -SMA.

Inmunocitoquímica de α -SMA (verde) y VE-cadherina (rojo) en fibroblastos humanos MRC-5. Los núcleos (azul) se tiñeron con Hoechst 33258. Las imágenes se capturaron mediante microscopía de fluorescencia a 20x.

5.4.3. Efecto de los pases y la rapamicina sobre la capacidad de migración

La capacidad migratoria de las células endoteliales, una función crucial para procesos fisiológicos como la angiogénesis y la reparación tisular, se evaluó mediante un ensayo de migración mediante raspado, en los pases 4, 10, 14 y 18. El progreso del cierre del raspado se cuantificó midiendo el área cubierta del raspado en diferentes puntos temporales predefinidos (0 horas, 6 horas, 12 horas y 24 horas).

Los resultados obtenidos no revelaron diferencias significativas en la velocidad o extensión del cierre del raspado entre las diferentes condiciones experimentales (Figura 20).

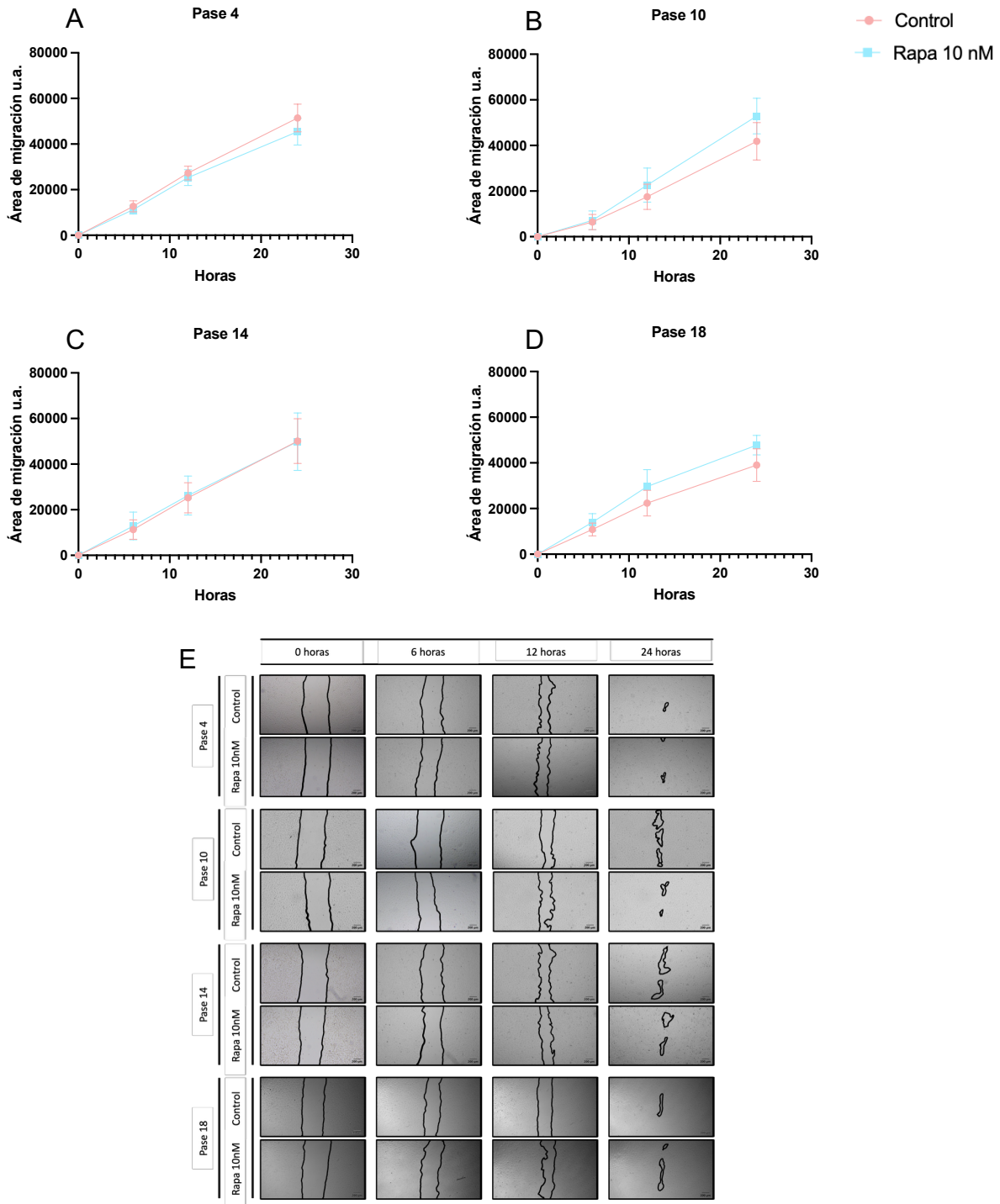


Figura 20 Efecto del tratamiento con rapamicina en la capacidad migratoria de células HUVEC en distintos pases de cultivo.

A–D. Área de migración en unidades arbitrarias a las 0, 6, 12 y 24 horas tras la realización del raspado en monocapas confluentes de células HUVEC control o tratadas con rapamicina (10 nM, 24h/semana), en los pases 4 (A), 10 (B), 14 (C) y 18 (D).

E. Imágenes representativas de los ensayos de migración mediante técnica de raspado en las condiciones indicadas. Las líneas negras delimitan el borde del raspado en cada tiempo. Escala: 200 μ m.

Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con corrección de Sidák para comparaciones múltiples. Los datos se expresan como media \pm SD; n = 10 líneas celulares independientes.

5.4.4. Efecto de los pases y la rapamicina sobre la formación de estructuras vasculares

La capacidad angiogénica de las células HUVEC se evaluó mediante un ensayo de formación de redes sobre matriz extracelular Geltrex en los pases 4, 10, 14 y 18.

Durante los pases 4, 10 y 14, tanto las células de los grupos control como las tratadas, mantuvieron consistentemente su capacidad para organizarse en estructuras tubulares interconectadas, características de una red capilar funcional. Sin embargo, en el pase 18, las estructuras formadas por los cultivos control mostraron deficiencias evidentes y un incremento en el número de células apoptóticas. En contraste, en este pase avanzado, las células tratadas con rapamicina conservaron una mejor continuidad e integridad en la formación de las redes tubulares en comparación con sus controles no tratados (Figura 21).

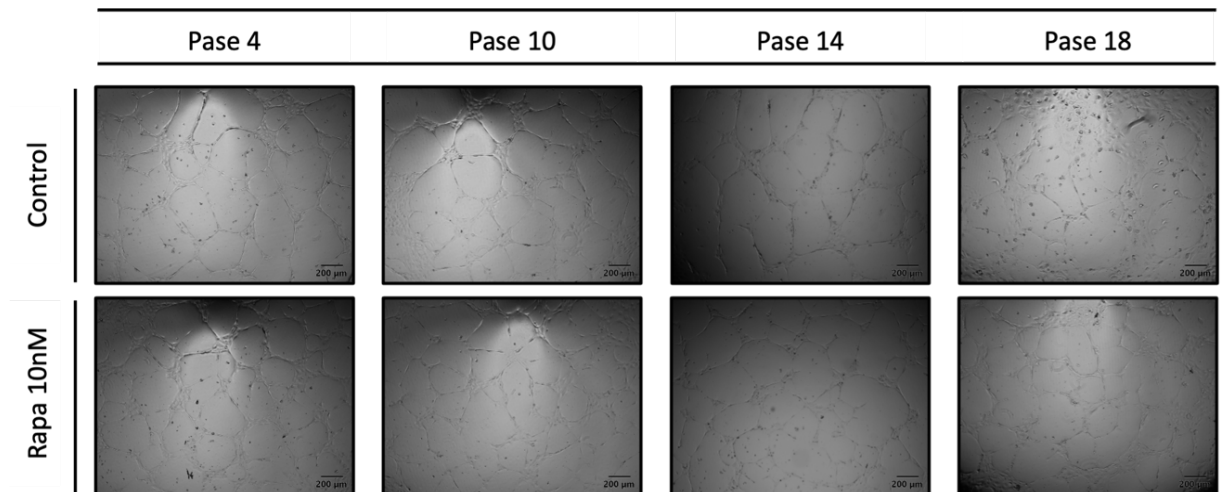


Figura 21 Efecto del tratamiento con rapamicina en la formación de capilares in vitro por células HUVEC.

Imágenes representativas del ensayo de angiogénesis in vitro en gel de membrana basal (Geltrex) en células HUVEC control y tratadas con rapamicina (10 nM, 24 h/semana) en los pases 4, 10, 14 y 18.

Escala: 200 μ m.

5.5. ESTRÉS OXIDATIVO Y SASP

5.5.1. Efecto de los pases y la rapamicina sobre los niveles de ERO y NO

Se analizó el equilibrio redox en células HUVEC para evaluar su alteración durante la senescencia replicativa y el impacto del tratamiento con rapamicina, en los pases 4, 10, 14 y 18 del cultivo.

Se observó una tendencia al incremento de ERO a lo largo del cultivo, siendo estadísticamente significativo sólo en el pase 18. El tratamiento con rapamicina contrarrestó significativamente dicho incremento (Figura 22A).

La producción de NO, por su parte, mostró un incremento significativo a partir del pase 14, sosteniendo los niveles elevados en el pase 18. En contraste, el tratamiento con rapamicina redujo significativamente los niveles de NO desde pase 10, con una disminución aún más marcada en los pases 14 y 18 (Figura 22B).

El cociente ERO/NO aumentó significativamente en el pase 18, tanto en las células control como en las tratadas con rapamicina (Figura 22C). A pesar de la modulación individual de ERO y NO por el tratamiento, no se observaron diferencias significativas en el cociente ERO/NO entre los grupos control y tratados en ninguno de los pases analizados.

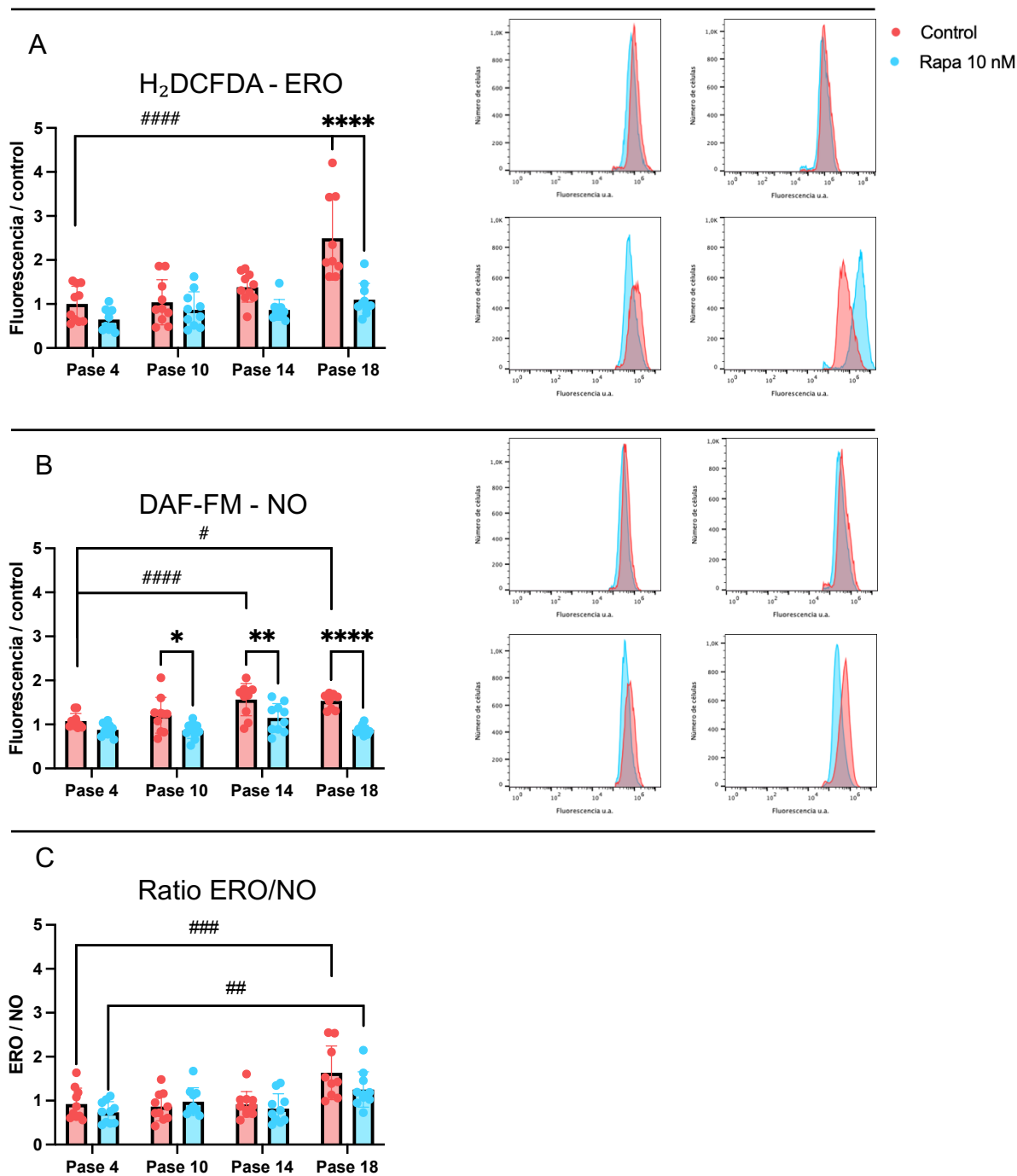


Figura 22 Efecto del tratamiento con rapamicina en el equilibrio redox y en los niveles de NO en cultivos de células HUVEC.

A. Niveles relativos de ERO, medidos mediante la sonda H₂DCFDA y citometría de flujo, en células HUVEC control o tratadas con rapamicina (10 nM, 24h/semana), en los pases 4, 10, 14 y 18.

B. Niveles relativos de NO, medidos mediante la sonda DAF-FM en las mismas condiciones.

C. Ratio ERO/NO, calculada como el cociente entre las señales normalizadas de H₂DCFDA y DAF-FM para cada línea celular.

Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con corrección de Šidák para comparaciones múltiples. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (SD), $n = 10$ líneas celulares independientes.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,0001$.

$p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$; #### $p \leq 0,0001$ (comparaciones entre pases dentro del grupo control).

5.5.2. Efecto de los pases y la rapamicina sobre la expresión de moléculas de adhesión

Se evaluó la expresión de las moléculas de adhesión celular ICAM-1 y VCAM-1 en los pases 4, 10, 14 y 18.

La expresión de ICAM-1 aumentó progresivamente con el avance de los pases de cultivo. Este incremento fue significativo a nivel de ARNm en el pase 18 (Figura 23A) y a nivel proteico en los pases 14 y 18 (Figura 23C). En ambos casos, el aumento de ICAM-1 fue significativamente atenuado por el tratamiento con rapamicina.

En contraste, la expresión de VCAM-1 a nivel de ARNm se mantuvo constante a lo largo de todos los pases analizados y no se vio afectada por el tratamiento con rapamicina (Figura 23B). Los niveles proteicos de VCAM-1 no fueron detectables mediante western blot en ninguna de las condiciones evaluadas.

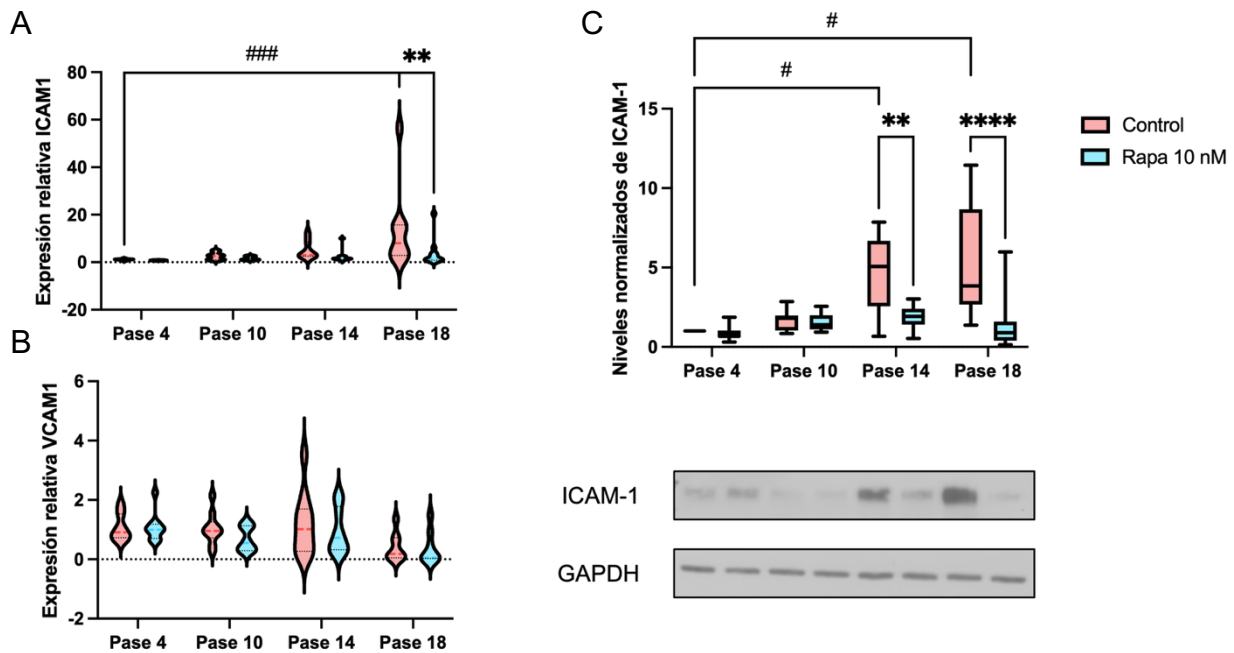


Figura 23 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre la expresión de moléculas de adhesión endotelial en cultivos de células HUVEC.

A-B. Cuantificación relativa (Rq) de la expresión génica de ICAM1 y VCAM1 en células HUVEC control o tratadas con rapamicina (10 nM, 24h/semana) en los pases 4, 10, 14 y 18.

C. Niveles de proteína de ICAM-1 determinados mediante western blot.

Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con corrección de Šidák para comparaciones múltiples. Los datos se expresan como media \pm SD; n = 10 líneas celulares independientes.

p \leq 0,01; **p \leq 0,0001.

#p \leq 0,05; ###p \leq 0,001 (comparaciones entre pases dentro del grupo control).

5.5.3. Efecto de los pases y la rapamicina sobre la expresión de citocinas proinflamatorias

Para complementar el análisis del fenotipo proinflamatorio asociado a la senescencia replicativa endotelial, se evaluaron los niveles de expresión génica (mediante RT-qPCR) de las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-8 en los pases 4, 10, 14 y 18.

Los resultados mostraron una tendencia al alza en la expresión relativa de ambas citocinas a partir del pase 14, siendo esta tendencia más pronunciada en el caso de IL-8 (Figura 24). Estas diferencias no alcanzaron la significación estadística en ninguno de los puntos temporales analizados.

El tratamiento con rapamicina no produjo efectos significativos sobre la expresión de IL-6 ni de IL-8 en ninguno de los pases de cultivo (Figura 24).

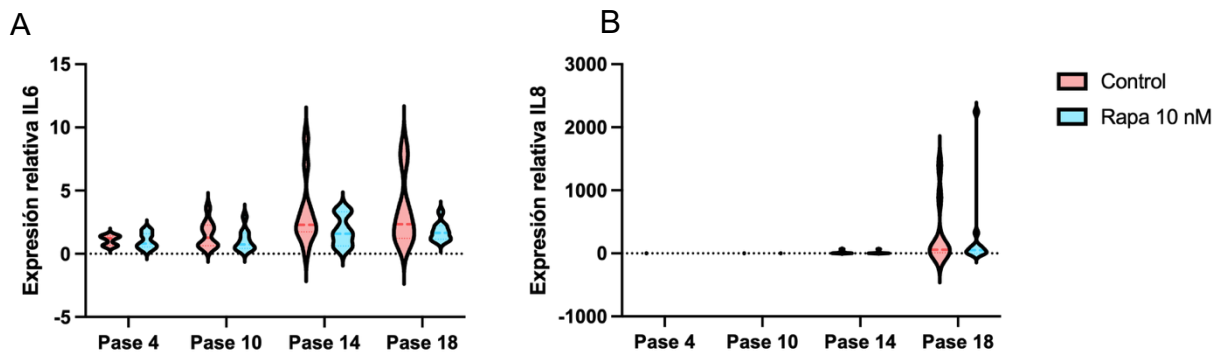


Figura 24 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre la expresión génica de IL6 e IL8 en células HUVEC.

A-B. Cuantificación relativa (Rq) de la expresión de IL6 e IL8 mediante RT-qPCR en células HUVEC control o tratadas con rapamicina (10 nM, 24h/semana), en los pases 4, 10, 14 y 18.

Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con corrección de Šidák para comparaciones múltiples. Los datos se expresan como media \pm SD; $n = 10$ líneas celulares independientes.

5.5.4. Efecto de los pases y la rapamicina sobre el perfil de secreción de citocinas

Para caracterizar la composición del SASP en células HUVEC a lo largo de los cultivos y evaluar la modulación por el tratamiento con rapamicina, se analizaron los niveles de diversas citocinas secretadas en el MC de células HUVEC control (pases 4 y 18) y tratadas con rapamicina (pase 18).

El análisis mediante *array* de membrana reveló un incremento significativo en la secreción de varias citocinas proinflamatorias y quimiocinas en las células HUVEC control de pase 18 en comparación con las de pase 4. Específicamente, se observó una mayor expresión relativa de las quimiocinas GRO α (CXCL1), GRO β (CXCL2), GRO γ (CXCL3), la citocina IL-6 y la quimiocina MCP-3 (CCL7) (Figura 25).

El tratamiento con rapamicina mostró un efecto modulador complejo sobre la composición del SASP en el pase 18. Por un lado, se observó una atenuación en la secreción de MCP-3 en las células tratadas con rapamicina en comparación con las células control del mismo pase. En contraste, el tratamiento exacerbó el aumento en los niveles secretados de GRO α e IL-8, que no alcanzaron la significación estadística en el grupo control de pase 18, pero sí en el tratado (Figura 25). Asimismo, el tratamiento mostró una tendencia a agravar también el aumento en la secreción de GRO α , β , γ e IL-6 en el pase 18.

En el caso de MCP-1, el tratamiento con rapamicina indujo un aumento en su secreción, no observado en el control de pase 18.

No se detectaron cambios significativos en otras citocinas analizadas en el panel (Figura 25).

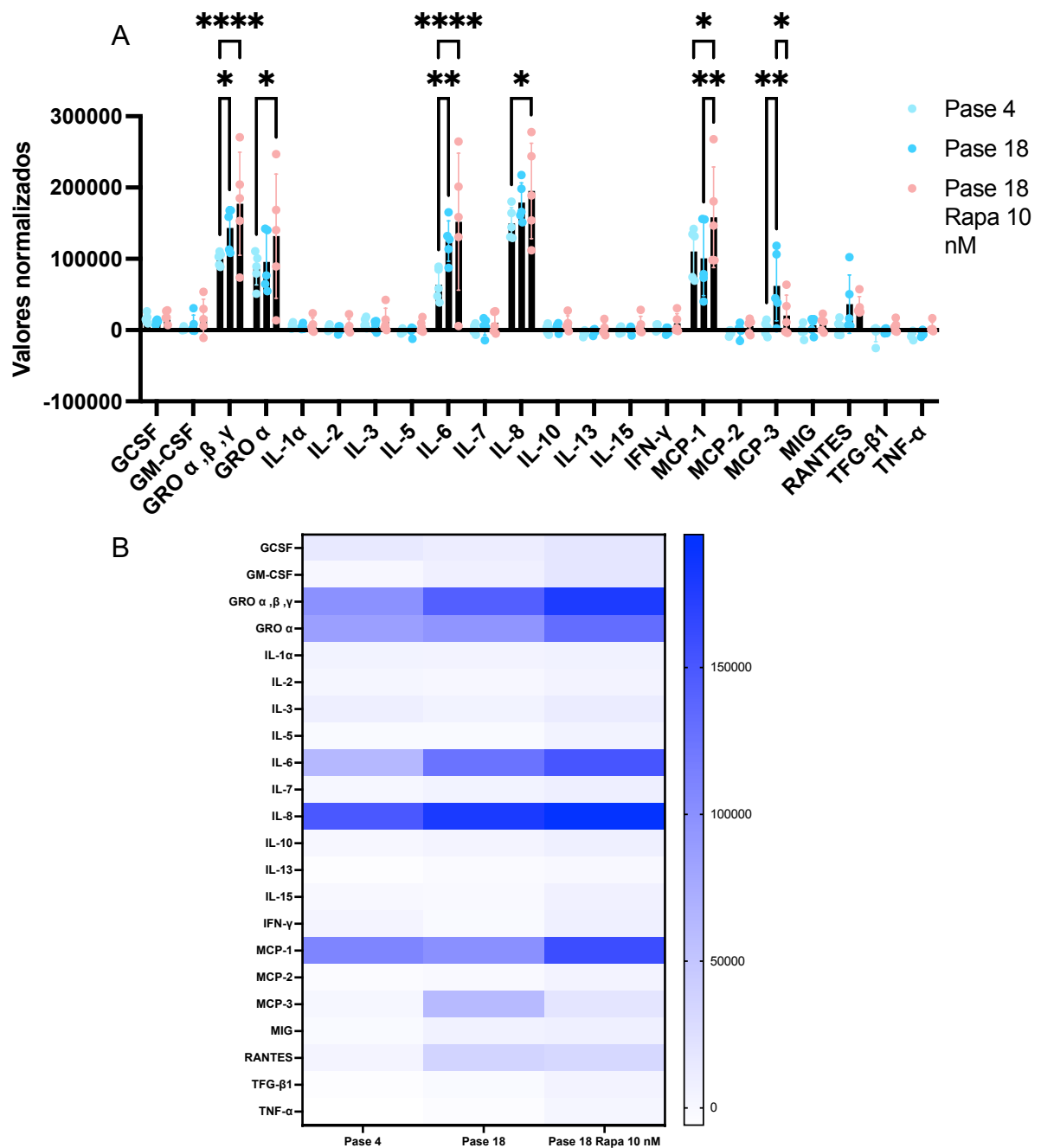


Figura 25 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre la secreción de citocinas en cultivos de células HUVEC.

A. Niveles relativos de citocinas en los sobrenadantes de cultivo de células HUVEC control de pase 4 y 18, y tratadas con rapamicina (10 nM, 24h/semana) de pase 18, analizados mediante un array de membrana tipo sándwich. Las señales se cuantificaron densitométricamente, se normalizaron frente al control positivo de membrana y se expresaron en unidades de densidad relativa.

B. Mapa de calor representando los niveles relativos de secreción de citocinas para cada línea celular individual ($n = 4$) en condiciones de control o tratamiento con rapamicina. Las intensidades se normalizaron frente al control positivo de membrana. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con corrección de Tukey para comparaciones múltiples. Los datos se expresan como media \pm SD, $n = 4$ líneas celulares independientes.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$.

5.6. EFECTOS DEL SASP SOBRE MONOCITOS THP-1

5.6.1. Efecto del MC de células HUVEC sobre la producción de ERO en monocitos THP-1

Con el objetivo de investigar el impacto del SASP de las células HUVEC sobre células inmunes circulantes, se evaluaron los niveles intracelulares de ERO en monocitos THP-1 tratados durante 24 horas con MC recolectado de cultivos de HUVEC en pases 4, 10, 14 y 18, control y tratadas con rapamicina.

Los resultados mostraron que los niveles intracelulares de ERO en los monocitos THP-1 no se vieron modificados tras la exposición al MC de HUVEC, independientemente del pase o el tratamiento de las células HUVEC (Figura 26).

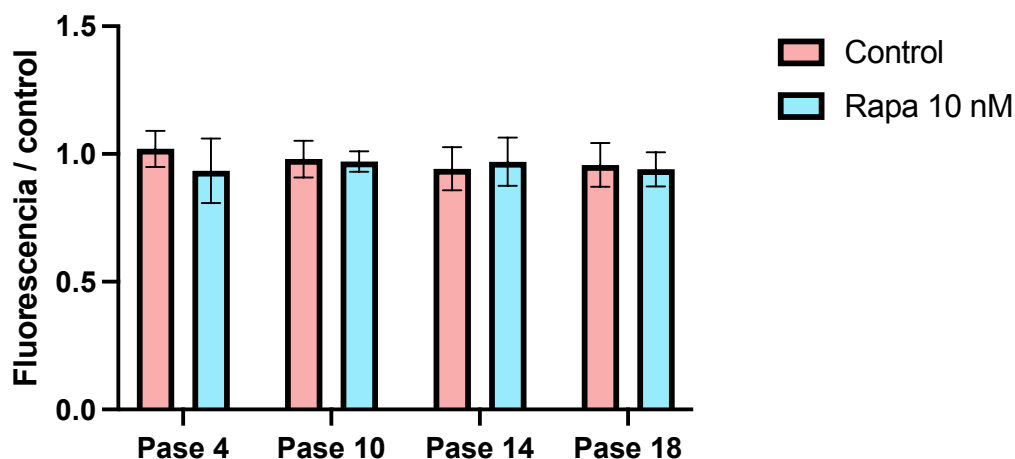


Figura 26 Efecto del MC de células HUVEC sobre la producción de ERO en monocitos THP-1.

Cuantificación de la fluorescencia relativa de la sonda H_2DCFDA en monocitos THP-1 tras 24 horas de tratamiento con MC procedente de células HUVEC control o tratadas con rapamicina (10 nM, 24h/semana), recogido en los pases 4, 10, 14 y 18.

Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con corrección de Šidák para comparaciones múltiples. Los datos se expresan como media \pm SD; $n = 5$ CM de líneas celulares independientes.

5.6.2. Efecto del MC de células HUVEC sobre la vía de JAK2/STAT3 y la expresión de moléculas de adhesión en monocitos THP-1

Se evaluó el impacto del MC en la activación de la vía de señalización JAK2/STAT3 y la expresión de moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en monocitos THP-1.

El MC procedente de células HUVEC de pases 14 y 18 provocó un aumento significativo en la fosforilación de STAT3 en Tyr705. Este efecto de activación de STAT3 fue significativamente menor cuando los monocitos se trataron con MC procedente de células HUVEC tratadas con rapamicina en el pase 14, mientras que en el pase 18 solamente se observó una tendencia a la reducción (Figura 27A).

Paralelamente, se observó un aumento en los niveles proteicos de ICAM-1 en los monocitos THP-1 tratados con MC de HUVEC control de pase 18, con una tendencia al aumento en el pase 14. El MC de las células HUVEC tratadas con rapamicina no modificó los niveles de ICAM-1 en los monocitos THP-1 respecto al control, aunque mostró una tendencia a disminuir en pase 14 (Figura 27B). Los niveles proteicos de VCAM-1 no fueron detectables mediante western blot en los monocitos THP-1 bajo estas condiciones experimentales.

A nivel de ARNm, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de ICAM-1 ni VCAM-1 en los monocitos THP-1 tras el tratamiento con MC de células HUVEC no tratadas. VCAM-1 mostró una tendencia al aumento con el MC de HUVEC de pase 18, sin que el tratamiento con rapamicina en las HUVEC donantes alterara esta respuesta (Figura 27C).

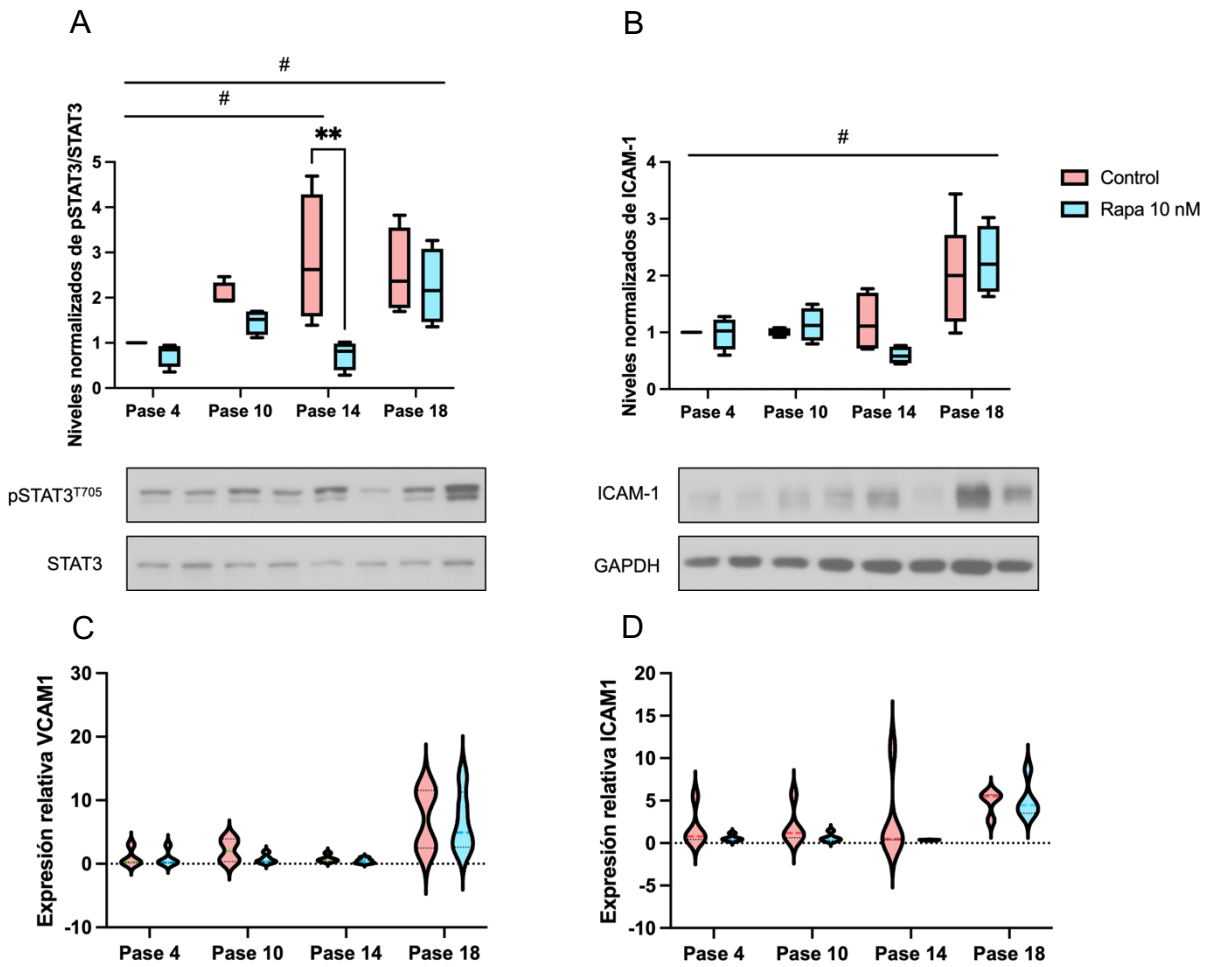


Figura 27 Activación de monocitos THP-1 tras tratamiento con MC de células HUVEC.

A-B. Análisis por western blot de la fosforilación de STAT3 y de los niveles de ICAM-1 en monocitos THP-1 tras 24 horas de exposición a MC procedente de células HUVEC control o tratadas con rapamicina (10 nM, 24h/semana), recogido en los pases 4, 10, 14 y 18.

C-D. Expresión génica relativa (Rq) de VCAM1 e ICAM1 en las mismas condiciones experimentales.

Análisis estadístico: ANOVA de dos vías con corrección de Šidák para comparaciones múltiples. Los datos se expresan como media \pm SD; n = 5 MC de líneas celulares independientes.

** $p \leq 0,01$.

$p \leq 0,05$ (comparaciones entre pases dentro del grupo control).

6- DISCUSIÓN

6. Discusión

6.1. DISCUSIÓN

El envejecimiento poblacional representa un desafío sociosanitario sin precedentes. El deterioro funcional asociado a la edad incrementa los costes asistenciales y compromete la sostenibilidad del sistema sanitario y de pensiones, al tiempo que prolonga los años de vida con morbilidad (332).

El aumento de la longevidad experimentado en las últimas décadas no se ha traducido en un incremento equivalente de la HALE, lo que resulta en un periodo prolongado de morbilidad y dependencia. Ante esta realidad, la gerociencia emerge como un campo de estudio crucial, proponiendo la intervención sobre los mecanismos biológicos fundamentales del envejecimiento para retrasar la aparición simultánea de múltiples patologías crónicas y mejorar sustancialmente la calidad de vida en la vejez (32,44).

El entendimiento del envejecimiento como un proceso multifactorial impulsado por una serie de claves interconectadas, desde la inestabilidad genómica y la senescencia celular hasta la disfunción mitocondrial y la inflamación crónica, ha revolucionado la investigación en gerociencia. Aunque no exentas de problemas, su valor heurístico y capacidad para guiar intervenciones enfocadas a modular el envejecimiento es innegable (25,26).

Entre las intervenciones más estudiadas y prometedoras se encuentran la RC, el ejercicio físico, los tratamientos enfocados en la senescencia celular, los activadores de AMPK como la metformina y los inhibidores de mTOR como la rapamicina (34,35,39,41).

La rapamicina ha demostrado extender significativamente la longevidad y mejorar la salud en numerosos organismos modelo, incluso ratones en etapas avanzadas de la vida (41,42). Ensayos clínicos con análogos de rapamicina en humanos sugieren beneficios en la función inmune y atenuación de la inflamación sistémica crónica (43,222,278).

En este trabajo se exploró el efecto del tratamiento intermitente con rapamicina (10 nM, 24h/semana) en la senescencia replicativa de células endoteliales humanas HUVEC. Para ello, se diseñó un protocolo experimental que permitió evaluar la duración de los cultivos control y tratados, así como realizar una valoración longitudinal de diversos marcadores de proliferación y ciclo celular, senescencia, identidad y función endotelial, estrés oxidativo y expresión de SASP.

La senescencia replicativa constituye un modelo clásico y bien caracterizado para el estudio de la senescencia celular asociada al envejecimiento *in vitro*. Se basa en el fenómeno descrito por Hayflick, según el cual las células normales poseen un número limitado de divisiones antes de entrar en un estado irreversible de detención del ciclo celular (58,59). En el caso de las células endoteliales humanas HUVEC, este modelo permite reproducir características clave del fenotipo senescente, como la detención proliferativa, los cambios morfológicos, la disfunción mitocondrial y producción de ERO, la acumulación de marcadores como p21^{Cip1} y p16^{INK4a}, y la secreción del SASP, con implicaciones proinflamatorias y proaterogénicas (137,141,308).

Por otra parte, el uso de HUVEC como modelo *in vitro* resulta pertinente para el estudio del envejecimiento vascular, dado que el endotelio es uno de los primeros tejidos en mostrar signos de deterioro funcional con la edad, contribuyendo a la progresión de enfermedades cardiovasculares (134).

El potencial geroprotector de la rapamicina se atribuye a su capacidad para modular procesos clave del envejecimiento, como la traducción proteica, la autofagia, el metabolismo energético y la respuesta al estrés (211–213). La vía mTOR está directamente implicada en la regulación de la senescencia celular, y su inhibición ha demostrado prevenir o revertir parcialmente el fenotipo senescente en diversos tipos celulares, incluidas las células endoteliales (125,333).

Aunque los efectos de la rapamicina sobre la senescencia celular están bien documentados, el impacto de pautas intermitentes, como las empleadas en usos fuera de prescripción, no ha sido suficientemente caracterizado, lo que justifica la necesidad de explorar dicho régimen. El uso intermitente de rapamicina se plantea como una solución a los efectos secundarios derivados del uso crónico, atribuidos a la inhibición de mTORC2 (224,260,334).

Por tanto, la combinación del modelo de senescencia replicativa en HUVEC con un tratamiento intermitente con rapamicina constituye un sistema experimental relevante para analizar la interacción entre senescencia endotelial y modulación farmacológica de mTOR, con potenciales implicaciones traslacionales en la prevención del envejecimiento vascular y las enfermedades asociadas con este.

La concentración seleccionada de rapamicina se corresponde con la concentración promedio de sirólimus administrada a pacientes durante la práctica clínica (335), por lo que se trata de una concentración segura y bien tolerada.

6.1.1. Inhibición de las vías de mTOR por el tratamiento intermitente con rapamicina

En este trabajo, el tratamiento de las células HUVEC con rapamicina produjo una inhibición clara pero transitoria de la vía mTORC1, tal y como refleja la disminución en la fosforilación de S6K en Thr389 (336). Esta inhibición fue evidente en el día 1, pero desapareció a las 48 horas de retirar el fármaco. La recuperación de la fosforilación de S6K a niveles basales en el día 3 indica que el efecto del tratamiento semanal no genera una inhibición sostenida de mTORC1 en las condiciones ensayadas (Figura 8A).

Sin embargo, la disminución de la fosforilación de S6K en el día 7 podría reflejar un cambio estable en la homeostasis de la vía mTORC1 inducido por la exposición interrumpida a rapamicina, como se ha descrito en otros contextos celulares (309). Alternativamente, no puede descartarse un efecto indirecto mediado por interacciones con otras rutas de señalización.

En paralelo, se observó una activación transitoria de mTORC2, medida por la fosforilación de AKT1 en Ser473. Esta desinhibición es coherente con la literatura previa que describe una activación de la vía mTORC2 tras la inhibición selectiva de mTORC1, como mecanismo de compensación celular orientado a mantener la supervivencia y el equilibrio metabólico (338,339). La recuperación de los niveles de pAKT1 a valores basales a partir del día 3 sugiere

que este fenómeno es limitado en el tiempo y podría formar parte de una respuesta aguda de adaptación (Figura 8B).

El papel de mTORC2 en la longevidad no está muy claro. Su inhibición crónica parece asociarse con una alteración en la homeostasis de la glucosa y lípidos, y podría representar un detrimento para la esperanza de vida (202,214,340). Sin embargo, existe cierta evidencia de los posibles beneficios de inhibir ambos complejos frente a la senescencia celular (341–343).

La activación moderada y sostenida de ERK1/2 observada durante los tres primeros días refuerza la hipótesis de una intercomunicación funcional entre la vía MAPK y mTOR en condiciones de estrés o inhibición farmacológica. Este tipo de interacciones ha sido documentado previamente en diversos contextos celulares y podría representar una vía de escape activada de forma transitoria para preservar funciones esenciales como la supervivencia o la adaptación al entorno (338). El retorno a niveles basales en el día 7 indica que esta respuesta también es reversible y dependiente del estímulo puntual (Figura 8C).

Por el contrario, la ausencia de cambios en la fosforilación de eNOS en Ser1177 sugiere que el tratamiento con rapamicina, en este esquema intermitente, no altera directamente la vía de señalización implicada en la producción de NO en HUVEC. Esto contrasta con estudios en modelos *in vivo* y en células endoteliales *in vitro*, donde se ha descrito una modulación negativa de la actividad de eNOS por la inhibición farmacológica de mTORC1 y mTORC2 por rapamicina, así como por el silenciamiento de diferentes unidades de los dos complejos mediante siARN (344). El régimen de tratamiento empleado en este trabajo no produjo la inhibición de mTORC2 ni de eNOS, ni la modulación negativa de la producción de NO (Figura 8D, Figura 22B).

El régimen intermitente de rapamicina parece inhibir de forma transitoria y específica las vías intracelulares de mTORC1, sin inducir alteraciones sostenidas ni inhibir mTORC2 y otras vías relacionadas. Este perfil podría tener relevancia desde un punto de vista terapéutico, al permitir una modulación periódica de mTORC1 sin comprometer de forma persistente otras funciones celulares críticas. Sería necesario determinar el papel de la activación de mTORC2 y ERK1/2 en respuesta al tratamiento.

6.1.2. Inhibición de mTOR y autofagia en el tratamiento intermitente con rapamicina

Pese al conocido papel de mTOR como regulador negativo de la autofagia (197,198,345,346), los resultados obtenidos no muestran una activación sostenida de este proceso en respuesta al tratamiento intermitente con rapamicina. El análisis de los niveles de Beclin-1, p62 y la ratio LC3-II/LC3-I, tres marcadores ampliamente utilizados para monitorizar la autofagia en estudios celulares, no reveló cambios significativos en ninguno de los puntos temporales analizados (Figura 9). Esta ausencia de respuesta sugiere que, al menos en las condiciones experimentales empleadas, la inhibición puntual de mTORC1 no se traduce en una inducción mantenida del flujo autofágico en células HUVEC.

Estos hallazgos contrastan con estudios previos en modelos animales, o en cultivos de células endoteliales, donde la rapamicina ha demostrado activar la autofagia de forma proporcional al

tiempo de exposición. Sin embargo, este efecto es dependiente, además del tiempo de exposición, del contexto celular, la dosis, y la dinámica basal de las células (198,220,347,348). De hecho, diversos tipos celulares presentan una sensibilidad variable a la inhibición de mTORC2 tras 24 horas de tratamiento con rapamicina. Por ejemplo, las células PC3 muestran una elevada sensibilidad, mientras que las células A549 no presentan respuesta al tratamiento. En ese mismo estudio, se describió una disminución de la fosforilación de AKT en Ser473 en células HUVEC tras 24 horas de exposición a 10 nM de rapamicina (349). Dado el papel de mTORC2 en la autofagia, esta diferencia con nuestro trabajo, donde se observó la inducción de pAKT Ser473 en respuesta a la rapamicina, podría justificar, al menos en parte, la ausencia de inducción de la autofagia (Figura 8 y Figura 9) (346,350). Se necesitarían más estudios para comprender la discrepancia observada en el efecto de la rapamicina sobre mTORC2.

Otra posibilidad es que la activación de la autofagia se produzca de forma transitoria en una ventana temporal más breve, no captada por los puntos de muestreo seleccionados (351). El uso de ensayos complementarios como el seguimiento de LC3 por inmunofluorescencia o el análisis del flujo autofágico con inhibidores lisosomales podría aportar mayor resolución en estudios futuros (301).

6.1.3. Efecto antisenescente del tratamiento intermitente con rapamicina

Tradicionalmente, se ha propuesto que parte del efecto antisenescente de la rapamicina podría deberse a la inducción de la autofagia, como mecanismo de eliminación de componentes dañados y mantenimiento de la homeostasis celular (348,352). Sin embargo, en este estudio, la falta de inducción observable en la expresión de los marcadores de autofagia sugiere que la prolongación de la vida replicativa detectada en los cultivos no parece estar mediada por una activación sostenida de la autofagia, al menos en términos de los marcadores analizados. Esto apunta a otros mecanismos, como la modulación del SASP, del estrés oxidativo, la modulación epigenética o la alteración de rutas anabólicas, como responsables del efecto antisenescente del tratamiento intermitente con rapamicina en este modelo. La activación transitoria de rutas prosupervivencia celular, como PI3K/AKT y MEK/ERK, podría asimismo cumplir un papel relevante (Figura 8B,C) (338,353,354).

El tratamiento intermitente con rapamicina tuvo un efecto funcional claro sobre la longevidad replicativa de las HUVEC. El análisis de supervivencia reveló una prolongación significativa del cultivo en las células tratadas frente a sus controles emparejados (Figura 10). Este efecto fue consistente y estadísticamente significativo, pero heterogéneo entre líneas celulares, lo que sugiere que un régimen semanal de rapamicina es capaz de retrasar de manera efectiva, pero desigual, la entrada en senescencia replicativa *in vitro*, posiblemente a través de mecanismos independientes de una activación sostenida de la autofagia.

Complementando este análisis, el seguimiento longitudinal del PDL en los pases correspondientes a las distintas determinaciones funcionales reveló que, aunque tanto el grupo control como el tratado con rapamicina presentaron un incremento progresivo de los PDL, el grupo tratado alcanzó un PDL significativamente mayor en el pase 18 (Figura 11). Este resultado sugiere una mayor capacidad proliferativa en el grupo tratado, consistente con una menor acumulación de células senescentes.

No obstante, es importante considerar que, en este punto experimental (pase 18), el grupo tratado presentaba un promedio de 5 PD adicionales respecto a los controles, lo que podría impactar en ciertos marcadores analizados.

La evaluación de la capacidad proliferativa mediante el ensayo MTT mostró que el tratamiento intermitente con rapamicina preserva la actividad proliferativa de las células HUVEC en estadios avanzados del cultivo. En los pases iniciales (pase 4 y 10), ambos grupos presentaron tasas de proliferación comparables, lo que indica que la administración de rapamicina no altera la dinámica basal del crecimiento celular (Figura 12AB). Este hallazgo concuerda con la ausencia de diferencias significativas en el PDL en las fases tempranas del cultivo, e indica que el tratamiento con rapamicina no reduce la proliferación celular.

La inhibición moderada y transitoria de mTORC1 (en torno al 50 % frente a la diana S6K), y la activación consecuente de mTORC2 y ERK (Figura 8A- C) sugieren un efecto contenido de la rapamicina en las condiciones ensayadas que permite mantener la capacidad proliferativa de las células tratadas. En trabajos previos realizados con células HUVEC y ARPE-19, concentraciones más elevadas de rapamicina (100 ng/mL, equivalente a aproximadamente 110 nM) y/o durante un periodo más prolongado (24-72 h) inducen un bloqueo de la ruta mTORC1/S6K y la detención de la proliferación (324,355).

A medida que las células se aproximaron al límite replicativo, se observó una divergencia clara entre los grupos experimentales. En los pases 14 y 18, los controles mostraron una reducción progresiva de la proliferación, mientras que el grupo tratado con rapamicina mantuvo niveles significativamente más elevados, con una diferencia particularmente marcada en pase 18 ($p \leq 0,001$) (Figura 12C,D). Este patrón refuerza el efecto protector acumulativo del tratamiento que se hace evidente en pases avanzados, en coherencia con los datos de PDL y con la prolongación de la longevidad replicativa observada en el análisis de supervivencia (Figura 10 y Figura 11).

La conservación de la capacidad proliferativa en fases tardías del cultivo refuerza la hipótesis de que la rapamicina ejerce una función moduladora sobre procesos implicados en el establecimiento de la senescencia replicativa, más que un efecto estimulante directo sobre la proliferación en condiciones basales.

Es importante tener en cuenta la diferencia acumulada en el número de PDL en el pase 18, ya que el grupo tratado conserva la capacidad proliferativa a pesar de haber pasado, de media, por 5 PD más que el grupo control (Figura 11).

El análisis de la distribución del ciclo celular permitió caracterizar de manera más precisa el impacto del tratamiento intermitente con rapamicina sobre la dinámica proliferativa de las HUVEC a lo largo del cultivo. Durante la mayor parte del periodo experimental (pases 4, 10 y 14), no se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de células en fase S ni en fase G2/M, tanto en la comparación entre grupos como en la progresión de los pases. Este hallazgo indica que la rapamicina, en el esquema de administración utilizado, no altera de forma sustancial la fase de síntesis de ADN ni la capacidad global de división celular en fases intermedias (Figura 13).

En el pase 18 se observó un incremento ligero, pero estadísticamente significativo, en el porcentaje de células en fase G1 en el grupo tratado con rapamicina, acompañado de una tendencia a la reducción de la fase S (Figura 13). Sin embargo, este cambio no se correspondió con una disminución de la proliferación medida mediante el ensayo MTT, donde los cultivos tratados mantuvieron niveles significativamente más elevados de actividad metabólica y proliferativa respecto a los controles (Figura 12).

La senescencia replicativa en células HUVEC está relacionada de manera consistente con la acumulación de poliploidías y otro tipo de alteraciones nucleares, lo que hace difícil la interpretación de los perfiles de ciclo celular evaluados mediante el contenido en ADN (65,356). En este caso, el tratamiento con rapamicina podría producir un descenso del número de células senescentes binucleadas o con micronúcleos que podría distorsionar la cuantificación del ADN (Figura 13). Se requieren estudios adicionales de la estructura nuclear para comprender mejor la distribución del ciclo celular en esta fase del cultivo.

En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento intermitente con rapamicina no provoca una detención sostenida del ciclo celular en fases tempranas ni avanzadas, sino que induce un perfil discreto de redistribución hacia G1 en fases avanzadas, que coexiste con una proliferación mantenida. Este fenómeno sugiere que la prolongación de la longevidad replicativa puede producirse sin un descenso neto de la capacidad proliferativa global.

La evaluación de la actividad SA- β -Gal proporcionó información adicional sobre el impacto del tratamiento intermitente con rapamicina en la acumulación de células senescentes durante el cultivo prolongado. En los grupos control, la proporción de células con actividad SA- β -Gal aumentó progresivamente con los pases, en línea con el patrón característico de entrada en senescencia replicativa descrito en cultivos de células endoteliales humanas (56,65,307). Este incremento progresivo es consistente con el agotamiento de los cultivos (Figura 10) y la reducción de la capacidad proliferativa observada en pases avanzados (Figura 12).

En contraste, los cultivos tratados semanalmente con rapamicina mostraron una reducción significativa en la proporción de células con actividad SA- β -Gal frente a sus respectivos controles. Este efecto se hizo evidente a partir del pase 10 y fue aumentando de magnitud hasta el pase 18 (Figura 14).

Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que la administración intermitente de rapamicina mitiga la acumulación progresiva de células senescentes en cultivos prolongados. La menor proporción de células con actividad SA- β -Gal es coherente con el mantenimiento de la capacidad proliferativa y con el aumento en el PDL observado en los experimentos previos. Este perfil sugiere que la rapamicina actúa, al menos en parte, modulando los procesos de estrés celular que conducen al establecimiento de la senescencia replicativa. La autofagia no parece ser uno de los procesos subyacentes modulados por el tratamiento, como se ha mencionado anteriormente.

La actividad SA- β -Gal no es exclusiva de células senescentes y puede estar influida por otros estados celulares como la confluencia prolongada o determinadas respuestas al estrés (357). Sin embargo, el descenso sostenido de las células con actividad SA- β -Gal respecto a sus controles emparejados, unido al mantenimiento de la proliferación y la prolongación de la longevidad

replicativa, refuerza la hipótesis de que la rapamicina ejerce un efecto protector frente a la senescencia replicativa endotelial *in vitro*.

El análisis de los inhibidores del ciclo celular p16^{INK4a} y p21^{Cip1} permitió profundizar en los mecanismos moleculares subyacentes a la senescencia replicativa de las células HUVEC y evaluar cómo son modulados por la rapamicina. En los cultivos control, ambos marcadores mostraron un aumento dependiente del número de pases, confirmando su valor como indicadores del agotamiento replicativo progresivo. No obstante, la cinética de inducción fue diferente: p21^{Cip1} aumentó de manera más temprana y progresiva, con incrementos significativos desde el pase 10, mientras que p16^{INK4a} alcanzó niveles elevados más tarde, con significación estadística únicamente en el pase 18 (Figura 15). Este patrón escalonado es congruente con estudios previos que describen a p21^{Cip1} como un mediador temprano de la detención proliferativa transitoria, mientras que p16^{INK4a} se asocia a la consolidación de un estado senescente más estable e irreversible (358).

Un hallazgo relevante fue la marcada heterogeneidad interindividual en la inducción de p16^{INK4a} a nivel proteico. Mientras que el incremento mediano en el pase 18 fue de unas 6 veces respecto al pase inicial, el cambio medio ascendió a aproximadamente 50 veces, con algunas líneas celulares mostrando inducciones de hasta 256 veces. Esta dispersión es consistente con los niveles de ARNm, lo que sugiere que parte de la variabilidad refleja diferencias intrínsecas en la proximidad al límite replicativo y la capacidad de activar este programa senescente.

Del mismo modo, esta dispersión también se observa en los PDL alcanzados por cada línea celular independiente, y la variabilidad en la extensión de la duración de los cultivos con el tratamiento (Figura 10).

Este grado de heterogeneidad entre líneas celulares genéticamente distintas podría tener implicaciones relevantes si se traslada a un contexto clínico, con mayor variabilidad ambiental sumándose a la variabilidad genética (359).

El tratamiento intermitente con rapamicina mostró un efecto consistente sobre la modulación de p16^{INK4a}, con una tendencia a reducir su acumulación proteica en los pases 14 y 18 y una disminución significativa de su ARNm en el pase 18 (Figura 15A,C). Este patrón indica que rapamicina atenúa la activación de la vía p16^{INK4}, posiblemente contribuyendo a retrasar la consolidación del fenotipo senescente avanzado. Este hallazgo resulta coherente con el mantenimiento de la capacidad proliferativa y la menor proporción de células SA-β-Gal positivas observados en los experimentos previos, pero contrasta con el mayor porcentaje de células en la fase G1 del ciclo celular observado en el grupo tratado (Figura 13), ya que la actividad de p16^{INK4} se asocia con el arresto del ciclo en dicha fase (360). Serán necesarios estudios adicionales para comprender esta redistribución del ciclo celular observada en el grupo tratado.

En contraste, la acumulación de p21^{Cip1} fue más moderada y no se vio significativamente modificada por el tratamiento, ni a nivel proteico ni transcripcional (Figura 15B,D). El incremento en los niveles de proteína no se corresponde con el incremento del ARNm de p21^{Cip1}, lo que sugiere la existencia de mecanismos de regulación postranscripcional o proteostática. Este fenómeno es consistente con estudios que describen una regulación compleja

de p21^{Cip1} a través de la modulación de la estabilidad de la proteína y de la actividad de proteasas específicas en situaciones de estrés replicativo o senescencia (361). El hecho de que la rapamicina no alterase de manera significativa esta vía sugiere que su acción antisenescente se centra en la modulación de p16^{INK4a} y no de p21^{Cip1}.

El aparente efecto selectivo de la rapamicina sobre los reguladores del ciclo celular, mitigando preferentemente la activación tardía y más estable de la vía p16^{INK4a} sin alterar sustancialmente la vía p21^{Cip1}, podría explicar por qué el tratamiento prolonga la capacidad replicativa sin inducir un bloqueo proliferativo sostenido ni una desdiferenciación celular, contribuyendo al mantenimiento de un equilibrio funcional en fases avanzadas del cultivo. Hallazgos previos que describen el papel de S6K como inductor de la expresión de p16^{INK4a} en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, del inglés *Mouse Embryonic Fibroblast*) respaldan esta hipótesis (362).

6.1.4. Conservación de la identidad y función endotelial

La evaluación integrada de marcadores de identidad, características morfológicas y funciones específicas permitió analizar de manera detallada si el tratamiento intermitente con rapamicina compromete el fenotipo endotelial o induce cambios que pudieran interpretarse como una EndMT.

Los marcadores endoteliales empleados son proteínas expresadas en células endoteliales, pero no mesenquimales, y cumplen importantes funciones como el mantenimiento de la barrera endotelial (PECAM-1 y VE-cadherina), migración celular (PECAM-1) y coagulación (vWF) (363–365). Por otro lado, tanto TAGLN como α -SMA son componentes del citoesqueleto ausentes en células endoteliales, y se usan frecuentemente como marcadores de EndMT (366,367). Las líneas comerciales HUV-EC-C y MRC-5 se emplearon como control positivo y negativo de identidad endotelial.

El análisis transcripcional de PECAM1 (CD31) y vWF mostró expresión de ambos en todos los pases y condiciones experimentales. En paralelo, la ausencia de expresión significativa de TAGLN, tanto en los grupos control como tratados, confirma la ausencia de un fenotipo mesenquimal a nivel de ARNm (Figura 16). Estos resultados indican que la identidad molecular endotelial se preserva durante la senescencia replicativa *in vitro* y no se ve afectada por la exposición intermitente a rapamicina.

A nivel proteico, el patrón continuo de VE-cadherina en la membrana plasmática confirmó la conservación de las uniones célula-célula. La ligera desorganización y disminución de la intensidad observada en el pase 18 de los controles, hallazgo consistente con la disrupción de la barrera endotelial en senescencia (130), fue mitigada en los cultivos tratados con rapamicina, lo que sugiere un efecto protector sobre la integridad estructural de las uniones adherentes (Figura 17). La ausencia de expresión detectable de α -SMA en todas las condiciones (Figura 18), en contraste con la señal intensa en los fibroblastos MRC-5, refuerza la ausencia de EndMT (Figura 19). En conjunto, estos datos confirman que el tratamiento no solo mantiene la identidad fenotípica, sino que contribuye a preservar aspectos estructurales clave de la funcionalidad endotelial.

La evaluación de funciones específicas reforzó esta interpretación. Dicha evaluación es clave, dado el papel de mTOR tanto en la proliferación y migración celular necesarias para el cierre de heridas, como en la formación de nuevos vasos. Además, ambas funciones resultan alteradas durante la senescencia endotelial (134,321,355).

La capacidad migratoria, medida mediante el ensayo de migración mediante raspado, se mantuvo estable a lo largo de los pases y no se vio afectada por el envejecimiento replicativo ni por el tratamiento con rapamicina (Figura 20). Este hallazgo indica que el tratamiento intermitente con rapamicina no compromete una función esencial como la migración.

Por último, el ensayo de formación de redes capilares evidenció que el potencial angiogénico de las HUVEC se conserva de manera notable durante la mayor parte del cultivo. Aunque en el pase 18 los controles mostraron deterioro en la organización tubular y un aumento de células apoptóticas, las células tratadas con rapamicina conservaron en mayor medida la continuidad e integridad de las estructuras capilares (Figura 21). Este efecto protector frente al deterioro funcional avanzado es coherente con el retraso de la senescencia observado a nivel proliferativo y molecular.

La conservación en la identidad y función endoteliales observadas en este estudio contrasta con algunos trabajos previos, en los que se reporta el impacto del tratamiento con rapamicina en la inducción de EndMT, posiblemente a través del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF- β , del inglés *Transforming Growth Factor- β*) (348,366). Aunque la concentración de rapamicina utilizada en estos estudios es la misma que la empleada en el presente trabajo, existen diferencias en las condiciones experimentales, como la reducción del porcentaje de FBS en el medio de cultivo, así como un tiempo de tratamiento más prolongado, de 96 horas. Las implicaciones de estas variaciones sobre la EndMT no están del todo claras, especialmente considerando que, en uno de esos estudios no se observó un descenso en la expresión de VE-cadherina ni de PECAM-1 (366).

También se ha descrito un efecto protector de la rapamicina frente a EndMT (368), por lo que sería necesario profundizar en los mecanismos moleculares y el régimen de tratamiento para aclarar esta discrepancia.

En cuanto a la migración y angiogénesis, se ha reportado el impacto del tratamiento con rapamicina en la inhibición de ambos procesos (369), resultados que podrían estar mediados por la inhibición mTORC2. En el presente trabajo, el tratamiento con rapamicina parece potenciar la actividad de mTORC2, al menos frente a su diana AKT (Figura 8B). La inhibición parcial de mTORC1 y la ausencia de inhibición de mTORC2 observadas aquí podrían justificar, al menos en parte, esta discordancia (337,338).

6.1.5. Efecto del número de pases y del tratamiento con rapamicina sobre el equilibrio redox y el SASP

El análisis del equilibrio redox permitió caracterizar los cambios asociados a la senescencia replicativa en las células HUVEC y valorar el impacto de la rapamicina sobre este proceso. Como cabía esperar, las células control mostraron un incremento significativo de ERO en el pase 18, reflejando el establecimiento de un estado prooxidante característico de la senescencia

celular (370). En los pases 10 y 14 ya se aprecia una tendencia en la misma dirección (Figura 22A). Este aumento de ERO coincide temporalmente con la reducción de la capacidad proliferativa, la acumulación de marcadores de senescencia y la disrupción parcial de la barrera endotelial, lo que respalda su relevancia fisiopatológica en este modelo.

El tratamiento intermitente con rapamicina atenuó de manera significativa la acumulación de ERO en el pase 18, sugiriendo un efecto protector frente al estrés oxidativo en estadios avanzados del cultivo. Este hallazgo es coherente con estudios previos que describen la capacidad de la rapamicina para reducir el estrés oxidativo en diversos modelos celulares y animales (371). No obstante, la magnitud de esta reducción fue parcial, sin normalizar completamente los niveles de ERO respecto a los estadios tempranos (Figura 22A).

En paralelo, se observó un incremento progresivo en la producción de NO, significativo en los pases 14 y 18 de las células control. Este aumento podría representar un mecanismo compensatorio destinado a contrarrestar el estrés oxidativo y preservar la función endotelial, o bien reflejar la activación de vías proinflamatorias y prosenescentes vinculadas a la disfunción endotelial (320). El tratamiento con rapamicina redujo significativamente los niveles de NO en los pases 10, 14 y 18 (Figura 22B). Aunque este hallazgo podría interpretarse como una normalización de la sobreproducción de NO, interpretación reforzada por la ausencia de efecto del tratamiento sobre la ruta de eNOS en condiciones basales (Figura 8D), también plantea interrogantes sobre su posible repercusión funcional, dado que el NO desempeña un papel relevante en la homeostasis vascular (121).

El cociente ERO/NO, considerado un indicador más integrado del balance redox y del estrés oxidativo relativo, aumentó significativamente en ambos grupos en el pase 18. La ausencia de diferencias significativas en este cociente entre los grupos tratados y control sugiere que el efecto neto del tratamiento con rapamicina sobre el equilibrio redox relativo es limitado, y que la reducción en la producción de NO observada en los grupos tratados podría ser una respuesta fisiológica a la reducción en la producción de ERO, sin que la rapamicina altere dicho equilibrio (Figura 22C). Este hallazgo indica que la rapamicina no revierte completamente el cambio prooxidante asociado a la senescencia replicativa, y que otros mecanismos, como la alteración mitocondrial o el declive en los sistemas antioxidantes, pueden contribuir a este desequilibrio de manera independiente (30,83,142).

La reducción en la producción de ERO podría ser uno de los mecanismos clave en la eficacia del tratamiento con rapamicina, reduciendo el estrés replicativo y preservando la capacidad proliferativa y funcionalidad endotelial (372). La aparente ausencia de efectos sobre la autofagia refuerza la relevancia potencial de este mecanismo.

El conjunto de resultados obtenidos sobre moléculas de adhesión y citocinas proinflamatorias permite caracterizar con mayor detalle la evolución del fenotipo proinflamatorio asociado a la senescencia replicativa en HUVEC y valorar la capacidad de la rapamicina para modularla.

La expresión de ICAM-1 mostró un aumento progresivo dependiente del pase de cultivo, con incrementos significativos tanto a nivel proteico como de ARNm en los estadios avanzados (pases 14 y 18). Este patrón es consistente con la consolidación de un fenotipo senescente asociado a una mayor capacidad de adhesión leucocitaria y a un microambiente proinflamatorio

crónico (137). La rapamicina atenuó significativamente la sobreexpresión de ICAM-1 en estos pases. En cambio, VCAM-1 no mostró cambios relevantes en ninguna condición (Figura 23), confirmando su escasa implicación en este modelo (65,141), si bien algunos estudios previos describen un aumento de la expresión durante la senescencia replicativa de células HUVEC (373).

La reducción en la expresión de ICAM-1 en los cultivos tratados con rapamicina podría estar directamente relacionada con la menor acumulación de células senescentes en estos grupos, tal y como se ha observado en experimentos previos (SA- β -Gal, p16^{INK4a}, Figura 14 y Figura 15) (65). Por lo tanto, la rapamicina podría mitigar indirectamente el estado proinflamatorio asociado al envejecimiento del endotelio al reducir el número de células senescentes, que son las principales productoras de ICAM-1. La magnitud de este resultado adquiere mayor relevancia si se tiene en cuenta que, en el pase 18, los grupos tratados con rapamicina contaban con 5 PD más en términos promedio (Figura 11).

Por su parte, el análisis de los niveles de ARNm de IL-6 e IL-8 mostró una tendencia ascendente a lo largo de los cultivos, especialmente en el caso de IL-8, si bien esta no alcanzó significación estadística. La variabilidad elevada entre líneas celulares, coherente con la heterogeneidad detectada en otros parámetros (p. ej., p16^{INK4a}), pudo contribuir a enmascarar diferencias subyacentes. En cualquier caso, el tratamiento con rapamicina no indujo cambios significativos en la expresión de estas citocinas a nivel transcripcional, posiblemente porque el régimen de tratamiento intermitente no mantiene el efecto antiinflamatorio agudo de la rapamicina (374).

La evaluación de citocinas secretadas en el MC mediante *arrays* confirmó que la senescencia replicativa está asociada a un SASP bien definido, caracterizado por el incremento de citocinas y quimiocinas (GRO α , GRO β , GRO γ), IL-6 y MCP-3, y una tendencia al aumento en IL-8 (Figura 25). Este perfil es consistente con el papel de estas moléculas en la atracción de células inmunes y la amplificación de la inflamación estéril asociada a la senescencia vascular (142,373).

La rapamicina mostró un efecto modulador complejo sobre este secretoma. Por un lado, redujo la secreción de MCP-3 en el pase 18, un hallazgo coherente con su efecto antisenescente parcial. Por otro lado, reforzó el incremento de la secreción de GRO α,β,γ , IL-6 e IL-8 observado en el pase 18, e indujo la expresión de MCP-1, que no se encontraba aumentada en el control en ese mismo pase. Este patrón refuerza la idea de que el régimen de tratamiento empleado de rapamicina no ejerce un efecto supresor uniforme de la inflamación, sino que reprograma selectivamente su composición, con posibles implicaciones funcionales aún no del todo conocidas (375). Cabe destacar de nuevo que los cultivos tratados se situaron 5 PD por encima de los controles. Además, las diferencias en la proliferación observadas en el pase 18 (Figura 12) y los contajes rutinarios durante el cultivo, indican un mayor número de células en el grupo tratado, lo que impacta directamente en la concentración de moléculas secretadas al medio.

Los resultados obtenidos de los marcadores de estrés oxidativo e inflamación indican que el tratamiento intermitente con rapamicina atenúa algunos componentes proinflamatorios asociados al SASP endotelial, como ICAM-1 y MCP-3, pero simultáneamente potencia la liberación de otras citocinas y quimiocinas como IL-8 y MCP-1. Esta modulación selectiva y no uniforme del SASP sugiere que el impacto de la rapamicina sobre la inflamación endotelial,

con el régimen de tratamiento intermitente, es complejo y probablemente contexto-dependiente, por lo que su interpretación debe ser prudente. Sería necesario realizar estudios adicionales que clarifiquen si este perfil secretor reprogramado tiene efectos beneficiosos o potencialmente adversos sobre el entorno vascular y la respuesta inmunitaria en situaciones fisiológicas y patológicas.

Aunque la rapamicina tiene efectos antiinflamatorios consistentes, y su papel como senomorfo está bien establecido (67,166,374), es importante señalar que, en el presente trabajo, no se evaluó su efecto agudo. En todos los pases ensayados, los experimentos se llevaron a cabo al menos 48 horas tras la retirada del tratamiento, un intervalo suficiente para que desaparezcan los efectos directos del fármaco. Por tanto, las diferencias observadas se atribuyen a una menor acumulación de células senescentes o a reprogramaciones persistentes inducidas durante la exposición, más que a efectos inmediatos de la rapamicina. Esto explica la diferencia con otros estudios, donde la reducción del perfil de SASP inducida por rapamicina fue consistente y homogénea (348).

6.1.6. Efectos del SASP de HUVEC sobre monocitos THP-1

El estudio del impacto funcional del secretoma de las células HUVEC senescentes sobre monocitos THP-1 permitió explorar la dimensión paracrina del SASP y evaluar si las diferencias observadas con el tratamiento modifican la influencia del secretoma sobre la activación y la respuesta funcional de los monocitos (Figura 25). La línea monocítica THP-1 es ampliamente utilizada en estudios sobre inflamación e interacción entre endotelio y el sistema inmunitario (322, 376), y los monocitos cumplen un papel clave en la aterosclerosis y las patologías cardiovasculares (125).

Los niveles intracelulares de ERO en los monocitos no se modificaron de forma significativa tras la exposición al MC de HUVEC, independientemente del pase de cultivo o del tratamiento previo con rapamicina (Figura 26). Esta ausencia de un efecto prooxidante directo sugiere que, pese a la presencia de citocinas y quimiocinas proinflamatorias en el SASP, su combinación en este modelo *in vitro* no resulta suficiente para inducir un estrés oxidativo medible en las células THP-1. Este hallazgo es coherente con la naturaleza heterogénea y contexto-dependiente del SASP descrita en otros estudios (59).

En contraste, la exposición al MC de HUVEC senescentes sí indujo la activación de vías de señalización proinflamatorias en los monocitos. Específicamente, se observó un incremento significativo en la fosforilación de STAT3 en Tyr705 al tratar los monocitos THP-1 con MC de pase 14 y 18, un efecto que refleja activación de receptores de citocinas y transducción de señales inflamatorias (Figura 27A) (376).

El tratamiento con rapamicina de las HUVEC donantes, en el pase 14, redujo de forma significativa esta fosforilación de STAT3 en los monocitos, y mostró una tendencia de atenuación en el pase 18, lo que refuerza la hipótesis de un efecto modulador parcial del SASP. El mayor PDL observado en el grupo tratado en el pase 18 con respecto al control podría condicionar estos resultados, si bien esta diferencia en el PDL no es relevante en otros marcadores ensayados (Figura 12, Figura 14, Figura 15, Figura 17, Figura 21, Figura 22, Figura 23).

A nivel de moléculas de adhesión, el medio procedente de pase 18 de HUVEC senescentes indujo un aumento de los niveles proteicos de ICAM-1 en los monocitos, reforzando la idea de que el SASP contribuye a un fenotipo proinflamatorio y potencialmente proadhesivo en las células inmunes circulantes (322,323). Sin embargo, a diferencia de su efecto sobre la expresión de ICAM-1 en las propias HUVEC, la rapamicina no redujo de manera significativa la inducción de ICAM-1 en los monocitos (Figura 27B,D), aunque sí mostró una tendencia a la disminución en el pase 14.

En los monocitos, la cinética de la expresión de ICAM-1 es consistente con la fosforilación de STAT3 y la modulación parcial del SASP de células HUVEC observada en el panel de citocinas (Figura 25). Sin embargo, al igual que en la caracterización del MC mediante *array*, las PD adicionales del grupo tratado, y su mayor proliferación con respecto a los controles, dificultan la interpretación de estos resultados.

En cuanto a VCAM-1, no se detectó expresión a nivel proteico en los monocitos y su expresión de ARNm mostró únicamente una tendencia al alza al ser expuestas al MC procedente de HUVEC en el pase 18, sin influencia aparente de la rapamicina (Figura 27C). La falta de detección de VCAM-1 proteico es coherente con su baja expresión a nivel de ARNm, y junto a la ausencia de la inducción en la producción de ERO, sugiere una activación parcial de los monocitos por el MC.

Estos resultados indican que el SASP de las HUVEC senescentes ejerce efectos paracrinos sobre los monocitos THP-1, induciendo una activación de STAT3 y un incremento de ICAM-1, dos características de un fenotipo proinflamatorio (323,376). La exposición crónica intermitente de las HUVEC a rapamicina atenúa parcialmente esta activación, especialmente en lo relativo a STAT3, pero no elimina de forma completa la capacidad proinflamatoria del secretoma. Esta modulación selectiva es coherente con los datos previos de este trabajo, que muestran que el tratamiento intermitente con rapamicina no suprime globalmente el SASP, sino que reprograma su composición de forma heterogénea.

En conjunto, estos hallazgos ponen de manifiesto que el tratamiento intermitente con rapamicina retrasa la entrada en senescencia y atenúa ciertos marcadores inflamatorios de células HUVEC, aumentando la duración de los cultivos y preservando la identidad celular y funciones endoteliales clave.

Sin embargo, el efecto del tratamiento sobre el microambiente secretor es complejo y puede mantener, o incluso potenciar, componentes con capacidad de activar células inmunes. Este aspecto tiene implicaciones relevantes, ya que la preservación parcial del fenotipo proinflamatorio podría contribuir a efectos impredecibles en contextos tisulares más complejos.

Son necesarios estudios que caractericen en mayor profundidad el perfil del SASP y sus efectos paracrinos, con el fin de definir con mayor precisión el potencial terapéutico del tratamiento intermitente con rapamicina frente a la senescencia endotelial, y su potencial papel en las enfermedades cardiovasculares asociadas a la edad.

6.2. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

A continuación, se describen las principales limitaciones del estudio que pueden influir en la interpretación de los hallazgos:

- **Monocultivos estáticos:** El uso exclusivo de cultivos primarios de HUVEC limita la extrapolación directa a tejidos endoteliales *in vivo*, donde las interacciones con otras células y factores hemodinámicos pueden modular la senescencia y la respuesta a la rapamicina.
- **Variabilidad interindividual:** La heterogeneidad entre líneas celulares de donantes diferentes introduce variabilidad en parámetros clave (por ejemplo, la inducción de p16^{INK4a} o la expresión de citocinas) que, aunque relevante desde el punto de vista biológico, puede enmascarar ciertos efectos y reducir la potencia estadística. Además, la variabilidad entre líneas es representativa pero limitada.
- **Selección de dosis y esquema de tratamiento:** Aunque se empleó una concentración de rapamicina moderada y una pauta intermitente, no se evaluaron comparativamente otros regímenes de dosis, duración o frecuencia, que podrían inducir efectos diferenciados sobre la senescencia y el SASP.
- **Análisis parcial del SASP:** La caracterización del secretoma se basó en un panel limitado de citocinas y quimiocinas, por lo que el impacto del tratamiento en otros componentes del SASP está por determinar.
- **Limitaciones funcionales del modelo paracrino:** El uso de monocitos THP-1 como única célula diana del SASP aporta una visión parcial del impacto paracrino, sin contemplar otros tipos celulares potencialmente relevantes, como células endoteliales adyacentes, células musculares lisas o linfocitos.

6.3. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para avanzar en el conocimiento del potencial terapéutico de la rapamicina frente a la senescencia endotelial y sus implicaciones funcionales, futuros estudios deberían contemplar:

- Validación en modelos *in vitro* más complejos de senescencia vascular y disfunción endotelial, como sistemas microfluídicos y cocultivos que reproduzcan condiciones de flujo, interacciones célula-célula y gradientes de nutrientes, con el fin de aproximar mejor la fisiología vascular real y superar las limitaciones de los modelos convencionales en monocapa.
- Exploración de otras pautas posológicas, incluyendo otras dosis, tratamientos pulsátiles o combinaciones con otras intervenciones geroprotectoras, que permitan optimizar el equilibrio entre eficacia antisenescente y preservación de funciones críticas del endotelio.

- Caracterización ampliada del SASP, incorporando técnicas de proteómica no dirigida, metabolómica y análisis detallado de vesículas extracelulares, para clarificar cómo se reprograma el secretoma bajo el efecto de la rapamicina y qué componentes mantienen un potencial proinflamatorio residual.
- Evaluación funcional más amplia del impacto paracrino, mediante cocultivos con otros tipos celulares primarios relevantes (células musculares lisas, fibroblastos vasculares, células inmunes primarias) que permitan valorar de forma más completa las consecuencias del SASP y su modulación farmacológica.
- Estudio en profundidad de los mecanismos moleculares implicados, incluyendo la regulación epigenética, la dinámica proteostática y la interacción con rutas metabólicas clave, para identificar dianas adicionales que puedan modularse de manera sinérgica con la inhibición de mTOR.

7- CONCLUSIONES

7. Conclusiones

Los resultados de este estudio demuestran que el tratamiento intermitente con rapamicina ejerce un efecto modulador amplio sobre la senescencia replicativa de células HUVEC.

El tratamiento semanal puntual inhibe parcialmente la ruta de mTORC1 durante el tiempo de tratamiento, y aumenta la actividad de mTORC2 y ERK1/2. Los cambios en estas vías son transitorios, y revierten tras la retirada del tratamiento. No se observan cambios en eNOS ni en marcadores de autofagia.

La rapamicina retrasa de manera significativa la entrada en senescencia replicativa, preserva la capacidad proliferativa en fases avanzadas del cultivo y atenúa parcialmente la acumulación de marcadores de senescencia, como p16^{INK4a} y SA-β-Gal. Además, el tratamiento mantiene la identidad fenotípica endotelial, la integridad de las uniones intercelulares y el potencial angiogénico, sin comprometer funciones clave como la migración.

A nivel de equilibrio redox, la rapamicina reduce la acumulación de ERO y la producción excesiva de NO en fases avanzadas, aunque sin restaurar por completo el balance oxidativo. De manera paralela, atenúa selectivamente componentes del SASP, como MCP-3, mientras que mantiene o incluso potencia la secreción de otras citocinas como GROα, IL-8 y MCP-1. Estos efectos sobre el secretoma se traducen en una capacidad reducida, pero no abolida, para inducir un fenotipo proinflamatorio en monocitos THP-1.

En conjunto, estos hallazgos refuerzan el potencial del tratamiento intermitente con rapamicina como una intervención antisenescente capaz de prolongar la longevidad replicativa y preservar funciones endoteliales esenciales. Sin embargo, la modulación del SASP que produce es incompleta y heterogénea, lo que requiere una caracterización más detallada, y plantea limitaciones para su posible aplicación en la prevención de enfermedades cardiovasculares asociadas al envejecimiento.

8- BIBLIOGRAFÍA

8. Bibliografía

1. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World Population Prospects 2024 [Internet]. New York: United Nations; 2024 [citado el 18 de mayo de 2025]. Disponible en: <https://population.un.org/wpp/>
2. Dattani S, Rodés-Guirao L, Ritchie H, Ortiz-Ospina E, Roser M. Life Expectancy [Internet]. Our World in Data; 2023 [citado el 2 de abril de 2025]. Disponible en: <https://ourworldindata.org/life-expectancy>
3. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World Population Ageing 2020 Highlights. New York: United Nations; 2020.
4. World Health Organization. Ageing and health [Internet]. 2022 [citado el 2 de abril de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>
5. Organisation for Economic Co-operation and Development. Health at a Glance: Europe 2024 [Internet]. Paris: OECD Publishing; 2024 [citado el 18 de mayo de 2025]. Disponible en: https://www.oecd.org/en/publications/health-at-a-glance-europe-2024_b3704e14-en.html
6. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World Population Ageing 2023. New York: United Nations; 2023. Report No.: ST/ESA/SER.A/464.
7. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global, regional, and national burden of diseases and injuries for adults 70 years and older: systematic analysis for the Global Burden of Disease 2019 Study. *BMJ*. 2022;379:e072088.
8. GBD 2021 Causes of Death Collaborators. Global burden of 288 causes of death and life expectancy decomposition in 204 countries and territories and 811 subnational locations, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet*. 2024;403(10440):2100–32.
9. Spence M, Leipziger D. Globalization and Growth: Implications for a Post-Crisis World. World Bank Publications; 2010. 384 p.
10. Yang Y, Zheng R, Zhao L. Population Aging, Health Investment and Economic Growth: Based on a Cross-Country Panel Data Analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(4):1801.
11. Goldman D. The Economic Promise of Delayed Aging. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(2):a025072.
12. Feng Z, Glinkaya E, Chen H, Gong S, Qiu Y, Xu J, et al. Long-term care system for older adults in China: policy landscape, challenges, and future prospects. *The Lancet*. 2020;396(10259):1362–72.

13. The Lancet Regional Health - Europe. Securing the future of Europe's ageing population by 2050. *Lancet Reg Health Eur.* 2023;35:100778.
14. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. *World Population Ageing 2019: Highlights.* New York: United Nations; 2019.
15. Rolland Y, Sierra F, Ferrucci L, Barzilai N, De Cabo R, Mannick J, et al. Challenges in developing Geroscience trials. *Nat Commun.* 2023;14:5038.
16. Kirkwood TBL. Understanding the odd science of aging. *Cell.* 2005;120(4):437–47.
17. World Health Organization. Healthy ageing and functional ability [Internet]. [citado el 2 de abril de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/healthy-ageing-and-functional-ability>
18. Mathur A, Taurin S, Alshammary S. New insights into methods to measure biological age: a literature review. *Front Aging.* 2024;5:1395649.
19. Noto S. Perspectives on Aging and Quality of Life. *Healthcare.* 2023;11(15):2131.
20. Kenyon C. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell.* 2005;120(4):449–60.
21. Candore G, Balistreri CR, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, Lio D, Listi' F, et al. Immunosenescence and anti-immunosenescence therapies: the case of probiotics. *Rejuvenation Res.* 2008;11(2):425–32.
22. Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* 1972;20(4):145–7.
23. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 1996;273(5271):59–63.
24. Vijg J, Suh Y. Genome instability and aging. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:645–68.
25. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell.* 2013;153(6):1194–217.
26. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell.* 2023;186(2):243–78.
27. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.

28. Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med.* 2015;21(12):1424–35.
29. van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature.* 2014;509(7501):439–46.
30. Sun N, Youle RJ, Finkel T. The Mitochondrial Basis of Aging. *Mol Cell.* 2016;61(5):654–66.
31. Bratic A, Larsson NG. The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest.* 2013;123(3):951–7.
32. Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, et al. Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell.* 2014;159(4):709–13.
33. Moskalev A, Gumatova Z, Lopes IDA, Beckett CW, Kennedy BK, Magalhaes JPD, et al. Targeting aging mechanisms: pharmacological perspectives. *Trends Endocrinol Metab.* 2022;33(4):266–80.
34. Weindruch R. The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates. *Toxicol Pathol.* 1996;24(6):742–5.
35. Reimers CD, Knapp G, Reimers AK. Does Physical Activity Increase Life Expectancy? A Review of the Literature. *J Aging Res.* 2012:243958.
36. Englund DA, Sakamoto AE, Fritsche CM, Heeren AA, Zhang X, Kotajarvi BR, et al. Exercise reduces circulating biomarkers of cellular senescence in humans. *Aging Cell.* 2021;20(7):e13415.
37. Zhang X, Englund DA, Aversa Z, Jachim SK, White TA, LeBrasseur NK. Exercise Counters the Age-Related Accumulation of Senescent Cells. *Exerc Sport Sci Rev.* 2022;50(4):213–21.
38. Geng L, Ping J, Wu R, Yan H, Zhang H, Zhuang Y, et al. Systematic profiling reveals betaine as an exercise mimetic for geroprotection. *Cell.* 2025;S0092-8674(25)00635-X.
39. Kulkarni AS, Gubbi S, Barzilai N. Benefits of Metformin in Attenuating the Hallmarks of Aging. *Cell Metab.* 2020;32(1):15–30.
40. Barzilai N, Crandall JP, Kritchevsky SB, Espeland MA. Metformin as a Tool to Target Aging. *Cell Metab.* 2016;23(6):1060–5.
41. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature.* 2009;460(7253):392–5.

42. Miller RA, Harrison DE, Astle CM, Baur JA, Boyd AR, de Cabo R, et al. Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2011;66(2):191–201.
43. Mannick JB, Del Giudice G, Lattanzi M, Valiante NM, Praestgaard J, Huang B, et al. mTOR inhibition improves immune function in the elderly. *Sci Transl Med*. 2014;6(268):268ra179.
44. Larsen PD. Geroscience: The Intersection of Basic Aging Biology, Chronic Disease, and Health. *Rehabil Nurs Off J Assoc Rehabil Nurses*. 2019;44(4):187–8.
45. Gladyshev VN. The ground zero of organismal life and aging. *Trends Mol Med*. 2021;27(1):11–9.
46. Gems D, de Magalhães JP. The hoverfly and the wasp: A critique of the hallmarks of aging as a paradigm. *Ageing Res Rev*. 2021;70:101407.
47. Blagosklonny MV. Hallmarks of cancer and hallmarks of aging. *Aging*. 2022;14(9):4176–87.
48. Schmauck-Medina T, Molière A, Lautrup S, Zhang J, Chlopicki S, Madsen HB, et al. New hallmarks of ageing: a 2022 Copenhagen ageing meeting summary. *Aging*. 2022;14(16):6829–39.
49. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:685–705.
50. Birch J, Gil J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev*. 2020;34(23–24):1565–76.
51. Hayflick L. The limited In Vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1964;37:614–36.
52. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25(3):585–621.
53. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*. 2019;179(4):813–27.
54. Wiley CD, Campisi J. The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention. *Nat Metab*. 2021;3(10):1290–301.
55. 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. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(20):9363–7.

56. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci.* 2000;113(20):3613–22.
57. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell.* 2006;5(2):187–95.
58. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol.* 2013;15(8):978–90.
59. Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLOS Biol.* 2008;6(12):e301.
60. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2010;5(1):99–118.
61. Gal H, Majewska J, Krizhanovsky V. The intricate nature of senescence in development and cell plasticity. *Semin Cancer Biol.* 2022;87:214–9.
62. Ritschka B, Storer M, Mas A, Heinzmann F, Ortells MC, Morton JP, et al. The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev.* 2017;31(2):172–83.
63. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(7):482–96.
64. 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 Biol.* 2020;18(1):e3000599.
65. Foreman KE, Tang J. Molecular mechanisms of replicative senescence in endothelial cells. *Exp Gerontol.* 2003;38(11):1251–7.
66. Ding YN, Wang HY, Chen HZ, Liu DP. Targeting senescent cells for vascular aging and related diseases. *J Mol Cell Cardiol.* 2022;162:43–52.
67. Zhang L, Pitcher LE, Prahalad V, Niedernhofer LJ, Robbins PD. Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics. *FEBS J.* 2023;290(5):1362–83.
68. Olovnikov AM. [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 1971;201(6):1496–9.

69. Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol.* 1973;41(1):181–90.
70. Blackburn EH, Greider CW, Henderson E, Lee MS, Shampay J, Shippen-Lentz D. Recognition and elongation of telomeres by telomerase. *Genome.* 1989;31(2):553–60.
71. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990;345(6274):458–60.
72. Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol.* 1992;27(4):375–82.
73. Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC. γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia.* 2010;24(4):679–86.
74. Bartek J, Bartkova J, Lukas J. DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene.* 2007;26(56):7773–9.
75. Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(4):197–210.
76. Chen J, Huang X, Halicka D, Brodsky S, Avram A, Eskander J, et al. Contribution of p16INK4a and p21CIP1 pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2006;290(4):H1575–86.
77. England K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ.* 2022;29(5):946–60.
78. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, et al. Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature.* 2016;530(7589):184–9.
79. Priour A, Besnard E, Babled A, Lemaitre JM. p53 and p16INK4A independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression. *Nat Commun.* 2011;2(1):473.
80. Herbig U, Jobling WA, Chen BPC, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, p53, and p21CIP1, but Not p16INK4a. *Mol Cell.* 2004;14(4):501–13.
81. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 1997;88(5):593–602.
82. Hemagirri M, Sasidharan S. Biology of aging: Oxidative stress and RNA oxidation. *Mol Biol Rep.* 2022;49(6):5089–105.

83. Hajam YA, Rani R, Ganie SY, Sheikh TA, Javaid D, Qadri SS, et al. Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. *Cells*. 2022;11(3):552.
84. Barnes RP, de Rosa M, Thosar SA, Detwiler AC, Roginskaya V, Van Houten B, et al. Telomeric 8-oxo-guanine drives rapid premature senescence in the absence of telomere shortening. *Nat Struct Mol Biol*. 2022;29(7):639–52.
85. Cicconi A, Chang S. Shelterin and the replisome: at the intersection of telomere repair and replication. *Curr Opin Genet Dev*. 2020;60:77–84.
86. Nouis L, Kanavaros P, Barbouti A. Oxidative Stress-Induced Cellular Senescence: Is Labile Iron the Connecting Link? *Antioxidants*. 2023;12(6):1250.
87. Terman A, Brunk UT. Oxidative stress, accumulation of biological “garbage”, and aging. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(1–2):197–204.
88. Dumont P, Burton M, Chen QM, Gonos ES, Frippiat C, Mazarati JB, et al. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(3):361–73.
89. Ya J, Bayraktutan U. Senolytics and Senomorphics Targeting p38MAPK/NF-κB Pathway Protect Endothelial Cells from Oxidative Stress-Mediated Premature Senescence. *Cells*. 2024;13(15):1292.
90. Kumar A, Thirumurugan K. Understanding cellular senescence: pathways involved, therapeutics and longevity aiding. *Cell Cycle*. 22(20):2324–45.
91. Lopes-Paciencia S, Saint-Germain E, Rowell MC, Ruiz AF, Kalegari P, Ferbeyre G. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine*. 2019;117:15–22.
92. Zhu H, Blake S, Kusuma FK, Pearson RB, Kang J, Chan KT. Oncogene-induced senescence: From biology to therapy. *Mech Ageing Dev*. 2020;187:111229.
93. Carvalho C, L’Hôte V, Courbeyrette R, Kratassiouk G, Pinna G, Cintrat JC, et al. Glucocorticoids delay RAF-induced senescence promoted by EGR1. *J Cell Sci*. 2019;132(16):jcs230748.
94. Takasugi M, Yoshida Y, Hara E, Ohtani N. The role of cellular senescence and SASP in tumour microenvironment. *FEBS J*. 2023;290(5):1348–61.
95. Rodriguez JE, Naigeon M, Goldschmidt V, Roulleaux Dugage M, Seknazi L, Danlos FX, et al. Immunosenescence, inflammaging, and cancer immunotherapy efficacy. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2022;22(9):915–26.
96. Pawelec G. Immunosenescence and cancer. *Biogerontology*. 2017;18(4):717–21.

97. Chakradeo S, Elmore LW, Gewirtz DA. Is Senescence Reversible? *Curr Drug Targets*. 17(4):460–6.
98. Evangelou K, Belogiannis K, Papaspyropoulos A, Petty R, Gorgoulis VG. Escape from senescence: molecular basis and therapeutic ramifications. *J Pathol*. 2023;260(5):649–65.
99. Zampetidis CP, Papantonis A, Gorgoulis VG. Escape from senescence: revisiting cancer therapeutic strategies. *Mol Cell Oncol*. 9(1):2030158.
100. Li X, Ma L. From biological aging to functional decline: Insights into chronic inflammation and intrinsic capacity. *Ageing Res Rev*. 2024;93:102175.
101. Ren JL, Pan JS, Lu YP, Sun P, Han J. Inflammatory Signaling and Cellular Senescence. *Cell Signal*. 2009;21(3):378–83.
102. Pezone A, Olivieri F, Napoli MV, Procopio A, Avvedimento EV, Gabrielli A. Inflammation and DNA damage: cause, effect or both. *Nat Rev Rheumatol*. 2023;19(4):200–11.
103. Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Signal*. 2012;24(4):835–45.
104. Bkaily G, Jacques D. Morphological and Functional Remodeling of Vascular Endothelium in Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3):1998.
105. Khaddaj Mallat R, Mathew John C, Kendrick DJ, Braun AP. The vascular endothelium: A regulator of arterial tone and interface for the immune system. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2017;54(7–8):458–70.
106. Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016;248:97–109.
107. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*. 2006;147(Suppl 1):S193-201.
108. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*. 2007;100(2):158–73.
109. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(10):803–15.
110. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317–25.
111. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005;438(7070):932–6.

112. Hahn C, Schwartz MA. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(1):53–62.
113. Gimbrone MA, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):620–36.
114. Bloom SI, Liu Y, Tucker JR, Islam MT, Machin DR, Abdeahad H, et al. Endothelial cell telomere dysfunction induces senescence and results in vascular and metabolic impairments. *Aging Cell.* 2023;22(8):e13875.
115. Dominic A, Banerjee P, Hamilton DJ, Le NT, Abe J ichi. Time-dependent replicative senescence vs. disturbed flow-induced pre-mature aging in atherosclerosis. *Redox Biol.* 2020;37:101614.
116. Warboys CM, de Luca A, Amini N, Luong L, Duckles H, Hsiao S, et al. Disturbed Flow Promotes Endothelial Senescence via a p53-Dependent Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(5):985–95.
117. Rossman MJ, Kaplon RE, Hill SD, McNamara MN, Santos-Parker JR, Pierce GL, et al. Endothelial cell senescence with aging in healthy humans: prevention by habitual exercise and relation to vascular endothelial function. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* 2017;313(5):H890–5.
118. Hayashi T, Yano K, Matsui-Hirai H, Yokoo H, Hattori Y, Iguchi A. Nitric oxide and endothelial cellular senescence. *Pharmacol Ther.* 2008;120(3):333–9.
119. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829–37.
120. Janaszak-Jasiecka A, Płoska A, Wierońska JM, Dobrucki LW, Kalinowski L. Endothelial dysfunction due to eNOS uncoupling: molecular mechanisms as potential therapeutic targets. *Cell Mol Biol Lett.* 2023;28(1):21.
121. Hernandez-Navarro I, Botana L, Diez-Mata J, Tesoro L, Jimenez-Guirado B, Gonzalez-Cucharero C, et al. Replicative Endothelial Cell Senescence May Lead to Endothelial Dysfunction by Increasing the BH2/BH4 Ratio Induced by Oxidative Stress, Reducing BH4 Availability, and Decreasing the Expression of eNOS. *Int J Mol Sci.* 2024;25(18):9890.
122. Yu H, Liao K, Hu Y, Lv D, Luo M, Liu Q, et al. Role of the cGAS-STING Pathway in Aging-related Endothelial Dysfunction. *Aging Dis.* 2022;13(6):1901–18.
123. Phoenix A, Chandran R, Ergul A. Cerebral Microvascular Senescence and Inflammation in Diabetes. *Front Physiol.* 2022;13:864758.
124. Berk BC, Abe JI, Min W, Surapisitchat J, Yan C. Endothelial Atheroprotective and Anti-inflammatory Mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;947(1):93–111.

125. Picos A, Seoane N, Campos-Toimil M, Viña D. Vascular senescence and aging: mechanisms, clinical implications, and therapeutic prospects. *Biogerontology*. 2025;26(3):118.
126. Sawabe M. Vascular aging: From molecular mechanism to clinical significance. *Geriatr Gerontol Int*. 2010;10(s1):S213–20.
127. Herbstein F, Sapochnik M, Attorresi A, Pollak C, Senin S, Gonilski-Pacin D, et al. The SASP factor IL-6 sustains cell-autonomous senescent cells via a cGAS-STING-NFκB intracrine senescent noncanonical pathway. *Aging Cell*. 2024;23(10):e14258.
128. Bochenek ML, Schütz E, Schäfer K. Endothelial cell senescence and thrombosis: Ageing clots. *Thromb Res*. 2016;147:36–45.
129. Davizon-Castillo P, McMahon B, Aguila S, Bark D, Ashworth K, Allawzi A, et al. TNF- α -driven inflammation and mitochondrial dysfunction define the platelet hyperreactivity of aging. *Blood*. 2019;134(9):727–40.
130. Krouwer VJD, Hekking LHP, Langelaar-Makkinje M, Regan-Klapisz E, Post JA. Endothelial cell senescence is associated with disrupted cell-cell junctions and increased monolayer permeability. *Vasc Cell*. 2012;4(1):12.
131. Yamazaki Y, Baker DJ, Tachibana M, Liu CC, van Deursen JM, Brott TG, et al. Vascular Cell Senescence Contributes To Blood-Brain Barrier Breakdown. *Stroke J Cereb Circ*. 2016;47(4):1068–77.
132. Knopp RC, Erickson MA, Rhea EM, Reed MJ, Banks WA. Cellular senescence and the blood-brain barrier: Implications for aging and age-related diseases. *Exp Biol Med Maywood NJ*. 2023;248(5):399–411.
133. Real MGC, Falcione SR, Boghozian R, Clarke M, Todoran R, St Pierre A, et al. Endothelial Cell Senescence Effect on the Blood-Brain Barrier in Stroke and Cognitive Impairment. *Neurology*. 2024;103(11):e210063.
134. Ungvari Z, Tarantini S, Kiss T, Wren JD, Giles CB, Griffin CT, et al. Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(9):555–65.
135. Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, Levy AS, Pierce GL, Gates PE, et al. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res*. 2007;100(11):1659–66.
136. van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, et al. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med*. 2000;192(12):1731–44.

137. 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;354(6311):472–7.
138. Childs BG, Li H, van Deursen JM. Senescent cells: a therapeutic target for cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 2018;128(4):1217–28.
139. Kirkland JL, Tchkonina T. Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine*. 2017;21:21.
140. Wang M, Monticone RE, Lakatta EG. Arterial aging: a journey into subclinical arterial disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010;19(2):201–7.
141. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial Cell Senescence in Human Atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(13):1541–4.
142. Giuliani A, Giudetti AM, Vergara D, Del Coco L, Ramini D, Caccese S, et al. Senescent Endothelial Cells Sustain Their Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) through Enhanced Fatty Acid Oxidation. *Antioxid Basel Switz*. 2023;12(11):1956.
143. Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med*. 2010;16(5):238–46.
144. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014;69 Suppl 1:S4–9.
145. Roos CM, Zhang B, Palmer AK, Ogrodnik MB, Pirtskhalava T, Thalji NM, et al. Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell*. 2016;15(5):973–7.
146. Davies PF. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2009;6(1):16–26.
147. Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, Laberge RM, Marquess D, Dananberg J, et al. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(10):718–35.
148. Tchkonina T, Zhu Y, Deursen J van, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest*. 2013;123(3):966–72.
149. Zhu Y, Tchkonina T, Fuhrmann-Stroissnigg H, Dai HM, Ling YY, Stout MB, et al. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell*. 2016;15(3):428–35.
150. Nieto M, Konigsberg M, Silva-Palacios A. Quercetin and dasatinib, two powerful senolytics in age-related cardiovascular disease. *Biogerontology*. 2024;25(1):71–82.

151. Hickson LJ, Prata LGPL, Bobart SA, Evans TK, Giorgadze N, Hashmi SK, et al. Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *eBioMedicine*. 2019;47:446–56.
152. Tkemaladze J. Cross-senolytic effects of dasatinib and quercetin in humans. *Georgian Sci*. 2023;5(3):138–52.
153. Corcoran RB, Do KT, Kim JE, Cleary JM, Parikh AR, Yeku OO, et al. Phase I/II Study of Combined BCL-xL and MEK Inhibition with Navitoclax and Trametinib in KRAS or NRAS Mutant Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2024;30(9):1739–49.
154. Harrison CN, Garcia JS, Somervaille TCP, Foran JM, Verstovsek S, Jamieson C, et al. Addition of Navitoclax to Ongoing Ruxolitinib Therapy for Patients With Myelofibrosis With Progression or Suboptimal Response: Phase II Safety and Efficacy. *J Clin Oncol*. 2022;40(15):1671–80.
155. González-Gualda E, Pàez-Ribes M, Lozano-Torres B, Macias D, Wilson JR, González-López C, et al. Galacto-conjugation of Navitoclax as an efficient strategy to increase senolytic specificity and reduce platelet toxicity. *Aging Cell*. 2020;19(4):e13142.
156. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, et al. An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Dev Cell*. 2014;31(6):722–33.
157. de Magalhães JP. Cellular senescence in normal physiology. *Science*. 2024;384(6702):1300–1.
158. He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. *Cell*. 2017;169(6):1000–11.
159. Wilkinson JE, Burmeister L, Brooks SV, Chan CC, Friedline S, Harrison DE, et al. Rapamycin slows aging in mice. *Aging Cell*. 2012;11(4):675–82.
160. Bitto A, Ito TK, Pineda VV, LeTexier NJ, Huang HZ, Sutlief E, et al. Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice. *eLife*. 2016;5:e16351.
161. Moiseeva O, Deschênes-Simard X, St-Germain E, Igelmann S, Huot G, Cadar AE, et al. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. *Aging Cell*. 2013;12(3):489–98.
162. Chen S, Gan D, Lin S, Zhong Y, Chen M, Zou X, et al. Metformin in aging and aging-related diseases: clinical applications and relevant mechanisms. *Theranostics*. 2022;12(6):2722–40.

163. Xu M, Tchkonina T, Ding H, Ogrodnik M, Lubbers ER, Pirtskhalava T, et al. JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(46):E6301–10.
164. Xu M, Tchkonina T, Kirkland JL. Perspective: Targeting the JAK/STAT pathway to fight age-related dysfunction. *Pharmacol Res*. 2016;111:152–4.
165. Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*. 1975;28(10):721–6.
166. Martel RR, Klicius J, Galet S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol*. 1977;55(1):48–51.
167. Eng CP, Sehgal SN, Vézina C. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot (Tokyo)*. 1984;37(10):1231–7.
168. Powers T. The origin story of rapamycin: systemic bias in biomedical research and cold war politics. *Mol Biol Cell*. 2022;33(13):pe7.
169. Vasquez EM. Sirolimus: a new agent for prevention of renal allograft rejection. *Am J Health-Syst Pharm*. 2000;57(5):437–48; quiz 449–51.
170. Bierer BE, Mattila PS, Standaert RF, Herzenberg LA, Burakoff SJ, Crabtree G, et al. Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(23):9231–5.
171. Siekierka JJ, Wiederrecht G, Greulich H, Boulton D, Hung SH, Cryan J, et al. The cytosolic-binding protein for the immunosuppressant FK-506 is both a ubiquitous and highly conserved peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *J Biol Chem*. 1990;265(34):21011–5.
172. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*. 1991;253(5022):905–9.
173. Koltin Y, Faucette L, Bergsma DJ, Levy MA, Cafferkey R, Koser PL, et al. Rapamycin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase related to human FK506-binding protein. *Mol Cell Biol*. 1991;11(3):1718–23.
174. Cafferkey R, Young PR, McLaughlin MM, Bergsma DJ, Koltin Y, Sathe GM, et al. Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Mol Cell Biol*. 1993;13(10):6012.
175. Kunz J, Henriquez R, Schneider U, Deuter-Reinhard M, Movva NR, Hall MN. Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell*. 1993;73(3):585–96.

176. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*. 1994;369(6483):756–8.
177. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*. 1994;78(1):35–43.
178. Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, Williams JM, Dumont FJ, Wiederrecht G, et al. Isolation of a Protein Target of the FKBP12-Rapamycin Complex in Mammalian Cells. *J Biol Chem*. 1995;270(2):815–22.
179. Van Dam TJP, Zwartkruis FJT, Bos JL, Snel B. Evolution of the TOR Pathway. *J Mol Evol*. 2011;73(3–4):209–20.
180. Liu X, Guo B, Li Q, Nie J. mTOR in metabolic homeostasis and disease. *Exp Cell Res*. 2024;441(2):114173.
181. Rebsamen M, Pochini L, Stasyk T, de Araújo MEG, Galluccio M, Kandasamy RK, et al. SLC38A9 is a component of the lysosomal amino acid sensing machinery that controls mTORC1. *Nature*. 2015;519(7544):477–81.
182. Cui Z, Napolitano G, de Araujo MEG, Esposito A, Monfregola J, Huber LA, et al. Structure of the lysosomal mTORC1–TFEB–Rag–Ragulator megacomplex. *Nature*. 2023;614:572–579.
183. Valenstein ML, Lalgudi PV, Gu X, Kedir JF, Taylor MS, Chivukula RR, et al. Rag–Ragulator is the central organizer of the physical architecture of the mTORC1 nutrient-sensing pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2024;121(35):e2322755121.
184. Bar-Peled L, Schweitzer LD, Zoncu R, Sabatini DM. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell*. 2012;150(6):1196–208.
185. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008;30(2):214–26.
186. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*. 2011;13(9):1016–23.
187. Miyazaki M, McCarthy JJ, Esser KA. Insulin like growth factor-1-induced phosphorylation and altered distribution of tuberous sclerosis complex (TSC)1/TSC2 in C2C12 myotubes. *FEBS J*. 2010;277(9):2180–91.
188. Zhang HH, Huang J, Düvel K, Boback B, Wu S, Squillace RM, et al. Insulin Stimulates Adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 Pathway. *PLOS ONE*. 2009;4(7):e6189.

189. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 2003;115(5):577–90.
190. González A, Hall MN, Lin SC, Hardie DG. AMPK and TOR: The Yin and Yang of Cellular Nutrient Sensing and Growth Control. *Cell Metab*. 2020;31(3):472–92.
191. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*. 2004;18(23):2893–904.
192. Laplante M, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J Cell Sci*. 2013;126(8):1713–9.
193. Alexander A, Cai SL, Kim J, Nanez A, Sahin M, MacLean KH, et al. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(9):4153–8.
194. Danesh Pazhooh R, Rahnamay Farnood P, Asemi Z, Mirsafaei L, Yousefi B, Mirzaei H. mTOR pathway and DNA damage response: A therapeutic strategy in cancer therapy. *DNA Repair*. 2021;104:103142.
195. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(5):307–18.
196. Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*. 2005;433(7025):477–80.
197. Meijer AJ, Lorin S, Blommaert EF, Codogno P. Regulation of autophagy by amino acids and MTOR-dependent signal transduction. *Amino Acids*. 2015;47(10):2037–63.
198. Al-Bari MdAA, Xu P. Molecular regulation of autophagy machinery by mTOR-dependent and -independent pathways. *Ann N Y Acad Sci*. 2020;1467(1):3–20.
199. Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*. 2010;39(2):171–83.
200. Foster KG, Fingar DC. Mammalian Target of Rapamycin (mTOR): Conducting the Cellular Signaling Symphony. *J Biol Chem*. 2010;285(19):14071–7.
201. Fu W, Hall MN. Regulation of mTORC2 Signaling. *Genes*. 2020;11(9):1045.
202. Ragupathi A, Kim C, Jacinto E. The mTORC2 signaling network: targets and cross-talks. *Biochem J*. 2024;481(2):45–91.
203. Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J*. 2000;19(4):496–503.

204. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 2004;6(11):1122–8.
205. Miller RA, Harrison DE, Astle CM, Fernandez E, Flurkey K, Han M, et al. Rapamycin-mediated lifespan increase in mice is dose and sex dependent and metabolically distinct from dietary restriction. *Aging Cell.* 2014;13(3):468–77.
206. Zhang A, Meecham-Garcia G, Nguyen Hong C, Xie P, Kern CC, Zhang B, et al. Characterization of Effects of mTOR Inhibitors on Aging in *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2024;79(11):glae196.
207. Schinaman JM, Rana A, Ja WW, Clark RI, Walker DW. Rapamycin modulates tissue aging and lifespan independently of the gut microbiota in *Drosophila*. *Sci Rep.* 2019;9(1):7824.
208. Gems D. The hyperfunction theory: an emerging paradigm for the biology of aging. *Ageing Res Rev.* 2022;74:101557.
209. Guo J, Huang X, Dou L, Yan M, Shen T, Tang W, et al. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):1–40.
210. Panwar V, Singh A, Bhatt M, Tonk RK, Azizov S, Raza AS, et al. Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):375.
211. Kaeberlein M, Powers RW, Steffen KK, Westman EA, Hu D, Dang N, et al. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science.* 2005;310(5751):1193–6.
212. Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, Kovacs AL, Orosz L, Müller F. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature.* 2003;426(6967):620.
213. P K, Bm Z, T H, D K, V S, S B. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol.* 2004;14(10):885-90.
214. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science.* 2012;335(6076):1638–43.
215. Pedro de Magalhães J, Thompson L, de Lima I, Gaskill D, Li X, Thornton D, et al. A Reassessment of Genes Modulating Aging in Mice Using Demographic Measurements of the Rate of Aging. *Genetics.* 2018;208(4):1617–30.
216. Kim SS, Lee CK. Growth signaling and longevity in mouse models. *BMB Rep.* 2019;52(1):70–85.

217. Robida-Stubbs S, Glover-Cutter K, Lamming DW, Mizunuma M, Narasimhan SD, Neumann-Haefelin E, et al. TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. *Cell Metab.* 2012;15(5):713–24.
218. Strong R, Miller RA, Cheng CJ, Nelson JF, Gelfond J, Allani SK, et al. Lifespan benefits for the combination of rapamycin plus acarbose and for captopril in genetically heterogeneous mice. *Aging Cell.* 2022;21(12):e13724.
219. Kennedy BK, Lamming DW. The Mechanistic Target of Rapamycin: The Grand ConducTOR of Metabolism and Aging. *Cell Metab.* 2016;23(6):990–1003.
220. Juricic P, Lu YX, Leech T, Drews LF, Paulitz J, Lu J, et al. Long-lasting geroprotection from brief rapamycin treatment in early adulthood by persistently increased intestinal autophagy. *Nat Aging.* 2022;2(9):824–36.
221. Moqri M, Herzog C, Poganik JR, Justice J, Belsky D, Higgins-Chen A, et al. Biomarkers of Aging for the Identification and Evaluation of Longevity Interventions. *Cell.* 2023;186(18):3758–75.
222. Mannick JB, Morris M, Hockey HUP, Roma G, Beibel M, Kulmatycki K, et al. TORC1 inhibition enhances immune function and reduces infections in the elderly. *Sci Transl Med.* 2018;10(449):eaaq1564.
223. Hudson J, Kaeberlein T, Mahal A, Wong N, Ghorbanifarajzadeh M, Radella F, et al. Evaluation of off-label rapamycin use on oral health. *GeroScience.* 2024;46(5):4135-46.
224. Kaeberlein TL, Green AS, Haddad G, Hudson J, Isman A, Nyquist A, et al. Evaluation of off-label rapamycin use to promote healthspan in 333 adults. *GeroScience.* 2023;45(5):2757–68.
225. Strong R, Miller RA, Antebi A, Astle CM, Bogue M, Denzel MS, et al. Longer lifespan in male mice treated with a weakly estrogenic agonist, an antioxidant, an α -glucosidase inhibitor or a Nrf2-inducer. *Aging Cell.* 2016;15(5):872–84.
226. Minton DM, Ailiani AR, Focht MDK, Kersh ME, Li A, Elliehausen CJ, et al. Inhibition of mTORC1 by rapamycin results in feedback activation of AktS473 and aggravates hallmarks of osteoarthritis in female mice and non-human primates. *BioRxiv Prepr Serv Biol.* 2025;2024.05.14.594256.
227. Horvath S, Zoller JA, Haghani A, Lu AT, Raj K, Jasinska AJ, et al. DNA methylation age analysis of rapamycin in common marmosets. *GeroScience.* 2021;43(5):2413–25.
228. Howell JJ, Hellberg K, Turner M, Talbott G, Kolar MJ, Ross DS, et al. Metformin Inhibits Hepatic mTORC1 Signaling via Dose-Dependent Mechanisms Involving AMPK and the TSC Complex. *Cell Metab.* 2017;25(2):463–71.
229. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia.* 2017;60(9):1577–85.

230. Yang Y, Lu X, Liu N, Ma S, Zhang H, Zhang Z, et al. Metformin decelerates aging clock in male monkeys. *Cell*. 2024;187(22):6358-6378.e29.
231. Jiang N, Gelfond J, Liu Q, Strong R, Nelson JF. The Gehan test identifies life-extending compounds overlooked by the log-rank test in the NIA Interventions Testing Program: Metformin, Enalapril, caffeic acid phenethyl ester, green tea extract, and 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin hydrochloride. *GeroScience*. 2024;46(5):4533–41.
232. Konopka AR, Laurin JL, Schoenberg HM, Reid JJ, Castor WM, Wolff CA, et al. Metformin inhibits mitochondrial adaptations to aerobic exercise training in older adults. *Aging Cell*. 2019;18(1):e12880.
233. Ríos JL, Francini F, Schinella GR. Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Planta Med*. 2015;81(12–13):975–94.
234. Harrison DE, Strong R, Alavez S, Astle CM, DiGiovanni J, Fernandez E, et al. Acarbose improves health and lifespan in aging HET3 mice. *Aging Cell*. 2019;18(2):e12898.
235. Harrison DE, Strong R, Allison DB, Ames BN, Astle CM, Atamna H, et al. Acarbose, 17- α -estradiol, and nordihydroguaiaretic acid extend mouse lifespan preferentially in males. *Aging Cell*. 2014;13(2):273–82.
236. Morawe MP, Liao F, Amberg W, van Bergeijk J, Chang R, Gulino M, et al. Pharmacological mTOR-inhibition facilitates clearance of AD-related tau aggregates in the mouse brain. *Eur J Pharmacol*. 2022;934:175301.
237. Bové J, Martínez-Vicente M, Vila M. Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(8):437–52.
238. Xie PL, Zheng MY, Han R, Chen WX, Mao JH. Pharmacological mTOR inhibitors in ameliorating Alzheimer's disease: current review and perspectives. *Front Pharmacol*. 2024;15:1366061.
239. Kaeberlein M, Galvan V. Rapamycin and Alzheimer's disease: Time for a clinical trial? *Sci Transl Med*. 2019;11(476):ear4289.
240. Richardson A, Galvan V, Lin AL, Oddo S. How longevity research can lead to therapies for Alzheimer's disease: The rapamycin story. *Exp Gerontol*. 2015;68:51–8.
241. Esposito K, Chiodini P, Colao A, Lenzi A, Giugliano D. Metabolic syndrome and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2012;35(11):2402–11.
242. Karra P, Winn M, Pauleck S, Bulsiewicz-Jacobsen A, Peterson L, Coletta A, et al. Metabolic dysfunction and obesity-related cancer: beyond obesity and metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*. 2022;30(7):1323–34.

243. Pollak M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(3):159–69.
244. Giovannucci E. Insulin and colon cancer. *Cancer Causes Control CCC*. 1995;6(2):164–79.
245. Zhan ZQ, Chen YZ, Huang ZM, Luo YH, Zeng JJ, Wang Y, et al. Metabolic syndrome, its components, and gastrointestinal cancer risk: a meta-analysis of 31 prospective cohorts and Mendelian randomization study. *J Gastroenterol Hepatol*. 2024;39(4):630–41.
246. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;168(6):960–76.
247. Blagosklonny MV. Cancer prevention with rapamycin. *Oncotarget*. 2023;14:342–50.
248. Dancey JE. Inhibitors of the mammalian target of rapamycin. *Expert Opin Investig Drugs*. 2005;14(3):313–28.
249. Koike H, Nitta T, Sekine Y, Arai S, Furuya Y, Nomura M, et al. YM155 reverses rapamycin resistance in renal cancer by decreasing survivin. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014;140(10):1705–13.
250. Vicier C, Dieci MV, Andre F. New strategies to overcome resistance to mammalian target of rapamycin inhibitors in breast cancer. *Curr Opin Oncol*. 2013;25(6):587–93.
251. Canaud G, Knebelmann B, Harris PC, Vrtovsnik F, Correas JM, Pallet N, et al. Therapeutic mTOR inhibition in autosomal dominant polycystic kidney disease: What is the appropriate serum level? *Am J Transplant*. 2010;10(7):1701–6.
252. Yasuda-Yamahara M, Kume S, Maegawa H. Roles of mTOR in Diabetic Kidney Disease. *Antioxidants*. 2021;10(2):321.
253. Cuadrado-Payán E, Diekmann F, Cucchiari D. Medical Aspects of mTOR Inhibition in Kidney Transplantation. *Int J Mol Sci*. 2022;23(14):7707.
254. Sciarretta S, Forte M, Frati G, Sadoshima J. New Insights Into the Role of mTOR Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2018;122(3):489–505.
255. Martinet W, De Loof H, De Meyer GRY. mTOR inhibition: a promising strategy for stabilization of atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*. 2014;233(2):601–7.
256. Mueller MA, Beutner F, Teupser D, Ceglarek U, Thiery J. Prevention of atherosclerosis by the mTOR inhibitor everolimus in LDLR^{-/-} mice despite severe hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2008;198(1):39–48.
257. McKeage K, Murdoch D, Goa KL. The sirolimus-eluting stent: a review of its use in the treatment of coronary artery disease. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2003;3(3):211–30.

258. Gao C, Kogame N, Modolo R, Takahashi K, Wang R, Kawashima H, et al. The ultra-thin strut sirolimus-eluting coronary stent: SUPRAFLEX. *Future Cardiol.* 2021;17(2):227–37.
259. Piccolo R. The Debut of Sirolimus-Eluting Balloons: The Final Nail in the Coffin for In-Stent Restenosis? *JACC: Cardiovasc Interv.* 2017;10(20):2038–9.
260. Baghdadi M, Nespital T, Monzó C, Deelen J, Grönke S, Partridge L. Intermittent rapamycin feeding recapitulates some effects of continuous treatment while maintaining lifespan extension. *Mol Metab.* 2024;81:101902.
261. Seyhan AA. Lost in translation: the valley of death across preclinical and clinical divide – identification of problems and overcoming obstacles. *Transl Med Commun.* 2019;4(1):18.
262. Perel P, Roberts I, Sena E, Wheble P, Briscoe C, Sandercock P, et al. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *BMJ.* 2007;334(7586):197.
263. Shanks N, Greek R, Greek J. Are animal models predictive for humans? *Philos Ethics Humanit Med.* 2009;4(1):2.
264. Flurkey K, Curren JM. Pitfalls of animal model systems in ageing research. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004;18(3):407–21.
265. Ineichen BV, Furrer E, Grüniger SL, Zürrer WE, Macleod MR. Analysis of animal-to-human translation shows that only 5% of animal-tested therapeutic interventions obtain regulatory approval for human applications. *PLOS Biol.* 2024;22(6):e3002667.
266. Braeckman BP, Vanfleteren JR. Genetic control of longevity in *C. elegans*. *Exp Gerontol.* 2007;42(1–2):90–8.
267. Ferrucci L, Gonzalez-Freire M, Fabbri E, Simonsick E, Tanaka T, Moore Z, et al. Measuring biological aging in humans: A quest. *Aging Cell.* 2020;19(2):e13080.
268. Chaib S, Tchkonja T, Kirkland JL. Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. *Nat Med.* 2022;28(8):1556–68.
269. Pitkala KH, Strandberg TE. Clinical trials in older people. *Age Ageing.* 2022;51(5):afab282.
270. Wolinsky FD, Jones MP, Wehby GL. Gathering data from older adults via proxy respondents: research challenges. *J Comp Eff Res.* 2012;1(6):467–70.
271. Olshansky SJ, Kirkland JL. Geroscience and Its Promise. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2024;14(8):a041725.
272. Cesari M, Bernabei R, Vellas B, Fielding RA, Rooks D, Azzolino D, et al. Challenges in the Development of Drugs for Sarcopenia and Frailty - Report from the International

- Conference on Frailty and Sarcopenia Research (ICFSR) Task Force. *J Frailty Aging*. 2022;11(2):135–42.
273. Kirkland JL, Tchkonina T, Zhu Y, Niedernhofer LJ, Robbins PD. The Clinical Potential of Senolytic Drugs. *J Am Geriatr Soc*. 2017;65(10):2297–301.
274. Lee MB, Kaeberlein M. Translational Geroscience: From invertebrate models to companion animal and human interventions. *Transl Med Aging*. 2018;2:15–29.
275. Forte M, Rodolico D, Ameri P, Catalucci D, Chimenti C, Crotti L, et al. Molecular mechanisms underlying the beneficial effects of exercise and dietary interventions in the prevention of cardiometabolic diseases. *J Cardiovasc Med*. 2023; 24(Suppl 1):e3-e14.
276. Justice JN, Leng XI, LeBrasseur NK, Tchkonina T, Kirkland JL, Mitin N, et al. Caloric Restriction Intervention Alters Specific Circulating Biomarkers of the Senescence-Associated Secretome in Middle-Aged and Older Adults With Obesity and Prediabetes in an 18-Week Randomized Controlled Trial. *J Gerontol Ser A*. 2024;79(1):glad214.
277. Justice JN, Nambiar AM, Tchkonina T, LeBrasseur NK, Pascual R, Hashmi SK, et al. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. *eBioMedicine*. 2019;40:554–63.
278. Kaeberlein M. RTB101 and immune function in the elderly: Interpreting an unsuccessful clinical trial. *Transl Med Aging*. 2020;4:32–4.
279. Aging Biomarker Consortium, Bao H, Cao J, Chen M, Chen M, Chen W, et al. Biomarkers of aging. *Sci China Life Sci*. 2023;66(5):893–1066.
280. Wu F, Mu WC, Markov NT, Fuentealba M, Halaweh H, Senchyna F, et al. Immunological biomarkers of aging. *J Immunol*. 2025;214(5):889–902.
281. Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet*. 2018;19(6):371–84.
282. Ogrodnik M, Gladyshev VN. The meaning of adaptation in aging: insights from cellular senescence, epigenetic clocks and stem cell alterations. *Nat Aging*. 2023;3(7):766-75.
283. Teschendorff AE, Horvath S. Epigenetic ageing clocks: statistical methods and emerging computational challenges. *Nat Rev Genet*. 2025;26(5):350–68.
284. Biomarkers of Aging Consortium, Herzog CMS, Goeminne LJE, Poganik JR, Barzilai N, Belsky DW, et al. Challenges and recommendations for the translation of biomarkers of aging. *Nat Aging*. 2024;4(10):1372–83.
285. Moqri M, Herzog C, Poganik JR, Ying K, Justice JN, Belsky DW, et al. Validation of biomarkers of aging. *Nat Med*. 2024;30(2):360–72.

286. Chauhan B, Singh BK, Paul TJ, Trivedi N. Chapter 7 - Biomarker validation: challenges and regulatory perspectives. In: Prabhakar PK, editor. *The Potential of Cancer Biomarkers*. Elsevier; 2025 . p. 149–76.
287. Tuly SR, Ranjbari S, Murat EA, Arslanturk S. From Silos to Synthesis: A comprehensive review of domain adaptation strategies for multi-source data integration in healthcare. *Comput Biol Med*. 2025;191:110108.
288. Cho H, Froelicher D, Dokmai N, Nandi A, Sadhuka S, Hong MM, et al. Privacy-Enhancing Technologies in Biomedical Data Science. *Annu Rev Biomed Data Sci*. 2024;7(1):317–43.
289. Fielding RA, Atkinson EJ, Aversa Z, White TA, Heeren AA, Achenbach SJ, et al. Associations between biomarkers of cellular senescence and physical function in humans: observations from the lifestyle interventions for elders (LIFE) study. *GeroScience*. 2022;44(6):2757–70.
290. Fiorito G, Tosti V, Polidoro S, Bertozzi B, Veronese N, Cava E, et al. Multi-omic analysis of biological aging biomarkers in long-term calorie restriction and endurance exercise practitioners: A cross-sectional study. *Aging Cell*. 2025;24(4):e14442.
291. Shen X, Wang C, Zhou X, Zhou W, Hornburg D, Wu S, et al. Nonlinear dynamics of multi-omics profiles during human aging. *Nat Aging*. 2024;4(11):1619–34.
292. Lu AT, Quach A, Wilson JG, Reiner AP, Aviv A, Raj K, et al. DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging*. 2019;11(2):303–27.
293. Levine ME, Lu AT, Quach A, Chen BH, Assimes TL, Bandinelli S, et al. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging*. 2018;10(4):573–91.
294. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. 2013;14(10):R115.
295. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, et al. Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Mol Cell*. 2013;49(2):359–67.
296. Vaiserman A, Krasnienkov D. Telomere Length as a Marker of Biological Age: State-of-the-Art, Open Issues, and Future Perspectives. *Front Genet*. 2021;11:630186.
297. Yin H, Pickering JG. Telomere Length: Implications for Atherogenesis. *Curr Atheroscler Rep*. 2023;25(3):95–103.
298. Verdin E. NAD⁺ in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science*. 2015;350(6265):1208–13.
299. Chini CCS, Cordeiro HS, Tran NLK, Chini EN. NAD metabolism: Role in senescence regulation and aging. *Aging Cell*. 2024;23(1):e13920.

300. Mohamad Kamal NS, Safuan S, Shamsuddin S, Foroozandeh P. Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods. *Eur J Cell Biol.* 2020;99(6):151108.
301. Ogrodnik M, Carlos Acosta J, Adams PD, d'Adda di Fagagna F, Baker DJ, Bishop CL, et al. Guidelines for minimal information on cellular senescence experimentation *in vivo*. *Cell.* 2024;187(16):4150–75.
302. Cummings SR, Kritchevsky SB. Endpoints for geroscience clinical trials: health outcomes, biomarkers, and biologic age. *GeroScience.* 2022;44(6):2925–31.
303. Niedernhofer LJ, Kirkland JL, Ladiges W. Molecular pathology endpoints useful for aging studies. *Ageing Res Rev.* 2017;35:241–9.
304. Hu JL, Todhunter ME, LaBarge MA, Gartner ZJ. Opportunities for organoids as new models of aging. *J Cell Biol.* 2018;217(1):39–50.
305. Lujan C, Tyler EJ, Ecker S, Webster AP, Stead ER, Martinez-Miguel VE, et al. An expedited screening platform for the discovery of anti-ageing compounds *in vitro* and *in vivo*. *Genome Med.* 2024;16(1):85.
306. Aguado J, Wolvetang EJ. Exploring aging interventions in human brain organoids. *Aging.* 2022;14(4):1592–3.
307. Yi S, Lin K, Jiang T, Shao W, Huang C, Jiang B, et al. NMR-based metabonomic analysis of HUVEC cells during replicative senescence. *Aging.* 2020;12(4):3626–46.
308. Chang MWF, Grillari J, Mayrhofer C, Fortschegger K, Allmaier G, Marzban G, et al. Comparison of early passage, senescent and hTERT immortalized endothelial cells. *Exp Cell Res.* 2005;309(1):121–36.
309. Medina-Leyte DJ, Domínguez-Pérez M, Mercado I, Villarreal-Molina MT, Jacobo-Albavera L. Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review. *Appl Sci.* 2020;10(3):938.
310. Hossain MK, Kim HR, Chae HJ. Aging phenotype in AD brain organoids: Track to success and challenges. *Ageing Res Rev.* 2024;96:102256.
311. Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell.* 2018;172(1–2):373–386.e10.
312. Driehuis E, Kretschmar K, Clevers H. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications. *Nat Protoc.* 2020;15(10):3380–409.
313. Liu H, Gan Z, Qin X, Wang Y, Qin J. Advances in Microfluidic Technologies in Organoid Research. *Adv Healthc Mater.* 2024;13(21):e2302686.

314. Wang YI, Abaci HE, Shuler ML. Microfluidic blood-brain barrier model provides in vivo-like barrier properties for drug permeability screening. *Biotechnol Bioeng.* 2017;114(1):184–94.
315. Yoon JK, Kim J, Shah Z, Awasthi A, Mahajan A, Kim Y. Advanced Human BBB-on-a-Chip: A New Platform for Alzheimer’s Disease Studies. *Adv Healthc Mater.* 2021;10(15):e2002285.
316. Young RE, Huh DD. Organ-on-a-chip technology for the study of the female reproductive system. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021;173:461–78.
317. Chernyavska M, Masoudnia M, Valerius T, Verdurmen WPR. Organ-on-a-chip models for development of cancer immunotherapies. *Cancer Immunol Immunother CII.* 2023;72(12):3971–83.
318. Zwi-Dantsis L, Jayarajan V, Church GM, Kamm RD, de Magalhães JP, Moeendarbary E. Aging on Chip: Harnessing the Potential of Microfluidic Technologies in Aging and Rejuvenation Research. *Adv Healthc Mater.* 2025;14(20):e2500217.
319. Kirkland JL, Tchkonina T. Senolytic drugs: from discovery to translation. *J Intern Med.* 2020;288(5):518–36.
320. Vijg J, Campisi J. Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature.* 2008;454(7208):1065–71.
321. Lee OH, Bae SK, Bae MH, Lee YM, Moon EJ, Cha HJ, et al. Identification of angiogenic properties of insulin-like growth factor II in in vitro angiogenesis models. *Br J Cancer.* 2000;82(2):385–91.
322. Park HS, Abd El-Aty AM, Jeong JH, Lee T, Jung TW. Capmatinib suppresses LPS-induced interaction between HUVECs and THP-1 monocytes through suppression of inflammatory responses. *Biomed J.* 2023;46(2):100534.
323. Ronald JA, Ionescu CV, Rogers KA, Sandig M. Differential regulation of transendothelial migration of THP-1 cells by ICAM-1/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4. *J Leukoc Biol.* 2001;70(4):601–9.
324. Demidenko ZN, Zubova SG, Bukreeva EI, Pospelov VA, Pospelova TV, Blagosklonny MV. Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle.* 2009;8(12):1888–95.
325. Weiss R, Fernandez E, Liu Y, Strong R, Salmon AB. Metformin reduces glucose intolerance caused by rapamycin treatment in genetically heterogeneous female mice. *Aging.* 2018;10(3):386–401.
326. Wojciechowski D, Wiseman A. Long-Term Immunosuppression Management: Opportunities and Uncertainties. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2021;16(8):1264–71.

327. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. Identification by Morphologic and Immunologic Criteria. *J Clin Invest.* 1973;52(11):2745–56.
328. Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc.* 2007;2(3):481–5.
329. Greenwood SK, Hill RB, Sun JT, Armstrong MJ, Johnson TE, Gara JP, et al. Population doubling: A simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the in vitro assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results. *Environ Mol Mutagen.* 2004;43(1):36-44.
330. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(6).
331. Faulkner A, Purcell R, Hibbert A, Latham S, Thomson S, Hall WL, et al. A thin layer angiogenesis assay: a modified basement matrix assay for assessment of endothelial cell differentiation. *BMC Cell Biol.* 2014;15:41.
332. Prados de la Escosura L. Health, income, and the preston curve: A long view. *Econ Hum Biol.* 2023;48:101212.
333. Khor ES, Wong PF. Endothelial replicative senescence delayed by the inhibition of mTORC1 signaling involves MicroRNA-107. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;101:64–73.
334. Strong R, Miller RA, Bogue M, Fernandez E, Javors MA, Libert S, et al. Rapamycin-mediated mouse lifespan extension: Late-life dosage regimes with sex-specific effects. *Aging Cell.* 2020;19(11):e13269.
335. Candela-Boix MR. Population pharmacokinetics models of sirolimus in renal transplant patients: A systematic review. *Farm Hosp.* 2021;
336. Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, et al. An ATP-competitive Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Reveals Rapamycin-resistant Functions of mTORC1. *J Biol Chem.* 2009;284(12):8023–32.
337. Arriola Apelo SI, Neuman JC, Baar EL, Syed FA, Cummings NE, Brar HK, et al. Alternative rapamycin treatment regimens mitigate the impact of rapamycin on glucose homeostasis and the immune system. *Aging Cell.* 2016;15(1):28–38.
338. Soares HP, Ni Y, Kisfalvi K, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. Different Patterns of Akt and ERK Feedback Activation in Response to Rapamycin, Active-Site mTOR Inhibitors and Metformin in Pancreatic Cancer Cells. *PLOS ONE.* 2013;8(2):e57289.
339. Breuleux M, Klopfenstein M, Stephan C, Doughty CA, Barys L, Maira SM, et al. Increased AKT S473 phosphorylation after mTORC1 inhibition is rictor dependent and does not predict tumor cell response to PI3K/mTOR inhibition. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(4):742–

340. Lamming DW, Mihaylova MM, Katajisto P, Baar EL, Yilmaz OH, Hutchins A, et al. Depletion of Rictor, an essential protein component of mTORC2, decreases male lifespan. *Aging Cell*. 2014;13(5):911–7.
341. Yang HW, Hong HL, Luo WW, Dai CM, Chen XY, Wang LP, et al. mTORC2 facilitates endothelial cell senescence by suppressing Nrf2 expression via the Akt/GSK-3 β /C/EBP α signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin*. 2018;39(12):1837–46.
342. Leontieva OV, Demidenko ZN, Blagosklonny MV. Dual mTORC1/C2 inhibitors suppress cellular geroconversion (a senescence program). *Oncotarget*. 2015;6(27):23238–48.
343. Walters HE, Deneka-Hannemann S, Cox LS. Reversal of phenotypes of cellular senescence by pan-mTOR inhibition. *Aging*. 2016;8(2):231–44.
344. Wang Y, Li Q, Zhang Z, Peng K, Zhang DM, Yang Q, et al. mTOR contributes to endothelium-dependent vasorelaxation by promoting eNOS expression and preventing eNOS uncoupling. *Commun Biol*. 2022;5(1):726.
345. Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *Mol Cell Biol*. 2012;32(1):2–11.
346. Ballesteros-Álvarez J, Andersen JK. mTORC2: The other mTOR in autophagy regulation. *Aging Cell*. 2021;20(8):e13431.
347. Mizushima N, Levine B. Autophagy in Human Diseases. *N Engl J Med*. 2020;383(16):1564–76.
348. Sasaki N, Itakura Y, Toyoda M. Rapamycin promotes endothelial–mesenchymal transition during stress-induced premature senescence through the activation of autophagy. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1):43.
349. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, et al. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006;22(2):159–68.
350. Hu M, Ladowski JM, Xu H. The Role of Autophagy in Vascular Endothelial Cell Health and Physiology. *Cells*. 2024;13(10):825.
351. Jiang P, Lan Y, Luo J, Ren YL, Liu DG, Pang JX, et al. Rapamycin promoted thrombosis and platelet adhesion to endothelial cells by inducing membrane remodeling. *BMC Cell Biol*. 2014;15:7.
352. Carmona-Gutierrez D, Zimmermann A, Kainz K, Pietrocola F, Chen G, Maglioni S, et al. The flavonoid 4,4'-dimethoxychalcone promotes autophagy-dependent longevity across species. *Nat Commun*. 2019;10(1):651.

353. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*. 2017;169(3):381–405.
354. Gallo S, Vitacolonna A, Bonzano A, Comoglio P, Crepaldi T. ERK: A Key Player in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9):2164.
355. Jin C, Zhao Y, Yu L, Xu S, Fu G. MicroRNA-21 mediates the rapamycin-induced suppression of endothelial proliferation and migration. *FEBS Lett*. 2013 Feb;587(4):378–85.
356. Wagner M, Hampel B, Bernhard D, Hala M, Zwerschke W, Jansen-Dürr P. Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis. *Exp Gerontol*. 2001;36(8):1327–47.
357. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*. 2006;5(2):187–95.
358. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*. 2007;130(2):223–33.
359. Sadee W, Wang D, Hartmann K, Toland AE. Pharmacogenomics: Driving Personalized Medicine. *Pharmacol Rev*. 2023;75(4):789–814.
360. Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ. The Physiology of p16^{INK4A}-Mediated G1 Proliferative Arrest. *Cell Biochem Biophys*. 2000;33(2):189–97.
361. Gire V, Dulic V. Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle Georget Tex*. 2015;14(3):297–304.
362. Barilari M, Bonfils G, Treins C, Koka V, De Villeneuve D, Fabrega S, et al. ZRF 1 is a novel S6 kinase substrate that drives the senescence programme. *EMBO J*. 2017;36(6):736–50.
363. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of PECAM-1 (CD31). *Curr Opin Hematol*. 2016;23(3):253–9.
364. Yamamoto H, Ehling M, Kato K, Kanai K, van Lessen M, Frye M, et al. Integrin β 1 controls VE-cadherin localization and blood vessel stability. *Nat Commun*. 2015;6(1):6429.
365. Atiq F, O'Donnell JS. Novel functions for von Willebrand factor. *Blood*. 2024;144(12):1247–56.
366. Miyakawa AA, Girão-Silva T, Krieger JE, Edelman ER. Rapamycin activates TGF receptor independently of its ligand: implications for endothelial dysfunction. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2018;132(4):437–47.

367. Ibrahim AQ, Abdullah MS, Ahram M, Abdalla S. A Modified Protocol for the Isolation, Culture, and Characterization of Human Smooth Muscle Cells from the Umbilical Cord. *Methods Protoc.* 2023;6(3):54.
368. Tian D, Zeng X, Wang W, Wang Z, Zhang Y, Wang Y. Protective effect of rapamycin on endothelial-to-mesenchymal transition in HUVECs through the Notch signaling pathway. *Vascul Pharmacol.* 2019;113:20–6.
369. Moss SC, Lightell DJ, Marx SO, Marks AR, Woods TC. Rapamycin regulates endothelial cell migration through regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *J Biol Chem.* 2010;285(16):11991–7.
370. Davalli P, Mitic T, Caporali A, Lauriola A, D’Arca D. ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3565127.
371. Correia-Melo C, Birch J, Fielder E, Rahmatika D, Taylor J, Chapman J, et al. Rapamycin improves healthspan but not inflammaging in *nfkb1*^{-/-} mice. *Aging Cell.* 2019;18(1):e12882.
372. Dong J, Wang Q, Gu T, Liu G, Petrov YV, Baulin VE, et al. Rapamycin functionalized carbon Dots: Target-oriented synthesis and suppression of vascular cell senescence. *J Colloid Interface Sci.* 2024;660:534–44.
373. Lin K, Luo X, Du C, Zuo C, Li Z, Zhang G, et al. ANRIL modulates endothelial senescence and angiogenesis through SASP-driven miR146a regulation in age-related vascular dysfunction. *Mech Ageing Dev.* 2025;225:112058.
374. Sun JJ, Yin XW, Liu HH, Du WX, Shi LY, Huang YB, et al. Rapamycin inhibits ox-LDL-induced inflammation in human endothelial cells in vitro by inhibiting the mTORC2/PKC/c-Fos pathway. *Acta Pharmacol Sin.* 2018;39(3):336–44.
375. Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(5):324–37.
376. Shin JJ, Suk K, Lee WH. LncRNA BRE-AS1 regulates the JAK2/STAT3-mediated inflammatory activation via the miR-30b-5p/SOC3 axis in THP-1 cells. *Sci Rep.* 2024;14(1):25726.

TABLA DE FIGURAS

9. Tabla de figuras

Figura 1 Pirámides de población de la Unión Europea en los años 2009 y 2024.	14
Figura 2 “Hallmarks of aging” o claves del envejecimiento.	20
Figura 3 Vías de respuesta al daño en el ADN y acortamiento telomérico.	25
Figura 4 Resumen del proceso de senescencia celular.	28
Figura 5 Esquema de la vía mTOR.	40
Figura 6 Esquema del diseño experimental.	66
Figura 7 Condiciones para la RT-qPCR.	71
Figura 8 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre las rutas mTOR, PI3K/AKT1, MAPK y eNOS en células HUVEC.	80
Figura 9 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre marcadores de autofagia en células HUVEC.	81
Figura 10 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre los PDL máximos de cultivos de células HUVEC.	82
Figura 11 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre los PDL de células HUVEC durante el cultivo.	83
Figura 12 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre la capacidad proliferativa de células HUVEC a lo largo del cultivo.	84
Figura 13 Efecto de los pases y del tratamiento con rapamicina sobre la distribución del ciclo celular en cultivos de células HUVEC.	86
Figura 14 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre la actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia en cultivos de células HUVEC.	88
Figura 15 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre la expresión de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclina p16 ^{INK4a} y p21 ^{Cip1} en células HUVEC.	90
Figura 16 Análisis de la identidad endotelial en cultivos de células HUVEC mediante RT-PCR semicuantitativa.	92
Figura 17 Preservación de la expresión de CD144 en células HUVEC tratadas con rapamicina a lo largo del cultivo.	94
Figura 18 Ausencia de expresión de α -actina de músculo liso (α -SMA) en células HUVEC a lo largo del cultivo.	95

Figura 19 Controles de especificidad para la inmunocitoquímica de VE-cadherina y α -SMA.....	96
Figura 20 Efecto del tratamiento con rapamicina en la capacidad migratoria de células HUVEC en distintos pases de cultivo.....	98
Figura 21 Efecto del tratamiento con rapamicina en la formación de capilares in vitro por células HUVEC.....	99
Figura 22 Efecto del tratamiento con rapamicina en el equilibrio redox y en los niveles de NO en cultivos de células HUVEC.....	101
Figura 23 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre la expresión de moléculas de adhesión endotelial en cultivos de células HUVEC.....	102
Figura 24 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre la expresión génica de IL6 e IL8 en células HUVEC.....	103
Figura 25 Efecto del tratamiento con rapamicina sobre la secreción de citocinas en cultivos de células HUVEC.....	105
Figura 26 Efecto del MC de células HUVEC sobre la producción de ERO en monocitos THP-1.....	106
Figura 27 Activación de monocitos THP-1 tras tratamiento con MC de células HUVEC.....	108

ANEXOS



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Ana Estany Gestal, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 18 de enero de 2023 el estudio:

Título: Potencial pronóstico y terapéutico del RAGE soluble y la galectina 3 tras IAMCEST. Un estudio translacional basado en los resultados clínicos.

Versión: 1, 19/12/2022

Promotor/a: Ezequiel Álvarez Castro y Rosa María Agra Bermejo

Investigador/a: Ezequiel Álvarez Castro y Rosa María Agra Bermejo

Código de Registro: 2023/021

Y que este Comité, tomando en consideración la pertinencia del estudio, el conocimiento disponible, los requisitos legales aplicables y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité, emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del citado estudio.

NOTA: Se le recuerda que en el caso de que en este estudio se recluten pacientes, el equipo investigador debe tener disponible el Documento de Consentimiento Informado (Hojas de Información y Hojas de Firma) tanto en *galego* como en castellano en el momento de comenzar el reclutamiento.

Comité Territorial de Santiago y Lugo
XERENCIA DO SERVIZO GALEGO DE SAÚDE
Complexo Administrativo de San Lázaro
15781 Santiago de Compostela
T. 881 546425
ceic@sergas.gal
<https://acis.sergas.es/cartafol/Redes-de-Comites-de-Etica-da-Investigacion>

Y HACE CONSTAR QUE:

1.- El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo cumple tanto en su composición como en sus PNTs los requisitos legales vigentes.

2.- La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo es:

Presidenta

Pilar Rodríguez Ledo. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Vicepresidenta

María Mercedes Rodicio García. Médico especialista en Pediatría.

Secretaria

Ana Estany Gestal. Licenciada en Farmacia.

Vicesecretaria

Catalina Caamaño Isorna. Farmacéutica de Atención Primaria.

Vocales

M^a Cristina Arijón Barazal. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Raúl Franco Gutiérrez. Médico especialista en Cardiología.

Jesús Fernández Álvarez. Miembro lego.

Ricardo García Martínez. Licenciado en Derecho.

Ana M^a Hermida Cao. Farmacéutica especialista en Farmacia Hospitalaria

Yago Leira Feijoo. Licenciado en Odontología.

Eva Marcos Doldán. Analista-programadora.

Jesús Prego Domínguez. Enfermero.

Carlos Rodríguez Moreno. Médico especialista en Farmacología Clínica.

Juan Manuel Vázquez Lago. Médico especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.

Para que conste donde proceda, y a petición de quien proceda, en Santiago de Compostela,

La Secretaria del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,

Todas las imágenes, tablas y figuras presentes en esta tesis doctoral son de autoría propia.

Las figuras se realizaron empleando elementos de BioRender®.com

Los permisos para la reproducción de la Figura 2 se adjuntan a continuación:

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Nov 12, 2025

This Agreement between Aitor Picos Martínez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	6142631079721
License date	Nov 05, 2025
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Cell
Licensed Content Title	Hallmarks of aging: An expanding universe
Licensed Content Author	Carlos López-Otín, Maria A. Blasco, Linda Partridge, Manuel Serrano, Guido Kroemer
Licensed Content Date	Jan 19, 2023
Licensed Content Volume	186
Licensed Content Issue	2
Licensed Content Pages	36
Start Page	243
End Page	278
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic

Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Title of new work	Efectos longitudinales del tratamiento intermitente con rapamicina sobre la senescencia replicativa de células HUVEC
Institution name	Universidade de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Feb 2026
Portions	Figure 1
The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Aitor Picos Martínez
Specific Languages	Spanish
Requestor Location	Avenida de Barcelona, s/n
Publisher Tax ID	Santiago de Compostela, A Coruña 15782 Spain
Payment Type	GB 494 6272 12 Invoice
Email Address	aitor.picos@rai.usc.es
Billing Address	USC Avenida de Barcelona, s/n
Total	Santiago de Compostela, Spain 15782 0.00 EUR
Terms and Conditions	

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your RightsLink account and that are available at any time at <https://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given. The material may not be reproduced or used in any other way, including use in combination with an artificial intelligence tool (including to train an algorithm, test, process, analyse, generate output and/or develop any form of artificial intelligence tool), or to create any derivative work and/or service (including resulting from the use of artificial intelligence tools).

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk [here](#)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the

course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do

- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. For book authors the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. Thesis/Dissertation: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to

supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.11

Questions? customercare@copyright.com.



El envejecimiento y la senescencia celular son factores de riesgo cardiovascular. Esta tesis doctoral estudió el efecto del tratamiento intermitente con rapamicina, un inhibidor de mTOR, sobre la senescencia replicativa de células endoteliales humanas (HUVEC) en cultivo. El estudio encontró que la administración semanal de rapamicina retrasa los marcadores de senescencia y preserva la capacidad de las células endoteliales para proliferar y funcionar correctamente. Además, reduce el estrés oxidativo y disminuye parcialmente la secreción de moléculas proinflamatorias, atenuando en algunos casos la activación de monocitos expuestos al secretoma de las células HUVEC. Los resultados sugieren que la inhibición intermitente de mTOR podría ser una estrategia eficaz para retrasar la senescencia vascular.