



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Lucía
Antelo Iglesias

Tesis doctoral

Estudio de la senescencia
inducida por quimioterapia en
cáncer

Santiago de Compostela, 2023

Programa de doctorado en Medicina Molecular

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LA SENESCENCIA INDUCIDA POR QUIMIOTERAPIA EN CÁNCER

Autora

Lucía Antelo Iglesias

Director: Manuel Collado Rodríguez

Titor: Anxo Vidal Figueroa

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

La doctoranda declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis de doctorado.

El grupo de investigación al que está vinculada esta tesis de doctorado es el grupo de Senescencia celular, cáncer y envejecimiento del Instituto De Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, que recibió el apoyo financiero de las siguientes entidades durante la realización de la tesis:

- Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN/AEI/FEDER, UE [PID2021-125479OB-I00])
- Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MCIU/AEI/FEDER, UE [RTI2018-095818-B-I00])
- Axencia Galega de Innovación (GAIN, Xunta de Galicia [IN607D2021/08])

La doctoranda, Lucía Antelo Iglesias, recibió apoyo financiero mediante una *Axuda de apoio á etapa predoutoral*, convocada por la Xunta de Galicia (Consellería de Economía, Emprego e Industria – Axencia Galega de Innovación) en 2020. La financiación proviene de fondos del «Programa de axudas á etapa predoutoral» y está cofinanciada parcialmente por el programa operativo FSE Galicia 2014-2020 (Código del procedimiento: IN606A).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi director de tesis, Manuel Collado, el haberme dado la oportunidad de realizar el Trabajo de Fin de Máster en Investigación Biomédica y esta tesis en el laboratorio. Sin tu apoyo no hubiese sido posible llegar hasta aquí. A Anxo Vidal, mi tutor académico, y a Mela Rivas y sus respectivos laboratorios; gracias por la ayuda a lo largo de estos años.

También quiero agradecer a todas las personas que están actualmente en el laboratorio y a las que han pasado por él desde finales del 2018. Gracias por todo lo que he aprendido de vosotros/as y por los buenos momentos. Me gustaría destacar en especial a Pilar Picillos, no solamente por haberme enseñado tanto en el laboratorio, sino por haberte quedado en mi vida personal.

Thanks to Dr. Scott W. Lowe for receiving me in the laboratory at MSKCC, I enjoyed the experience a lot and I felt welcome. Thanks to all the people in the lab, I learned so much from you. En especial, gracias a Almu por tu forma de acogerme, me falicilitaste muchísimo las cosas.

Gustárame tamén agradecer ás profesoras da Facultade de Enfermaría da USC a oportunidade de estar estes anos ao seu lado dando docencia e codirixindo Traballo de Fin de Grao, aprendín moitísimo de vós e alégrame que o futuro da profesión estea nas vosas mans. Foi para min un pracer poder dar clase na Facultade na que comecei a estudar.

A Xulio Maside, Carolina e Luis, que me abriron as portas do laboratorio sendo alumna de Enfermaría e me descubriron o mundo da investigación biomédica, grazas por acompañarme tan ben nos meus primeiros pasos.

Grazas tamén ás miñas dúas familias por todo o apoio que recibín ao longo destes anos, non sei que máis podería pedir.

Ás persoas ás que sempre se avisa para celebrar San Xoán e fins de ano, ademais de todos os días aleatorios nos que nos apetece facer algún plan; moitas grazas por estar aí. Aos das conversacións infinitas, sexan na Mariña de Lugo, en Santiago ou en Ordes; seguiremos informando en próximas entregas, grazas por falar e escoitar.

Á persoa coa que levo compartindo a miña vida uns cantos anos, grazas por acompañarme en cada aventura. Nada me fai máis feliz que o equipo que conseguimos formar.

Por último, grazas a min mesma por tirar sempre para adiante, aínda quedan moitos retos por conseguir.

RESUMEN

Para poder proliferar sin límites, las células de cáncer evitan entrar en senescencia celular, que es un estado de detención del ciclo celular estable en el tiempo. Pese a ello, la quimioterapia puede inducir senescencia en las células tumorales, impidiendo que continúen dividiéndose. Por lo tanto, es necesario estudiar los mecanismos moleculares implicados en este proceso para poder optimizar las terapias contra el cáncer.

En la presente tesis de doctorado se ha caracterizado la inducción de senescencia en líneas celulares de cáncer mediante el tratamiento con quimioterápicos que provocan daño en el ADN. Debido a que las proteínas p53, p21^{WAF1/CIP1} y retinoblastoma están implicadas en la inducción de senescencia tras el daño en el ADN, se estudió el papel de cada una de ellas. Con esta finalidad, se modificaron genéticamente líneas celulares de cáncer para reducir la expresión de estas proteínas. Si bien la reducción de la expresión de p53 o retinoblastoma no afectó a la inducción de senescencia, la ausencia de p21^{WAF1/CIP1} antes o después de la quimioterapia provocó la aparición de muerte celular. Un porcentaje reducido de células que dejan de expresar la proteína p21^{WAF1/CIP1} antes o después de la quimioterapia permanece viable y muestra marcadores de senescencia. Algunos de los quimioterápicos estudiados eran responsables de una respuesta adicional cuando la ausencia de p21^{WAF1/CIP1} se producía antes del tratamiento, una parte de las células supervivientes continuaba proliferando.

Este trabajo enfatiza la importancia de estudiar las vías moleculares implicadas en la respuesta a la quimioterapia, ya que la ausencia de p21^{WAF1/CIP1} podría ser responsable de que el resultado de la terapia contra el cáncer sea insatisfactorio.

RESUMO

Para poder proliferar sen límites, as células de cancro evitan entrar en senescencia celular, que é un estado de detención do ciclo celular estable no tempo. A pesar disto, a quimioterapia pode inducir senescencia nas células tumorais, impedindo que continúen dividíndose. Polo tanto, é necesario estudar os mecanismos moleculares implicados neste proceso para poder optimizar as terapias contra o cancro.

Na presente tese de doutoramento, caracterizouse a indución de senescencia en liñas celulares de cancro mediante o tratamento con quimioterápicos que provocan dano no ADN. Debido a que as proteínas p53, p21^{WAF1/CIP1} e retinoblastoma están implicadas na indución de senescencia tras o dano no ADN, estudouse o papel de cada unha delas. Con esta finalidade modificáronse xenéticamente liñas celulares de cancro para reducir a expresión destas proteínas. Se ben a redución da expresión de p53 ou retinoblastoma non afectou á indución de senescencia, a ausencia de p21^{WAF1/CIP1} antes ou despois da quimioterapia provocou a aparición de morte celular. Unha porcentaxe reducida das células que deixan de expresar a proteína p21^{WAF1/CIP1} antes ou despois da quimioterapia permanece viable e amosa marcadores de senescencia. Algúns dos quimioterápicos estudados eran responsables dunha resposta adicional cando a ausencia de p21^{WAF1/CIP1} se producía antes do tratamento, unha parte das células superviventes continuaba proliferando.

Este traballo salienta a importancia de estudar as vías moleculares implicadas na resposta á quimioterapia, xa que a ausencia de p21^{WAF1/CIP1} podería ser responsable de que o resultado da terapia contra o cancro sexa insatisfactorio.

ABSTRACT

In order to proliferate without limits, cancer cells avoid entering cellular senescence, which is a state characterized by a stable cell cycle arrest. Despite this, chemotherapy can induce cellular senescence in tumor cells, preventing them from continuing to divide. Therefore, it is necessary to study the molecular mechanisms involved in this process to optimize therapies against cancer.

In this doctoral thesis, the induction of senescence in cancer cell lines has been characterized after chemotherapy treatments with agents that damage the DNA. Because p53, p21^{WAF1/CIP1} and retinoblastoma are involved in the induction of senescence after DNA damage, the role of each of them was studied. To this end, cancer cell lines were genetically modified to downregulate the expression of these proteins. While reducing the expression of p53 or retinoblastoma did not affect senescence induction, the absence of p21^{WAF1/CIP1} before or after chemotherapy caused cell death. A small percentage of cells lacking p21^{WAF1/CIP1} expression before or after chemotherapy remained viable and presented markers of senescence. Some of the chemotherapies used triggered an additional response when p21^{WAF1/CIP1} was absent before the treatment, a portion of the surviving cells continued to proliferate.

This work emphasizes the relevance of studying the molecular pathways involved in chemotherapy response, since the absence of p21^{WAF1/CIP1} could be responsible for an unsatisfactory result of cancer treatment.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN	5
1 CARACTERÍSTICAS DE LA SENESCENCIA CELULAR.....	7
1.1 DETENCIÓN ESTABLE DEL CICLO CELULAR.....	7
1.2 CAMBIOS CELULARES	7
1.3 FENOTIPO SECRETOR ASOCIADO A SENESCENCIA	8
1.4 RESISTENCIA A APOPTOSIS	8
1.5 OTRAS CARACTERÍSTICAS.....	9
2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE SENESCENCIA CELULAR	10
3 PAPEL DE LA SENESCENCIA CELULAR EN EL ORGANISMO	12
3.1 SENESCENCIA CELULAR Y DESARROLLO	12
3.2 SENESCENCIA CELULAR Y REGENERACIÓN O REPARACIÓN TISULAR.....	12
3.3 SENESCENCIA CELULAR Y ENVEJECIMIENTO	12
3.4 SENESCENCIA CELULAR Y CÁNCER	13
4 TIPOS DE SENESCENCIA CELULAR	14
4.1 SENESCENCIA REPLICATIVA.....	14
4.2 SENESCENCIA INDUCIDA POR ONCOGENES	15
4.3 SENESCENCIA INDUCIDA POR INACTIVACIÓN DE SUPRESORES TUMORALES	16
4.4 SENESCENCIA INDUCIDA POR TERAPIA	16
OBJETIVOS.....	21
METODOLOGÍA.....	25
1 CULTIVOS CELULARES	27
2 TRANSDUCCIÓN RETROVIRAL Y LENTIVIRAL	27
2.1 OBTENCIÓN DE LOS VECTORES PLASMÍDICOS	27
2.2 PLÁSMIDOS UTILIZADOS.....	27
2.3 TRANSFECCIÓN CELULAR.....	28
2.4 TRANSDUCCIÓN CELULAR	28
3 TRATAMIENTOS	29
3.1 SELECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES.....	29
3.2 INDUCCIÓN DE SENESCENCIA CON QUIMIOTERAPIA.....	29
3.3 TRATAMIENTO CON MEDIOS CONDICIONADOS	29
3.4 ELIMINACIÓN SELECTIVA DE CÉLULAS SENESCENTES	29
3.5 ACTIVACIÓN DEL VECTOR INDUCIBLE	30
3.6 INHIBICIÓN DE CDK4 Y CDK6	30
4 TINCIÓN CRISTAL VIOLETA.....	30
5 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR	30
5.1 CONTAJE DEL NÚMERO DE CÉLULAS.....	30

5.2 ENSAYO DE CLONOGENICIDAD	30
6 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.....	30
6.1 ENSAYO CON MTT	30
6.2 PRESTOBLUE™	31
6.3 AZUL DE TRIPANO	31
7 DETECCIÓN DE MARCADORES DE APOPTOSIS	31
7.1 DETECCIÓN DE APOPTOSIS.....	31
7.2 INHIBICIÓN DE APOPTOSIS	32
8 TINCIÓN β-GALACTOSIDASA ASOCIADA A SENESCENCIA	32
9 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO	32
9.1 EXTRACCIÓN DE ARN	32
9.2 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO	32
9.3 PCR CUANTITATIVA	32
10 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	33
10.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	33
10.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	34
10.3 ELECTROFORESIS.....	34
10.4 TRANSFERENCIA	34
10.5 BLOQUEO E INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS.....	34
10.6 DETECCIÓN MEDIANTE QUIMIOLUMINISCENCIA	35
11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
12 REPRESENTACIÓN GRÁFICA	35
RESULTADOS.....	37
1 PAPEL DE P53, P21 Y RB EN LA INDUCCIÓN DE SENESCENCIA CON BLEOMICINA.....	39
1.1 INDUCCIÓN DE SENESCENCIA CON BLEOMICINA	39
1.2 PAPEL DE P53 EN LA INDUCCIÓN DE SENESCENCIA CON BLEOMICINA.....	41
1.3 PAPEL DE P21 EN EL MANTENIMIENTO DE LA SENESCENCIA INDUCIDA CON BLEOMICINA	41
1.4 PAPEL DE RB EN LA INDUCCIÓN DE SENESCENCIA CON BLEOMICINA	45
2 EFECTO DE LA AUSENCIA DE P21 ANTERIOR O POSTERIOR AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA.....	50
2.1 AUSENCIA DE P21 ANTERIOR AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA.....	50
2.2 AUSENCIA DE P21 POSTERIOR AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA..	58
3 CARACTERIZACIÓN DE SENESCENCIA CELULAR TRAS QUIMIOTERAPIA EN CÉLULAS QUE NO EXPRESAN P21.....	60
3.1 MARCADORES DE SENESCENCIA TRAS QUIMIOTERAPIA EN CÉLULAS QUE NO EXPRESAN P21	60
3.2 MARCADORES DE SENESCENCIA EN CÉLULAS SENESCENTES A LAS QUE SE REDUCEN LOS NIVELES DE P21.....	60

3.3 ESTABILIDAD DE LA DETENCIÓN DEL CICLO CELULAR	66
3.4 RESPUESTA DE LAS CÉLULAS P21 KO SUPERVIVIENTES A BLEOMICINA..	67
DISCUSIÓN	75
1 PAPEL DE P53, P21 Y RB EN LA INDUCCIÓN DE SENESCENCIA CON BLEOMICINA	77
1.1 PAPEL DE P53 EN LA INDUCCIÓN DE SENESCENCIA CON BLEOMICINA	77
1.2 PAPEL DE P21 EN EL MANTENIMIENTO DE LA SENESCENCIA INDUCIDA CON BLEOMICINA	78
1.3 PAPEL DE RB EN LA INDUCCIÓN DE SENESCENCIA CON BLEOMICINA.....	78
2 EFECTO DE LA AUSENCIA DE P21 ANTERIOR Y POSTERIOR AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA	79
3 CARACTERIZACIÓN DE SENESCENCIA CELULAR TRAS QUIMIOTERAPIA EN CÉLULAS QUE NO EXPRESAN P21	81
3.1 MARCADORES DE SENESCENCIA EN CÉLULAS QUE NO EXPRESAN P21.....	81
3.2 ESTABILIDAD DE LA DETENCIÓN DEL CICLO CELULAR	81
3.3 RESPUESTA DE LAS CÉLULAS P21 KO SUPERVIVIENTES AL TRATAMIENTO CON BLEOMICINA	84
CONCLUSIONS	85
BIBLIOGRAFÍA	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ATM	ataxia telangiectasia mutada
ATR	relacionada con ataxia telangiectasia y Rad3
CCL20	ligando de quimiocinas CC de tipo 20
CDK4	quinasa dependiente de ciclina 4
CDK6	quinasa dependiente de ciclina 6
CDKs	quinasas dependientes de ciclinas
CHK1	quinasa del punto de control 1
CHK2	quinasa del punto de control 2
Control	vector utilizado como control. Dependiendo del experimento, puede corresponderse con el vector pRetroSuper-Blast-EV, pLKO.1-puro Non-Mammalian shRNA Control o lentiCRISPRv2 hygro.
GAPDH	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
IL6	interleuquina 6
IL8	interleuquina 8
MC	medio condicionado
MDM2	<i>murine doble minute 2</i>
MMP1	matriz-metaloproteinasas 1
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
p21 KO	vector CDKN1A sgRNA
p21 KO SV	células con el vector CDKN1A sgRNA que sobreviven al tratamiento con Bleomicina
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RB	retinoblastoma
RIPA	radio-inmunoprecipitación
SASP	fenotipo secretor asociado a senescencia
SABG	actividad β -galactosidasa asociada a senescencia
SERPINE1	gen que codifica al activador del plasminógeno 1
shp21	vector LT3GEPiR-shp21
shp53	vector pRetroSuper-Blast-shp53
shRB-1	vector pLKO-RB1-shRNA19
shRB-2	vector pLKO-RB1-shRNA63

INTRODUCCIÓN

1 CARACTERÍSTICAS DE LA SENESCENCIA CELULAR

La senescencia celular se caracteriza por una detención del ciclo celular que es estable en el tiempo, de forma que las células que entran en senescencia dejan de dividirse (Gorgoulis *et al.*, 2019). Las células senescentes presentan una serie de cambios que se consideran distintivos de la senescencia celular y se usan como marcadores del estado senescente. Debido a que no existe un marcador específico y único de células senescentes, se recomienda evaluar distintos marcadores para identificarlas. Seguidamente se detallan las características de la senescencia, que no son universales para todas las células, ya que el fenotipo senescente es muy heterogéneo.

1.1 DETENCIÓN ESTABLE DEL CICLO CELULAR

La senescencia celular es un estado en el que la célula pierde la capacidad para dividirse, lo que hace que una de las características de estas células sea la ausencia de proliferación, que se usa como marcador del proceso. Por una parte, se puede medir la capacidad de las células para dividirse y formar colonias y, por otra parte, es posible detectar la tasa de síntesis de ADN utilizando ensayos en los que se incorpora BrdU o EdU al mismo (Hernandez-Segura *et al.*, 2018). Aparte de la senescencia, hay otros estados celulares en los que la célula no se divide. Las células quiescentes pueden volver a entrar en el ciclo celular si reciben señales para hacerlo, cualidad que las diferencia de las células senescentes, que han perdido la capacidad para dividirse aunque reciban estos estímulos. Otro estado en el que las células dejan de dividirse es la diferenciación terminal, que implica un cambio de la identidad original para adquirir nuevas funciones (He y Sharpless, 2017).

Debido a que la falta de proliferación no es exclusiva de las células senescentes, existen otros métodos para identificarlas como la medición de los niveles de expresión de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), especialmente p16^{INK4a} y p21^{WIP1/CIP1} (p21). Estos inhibidores se acumulan habitualmente en las células senescentes para impedir la progresión del ciclo celular (Gorgoulis *et al.*, 2019) y su expresión ectópica en fibroblastos induce senescencia (Coppé *et al.*, 2011), lo que justifica que se utilicen como identificadores de este estado. La expresión de p16^{INK4a} es la que se utiliza con mayor frecuencia al considerarse más específica, pero se ha visto que este marcador no se expresa en todas las células senescentes y que también se puede expresar en células no senescentes, lo que justifica la necesidad de fijarse en otras características (Gorgoulis *et al.*, 2019).

1.2 CAMBIOS CELULARES

Las células senescentes *in vitro* presentan una morfología agrandada y su forma es irregular (Hernandez-Segura *et al.*, 2018). El tamaño de estas células también está aumentado en ratones envejecidos (Biran *et al.*, 2017). Además, las células senescentes pierden una proteína estructural que forma parte de la lámina nuclear, Lámina B1 (Freund *et al.*, 2012). Esto resulta en la aparición de fragmentos de cromatina en el citoplasma (Ivanov *et al.*, 2013) y en la redistribución de la heterocromatina constitutiva en focos de heterocromatina asociados a senescencia (Sadaie *et al.*, 2013). La formación de estos focos no se ve en todos los tipos de senescencia, así que no se utiliza como marcador de forma común. La pérdida de Lámina B1 sí que se utiliza habitualmente para identificar a las células senescentes (Hernandez-Segura *et al.*, 2018).

Las mitocondrias son más abundantes, aunque son menos funcionales; y sus alteraciones pueden inducir senescencia. De forma similar, los lisosomas son más numerosos, aumentan de tamaño y también son disfuncionales (Gorgoulis *et al.*, 2019). La forma de las mitocondrias y la medición del potencial de membrana de las mitocondrias se pueden usar como marcadores de senescencia. Por otra parte, el aumento de los lisosomas resulta en una mayor cantidad de la enzima lisosomal β -Galactosidasa, que permite que se detecte la actividad lisosomal incluso a un pH subóptimo de 6,0 (Dimri *et al.*, 1995). Esto hace que la tinción β -Galactosidasa asociada a senescencia (SA β G) sea uno de los marcadores de senescencia más utilizados (Hernandez-Segura *et al.*, 2018). La acumulación de lipofuscina, que se puede detectar mediante la unión del tinte negro de Sudán B o su análogo GL13, también se usa para detectar a las células senescentes (Georgakopoulou *et al.*, 2013; Evangelou *et al.*, 2017).

1.3 FENOTIPO SECRETOR ASOCIADO A SENESCENCIA

Las células senescentes presentan un fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) que está compuesto por proteasas, factores solubles (interleuquinas, citoquinas inflamatorias o factores de crecimiento) y proteínas insolubles. Entre las proteasas destacan los miembros de la familia de las metaloproteinasas de matriz extracelular como MMP1 o los reguladores de la vía de la activación de plasminógeno como el inhibidor del activador del plasminógeno 1, codificado por el gen *SERPINE1*. Entre los factores solubles destacan interleuquina 6 (IL6), interleuquina 1 α , interleuquina 1 β , interleuquina 8 (IL8) o el ligando de quimiocinas CC de tipo 20 (CCL20) (Coppé *et al.*, 2010). La composición del SASP es dinámica y también varía sensiblemente en función del tipo celular o el origen de la inducción de senescencia. Factores del SASP como IL6 se expresan en otros contextos formando parte de la respuesta inflamatoria, con lo cual no son exclusivos de las células senescentes. Esto no impide que el SASP se considere un marcador de células senescentes, aunque su detección debe ir siempre acompañada de otros indicadores de senescencia (Sharpless y Sherr, 2015; Gorgoulis *et al.*, 2019). El SASP puede reforzar el estado senescente en las propias células que lo secretan, lo que se conoce como senescencia autocrina, o inducir senescencia en otras células vecinas, lo que se denomina senescencia paracrina (Wajapeyee *et al.*, 2008; Coppé *et al.*, 2010; Kuilman *et al.*, 2010; Acosta *et al.*, 2013).

1.4 RESISTENCIA A APOPTOSIS

La apoptosis es una forma de muerte celular programada que, al igual que la senescencia celular, tiene un papel en el desarrollo del organismo. También puede producirse como respuesta tras la recepción de algún tipo de daño por parte de la célula (Childs *et al.*, 2014). Para que la apoptosis tenga lugar, las proteínas que favorecen la supervivencia han de ser neutralizadas y las proteínas que favorecen la apoptosis deben ser activadas (Czabotar *et al.*, 2014). Las células senescentes activan factores que promueven la supervivencia (Hernandez-Segura *et al.*, 2018) y se ha visto que la disminución de BCL-2, que es una proteína anti-apoptótica, aumenta la sensibilidad de las células senescentes a la inducción de apoptosis. Por este motivo, es posible eliminar selectivamente a las células senescentes mediante la inhibición de las proteínas anti-apoptóticas BCL-2, BCL-XL y BCL-W utilizando ABT263, también conocido como Navitoclax, o ABT737 (Chang *et al.*, 2016; Yosef *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016). Los compuestos que eliminan específicamente a estas células se denominan senolíticos (Zhu *et al.*, 2015).

1.5 OTRAS CARACTERÍSTICAS

Debido a que la detección de daño en el ADN provoca una respuesta que puede desencadenar la inducción de senescencia, es habitual que las células senescentes presenten un aumento de los niveles de la variante X de la histona de la familia H2A fosforilada (P- γ H2AX) o de la proteína p53 fosforilada, que se pueden utilizar como marcadores de daño en el ADN (Sharpless y Sherr, 2015; Hernandez-Segura *et al.*, 2018).

Adicionalmente, las células senescentes también pueden presentar resistencia a su eliminación por parte de las células inmunes expresando Dcr2 (Sagiv *et al.*, 2013), cuya sobreexpresión se puede utilizar también como marcador de senescencia (Collado *et al.*, 2005).

Seguidamente se esquematiza las características principales de las células senescentes (**Figura 1**).

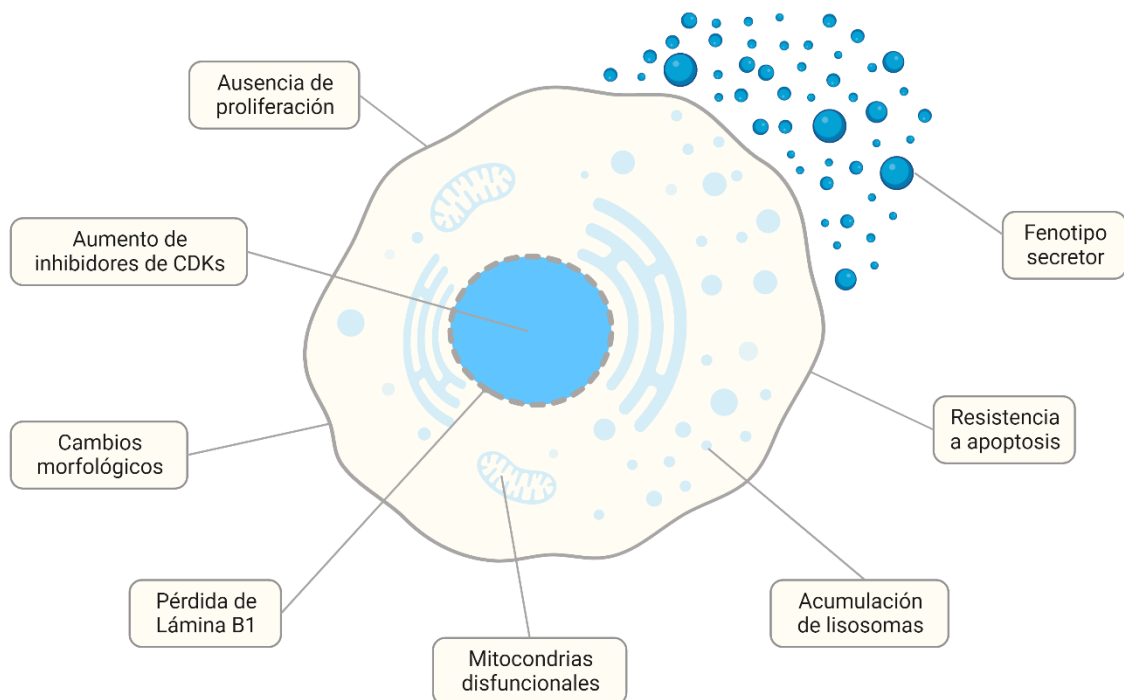


Figura 1. Características de las células senescentes. Las células senescentes presentan particularidades que las distinguen de otras células, como son la ausencia de proliferación debida al aumento de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), el agrandamiento del tamaño celular, la pérdida de lámina B1, el aumento y disfunción de mitocondrias y lisosomas, la resistencia a apoptosis y un fenotipo secretor asociado a senescencia. Creada utilizando Biorender.com.

2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE SENESCENCIA CELULAR

Para entender los mecanismos moleculares que sustentan la senescencia celular, primero es necesario describir el proceso mediante el cual una célula se divide para dar lugar a dos células idénticas. Con esta finalidad, es preciso que se replique el material genético durante la denominada fase de síntesis o fase S y que este material se divida en la fase de segregación del contenido celular o fase M. Este proceso está regulado de múltiples formas para asegurarse de que las fases previas a la división celular se están desarrollando adecuadamente. Principalmente, la regulación ocurre antes y después de la fase S, en dos intervalos designados como fase G1 y fase G2, respectivamente. La célula puede terminar el proceso de división celular si supera los puntos de control de forma favorable. En este momento, se puede producir una nueva entrada en el ciclo celular o una salida del ciclo para entrar en la fase G0. La mayoría de las células del organismo adulto se encuentran en fase G0, en la cual no pueden dividirse. Para hacerlo, tienen que volver a entrar en fase G1 (**Figura 2**) (Matthews *et al.*, 2022).

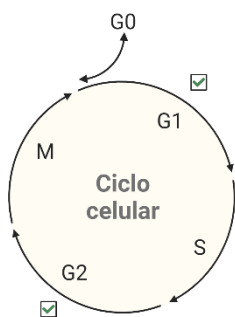


Figura 2. Esquema del ciclo celular. Las células pueden entrar en fase G0 tras dividirse, saliendo del ciclo celular. Este proceso es reversible, lo que se indica en la figura mediante una flecha con doble punta. Si la célula vuelve a entrar en el ciclo celular, primero tendrá que pasar por la fase G1, en la que hay una serie de controles establecidos, que se señalan mediante una marca dentro de un cuadrado. Superados los controles, la célula pasará por la fase S y, al finalizar esta, entrará en la fase G2. En esta fase también tendrá que superar controles para poder entrar a continuación en la fase M, en la cual se producirá la segregación del contenido celular, dando paso a dos células idénticas. Creada utilizando Biorender.com.

Las señales que fomentan la división celular inician la actividad de las CDKs y las ciclinas a las que se unen, que tienen un papel principal en el avance del ciclo celular. En primer lugar, para que se produzca la entrada en la fase G1, se debe acumular el complejo formado por ciclina D y CDK4 o CDK6. Este complejo está encargado de fosforilar a la proteína RB o a las proteínas p107 y p130, que pertenecen a la misma familia. La fosforilación libera, al menos parcialmente, al factor de transcripción E2F, permitiendo que se exprese ciclina E. El complejo formado por ciclina E y CDK2 fosforila todavía más a las proteínas que limitan a E2F. Esto provoca que el factor de transcripción E2F se libere completamente y que se expresen los genes que dependen de él, favoreciendo la progresión del ciclo celular. Posteriormente se produce la degradación de ciclina E y se acumulan los complejos formados por ciclina A y CDK2, lo que posibilita la entrada en la fase S. Para que el ciclo celular pueda continuar avanzando, la fosfatasa CDC25 debe impedir la inhibición de CDK1 provocada por las quinasas WEE1 y MYT1. Cuando no está inhibida, CDK1 se debe unir primero a ciclina A y luego a ciclina B, que se acumulan gradualmente. Esto determina el avance del ciclo celular por las fases G2 y M (**Figura 3**) (Otto y Sicinski, 2017; Matthews *et al.*, 2022).

La inducción de senescencia requiere de la detención de este proceso mediante la inhibición de CDKs. Por una parte, las roturas de doble cadena que pueden ocurrir durante la división celular ocasionan una respuesta de daño al ADN que enlentece o detiene el ciclo celular con la finalidad de reparar los desperfectos. La detección del daño en el ADN activa a la quinasa ataxia telangiectasia mutada (ATM). A su vez, esta activa a la quinasa del punto de control 2 (CHK2) y esta al supresor de tumores p53. p53 facilita la transcripción de p21, que es un inhibidor de CDKs que inhibe principalmente a CDK2, impidiendo la entrada de la célula en fase S. Aparte de inhibir a CDK2, p21 también puede inhibir a CDK1, con lo cual el ciclo celular se detendría en las fases S o G2. Por otra parte, CHK2 degrada a CDC25 en las fases S y G2, lo que hace

que se inhiba la actividad de CDK1 y se impida la división celular (**Figura 3**) (Ou *et al.*, 2021; Matthews *et al.*, 2022).

En el caso de que se acumule ADN de cadena simple, se activa la quinasa relacionada con ataxia telangiectasia y Rad3 (ATR) y esta activa a la quinasa del punto de control 1 (CHK1), que actúa sobre CDC25 y WEE1 para inhibir a CDK1 y retrasar la división celular hasta que se termine adecuadamente la replicación del material genético, momento en el que se reactivará a CDK1. En caso de que no sea posible reparar el daño, la célula entrará en senescencia (**Figura 3**) (Otto y Sicinski, 2017; Matthews *et al.*, 2022).

El locus *INK4a/ARF* se puede desreprimir, codificando al supresor tumoral ARF, que impide la degradación de p53 y promueve así la inducción de senescencia; y también a p16^{INK4a}, que inhibe a CDK4 y CDK6 (**Figura 3**). Es necesario destacar que hay más miembros de la familia de p16^{INK4a} que también inhiben a CDK4 y CDK6, como son p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}; y que dentro de la familia de p21 hay otros inhibidores de CDK2 y CDK1, como son p27^{KIP1} y p57^{KIP2} (Otto y Sicinski, 2017). Los inhibidores de CDKs que están implicados en mayor medida en la inducción de senescencia son p16^{INK4a} y p21.

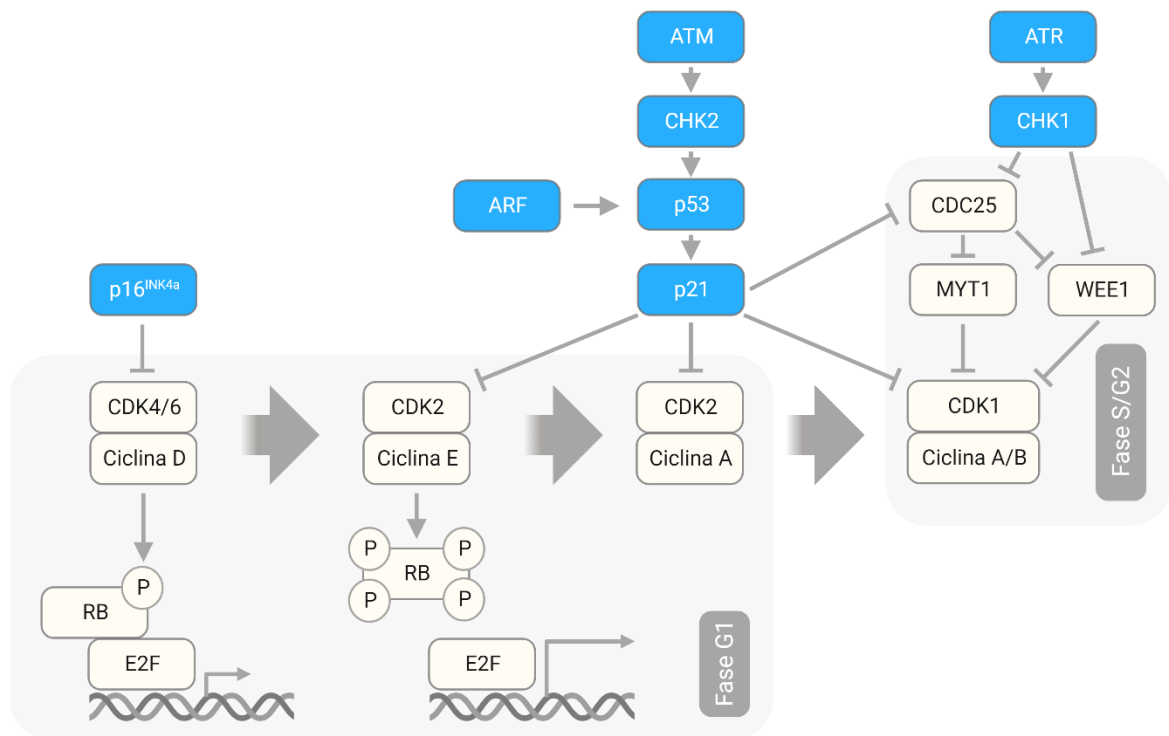


Figura 3. Representación de las vías activadas durante el ciclo celular y la inducción de senescencia. En color claro se indica las vías moleculares que promueven el avance del ciclo celular y en color oscuro las que lo frenan. Las flechas anchas indican la dirección en la que avanza el ciclo celular. Los cuadrados de color gris oscuro indican la fase del ciclo celular. Abreviaturas utilizadas: [ATM]: ataxia telangiectasia mutada; [ATR]: quinasa relacionada con ataxia telangiectasia y Rad3; [CDK]: quinasa dependiente de ciclina; [CHK1]: quinasa del punto de control 1; [CHK2]: quinasa del punto de control 2; [P]: fosforilación; [p21]: p21^{WAF1/Cip1}; [RB]: retinoblastoma. Creada utilizando Biorender.com.

3 PAPEL DE LA SENESCENCIA CELULAR EN EL ORGANISMO

La senescencia se relaciona tanto con procesos fisiológicos como patológicos. Durante la embriogénesis, participa en el desarrollo de los tejidos; mientras que en la edad adulta tiene un importante papel en la regeneración de tejidos dañados, la prevención de la proliferación de células deterioradas y la supresión tumoral (Gorgoulis *et al.*, 2019).

3.1 SENESCENCIA CELULAR Y DESARROLLO

Se han identificado células senescentes en embriones de especies pertenecientes a cuatro de los cinco grandes grupos de animales vertebrados: peces, anfibios, aves y mamíferos (Da Silva-Álvarez *et al.*, 2019). En concreto, se han hallado células senescentes en pez cebra (Villiard *et al.*, 2017), xenopus (Davaapil *et al.*, 2017), ajolote (Davaapil *et al.*, 2017; Villiard *et al.*, 2017), pollo (Storer *et al.*, 2013; Gibaja *et al.*, 2019), codorniz (Nacher *et al.*, 2006), ratón (Muñoz-Espín *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013; Gibaja *et al.*, 2019) y humano (Muñoz-Espín *et al.*, 2013); lo que demuestra que este mecanismo está conservado evolutivamente. En embriones humanos, las células senescentes se encuentran en el saco endolinfático del oído interno y en el mesonefros, que es el riñón embrionario (Muñoz-Espín *et al.*, 2013). En ratones se han identificado células senescentes en estas estructuras, pero también en otras como el tubo neural, las membranas interdigitales o la cola (Muñoz-Espín *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013).

Las células senescentes aparecen de forma programada durante una ventana temporal determinada y luego los macrófagos las eliminan. Las alteraciones del programa de senescencia desencadenan anomalías en el desarrollo de estructuras como el riñón, el saco endolinfático del oído interno y las extremidades; aunque el organismo es capaz de activar mecanismos compensatorios para paliar las consecuencias (Muñoz-Espín *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013). Por consiguiente, la senescencia tiene un papel fisiológico en periodos concretos del desarrollo embrionario y permite que el organismo se desarrolle adecuadamente.

3.2 SENESCENCIA CELULAR Y REGENERACIÓN O REPARACIÓN TISULAR

Las células senescentes también aparecen en los tejidos de forma transitoria al recibir un daño que debe ser reparado (Antelo-Iglesias *et al.*, 2021). La eliminación de las células senescentes afecta negativamente a la regeneración de las aletas de pez cebra (Da Silva-Álvarez *et al.*, 2020), en tanto que la supresión de los macrófagos que rodean a las células senescentes no permite la regeneración de las extremidades en salamandras (Godwin *et al.*, 2013; Yun *et al.*, 2015). En ratones, las células senescentes favorecen la reparación del tejido cutáneo (Demaria *et al.*, 2014), del músculo (Chiche *et al.*, 2017) y del hígado (Krizhanovsky *et al.*, 2008), desempeñando un papel positivo.

Por otra parte, las células senescentes han sido relacionadas con resultados adversos cuando no son eliminadas adecuadamente tras el daño; lo que facilita la aparición de osteoartritis en las articulaciones (Jeon *et al.*, 2017) y fibrosis en el riñón (Li *et al.*, 2021). Por tanto, el papel de la senescencia puede ser beneficioso o perjudicial después de recibir daño, dependiendo de si las células senescentes se encuentran en el tejido dañado de forma temporal o persistente.

3.3 SENESCENCIA CELULAR Y ENVEJECIMIENTO

Se considera a la senescencia celular como uno de los rasgos característicos del envejecimiento (López-Otín *et al.*, 2023) ya que, con el paso del tiempo, las células senescentes se acumulan en el organismo de roedores (Krishnamurthy *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009), primates (Herbig *et al.*, 2006; Jeyapalan *et al.*, 2007) y humanos (Dimri *et al.*, 1995; Chkhotua *et al.*, 2003; Melk *et al.*, 2004; Ressler *et al.*, 2006). La expresión de la proteína p16^{INK4a} aumenta progresivamente en la mayoría de los tejidos del ratón a medida que envejece (Zindy *et al.*,

1997; Krishnamurthy *et al.*, 2004). Concretamente, el aumento del número de células que expresan esta proteína se observa a partir de los 12 meses de edad. La eliminación selectiva de estas células previene la pérdida de peso que ocurre normalmente entre los 12 y los 18 meses, además de retrasar la aparición de enfermedades asociadas al envejecimiento. De esta forma, se atrasa la aparición de cataratas, se reduce la formación de glomérulos escleróticos en el riñón y se mejora la respuesta del corazón al estrés (Baker *et al.*, 2016). También se han identificado células senescentes en tejidos afectados por otras enfermedades asociadas a la edad como son osteoartritis (Price *et al.*, 2002), sarcopenia (Sousa-Victor *et al.*, 2014), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Tsuji *et al.*, 2010), diabetes tipo II (Sone y Kagawa, 2005), aterosclerosis (Childs *et al.*, 2016), Alzheimer (Bhat *et al.*, 2012) o Parkinson (Chinta *et al.*, 2018).

A pesar de que *a priori* podría parecer que las células senescentes tienen un papel perjudicial en el envejecimiento, es necesario tener en cuenta que la inducción de senescencia evita que las células que presentan mutaciones proliferen de forma incontrolada, protegiendo al organismo frente al desarrollo de cáncer. De hecho, los ratones que no expresan la proteína p16^{INK4a} son más propensos a padecerlo (Sharpless *et al.*, 2004). Por este motivo, el programa de senescencia constituye una barrera para la formación de tumores (Narita y Lowe, 2005; Collado y Serrano, 2010).

3.4 SENESCENCIA CELULAR Y CÁNCER

Los estudios parecen indicar que la presencia de células senescentes está restringida a lesiones benignas o premalignas y podría impedir la evolución del tumor hacia la malignidad. Se han identificado células senescentes en lesiones benignas de piel (Michaloglou *et al.*, 2005; Gray-Schopfer *et al.*, 2006), y en tumores premalignos de pulmón (Collado *et al.*, 2005) y próstata (Chen *et al.*, 2005; Majumder *et al.*, 2008). Sin embargo, no se identifican células senescentes en lesiones en un estadio avanzado como son melanomas (Gray-Schopfer *et al.*, 2006), adenocarcinomas de pulmón (Collado *et al.*, 2005) y adenocarcinomas de próstata (Majumder *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que los hepatocitos senescentes premalignos secretan un grupo de factores capaces de reclutar células inmunes para eliminarlos, lo que dificulta el desarrollo de carcinoma hepatocelular (Kang *et al.*, 2011).

Pese a que la existencia de células senescentes parezca beneficiosa en este contexto, es posible que su persistencia tenga efectos adversos, de una forma similar a lo que ocurre en la reparación del daño o en el envejecimiento. Por una parte, el fenotipo secretor puede contribuir a la progresión de los tumores, facilitando su crecimiento y migración (Coppé *et al.*, 2010). Ejemplo de ello son los fibroblastos senescentes, capaces de promover la proliferación de células epiteliales premalignas y malignas (Krtolica *et al.*, 2001); y las células estrelladas hepáticas senescentes, que facilitan el desarrollo de carcinoma hepatocelular (Yoshimoto *et al.*, 2013). Por otra parte, los factores secretados favorecen la transición epitelio-mesénquima y la invasividad de células epiteliales premalignas (Coppé *et al.*, 2008), aparte de estimular la vascularización tumoral (Coppé *et al.*, 2006).

En resumen, la presencia de células senescentes puede limitar el crecimiento tumoral y favorecer la eliminación del cáncer; si bien también existe la posibilidad de que promueva el desarrollo tumoral. Esto depende de lo avanzado que esté el tumor y de la correcta eliminación de las células senescentes, motivo por el cual se está valorando cada vez más su importancia en el microambiente tumoral (Hanahan, 2022).

En la **Figura 4** se resumen las funciones atribuidas a las células senescentes en los distintos contextos biológicos de los que forman parte.

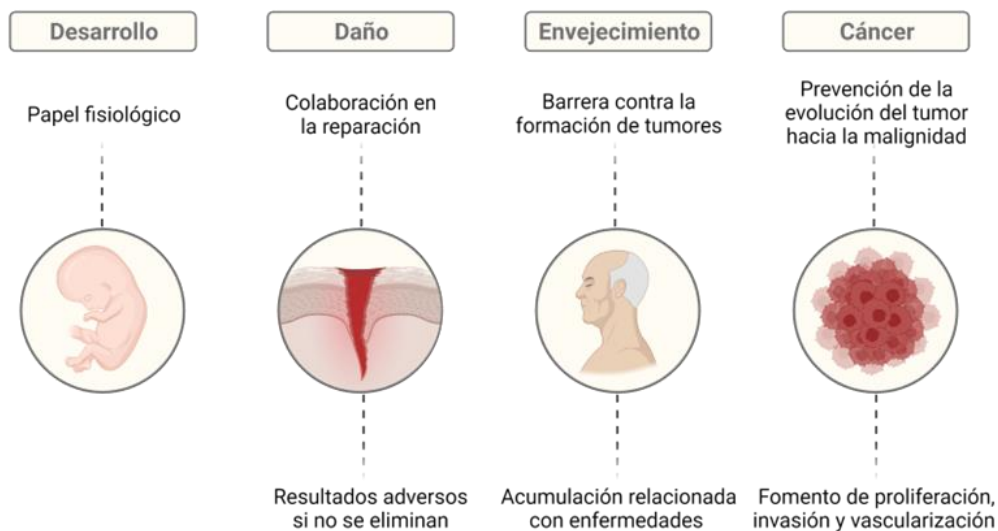


Figura 4. Papel de la senescencia celular en el organismo. Se muestran las distintas funciones biológicas de las células senescentes en cuatro contextos diferentes: desarrollo embrionario, regeneración o reparación de daño, envejecimiento y cáncer. En la parte superior se indican las que son beneficiosas para el organismo y en la parte inferior las que son perjudiciales. Creada utilizando Biorender.com.

4 TIPOS DE SENESCENCIA CELULAR

Conocidas ya las funciones que tiene la senescencia celular en el organismo y su papel beneficioso o perjudicial dependiendo de la situación concreta, surge la pregunta de cuáles son las causas que están detrás de su aparición. En el presente apartado se detallarán los distintos estímulos que pueden inducir senescencia, empezando por el hallazgo que permitió descubrir la existencia de la senescencia celular.

4.1 SENESCENCIA REPLICATIVA

Durante la primera mitad del siglo XX se creía que todas las células eran capaces de proliferar indefinidamente *in vitro* si se cultivaban en el medio idóneo, aunque posteriormente se descubriese que solamente algunos tipos celulares concretos y las células de cáncer tenían esta capacidad. Tanto era así, que la prestigiosa revista *The Journal of Experimental Medicine* rechazó publicar el artículo en el que Leonard Hayflick y Paul Moorhead describían que el mantenimiento de fibroblastos mediante la realización de pases seriados estaba limitado. Este fenómeno recibió el nombre de senescencia replicativa y se caracteriza por un deterioro de las células normales, que terminan por ser incapaces de proliferar tras un número determinado de pases (Hayflick y Moorhead, 1961; Hayflick, 1989).

Las razones por las que esto ocurre se encuentran en el curso de la división celular, ya que las polimerasas encargadas de replicar el ácido desoxirribonucleico (ADN) son incapaces de sintetizar los extremos terminales de las moléculas lineales (Cavalier-Smith, 1974). Como consecuencia, los telómeros, que son secuencias de ADN repetitivas que se encuentran en los extremos de los cromosomas, se van acortando de forma progresiva con cada división (Harley

et al., 1990; De Lange, 2005). Aunque la telomerasa se encarga de alargar estas secuencias (Greider y Blackburn, 1985), en la mayoría de los tejidos adultos su actividad es insuficiente para compensar la pérdida de ADN (Collins y Mitchell, 2002); con lo cual, tras un número de divisiones celulares determinado, los cromosomas se ven tan acortados que desaparecen sus telómeros. Esta pérdida es percibida como daño en el ADN y la célula reacciona entrando en senescencia replicativa (D'Adda Di Fagagna *et al.*, 2003).

La senescencia replicativa se ha interpretado como un envejecimiento de la célula, que detecta que ya está demasiado dañada como para seguir dividiéndose. En línea con esto, la sobreexpresión de telomerasa en la mayoría de los tejidos de ratón, que alarga los telómeros y por tanto dificulta que las células entren en senescencia replicativa, es capaz de aumentar la esperanza de vida y disminuir la incidencia de enfermedades asociadas al envejecimiento. A pesar de ello, la mortalidad aumenta durante el primer año de vida porque los animales presentan una incidencia elevada de tumores (González-Suárez *et al.*, 2005), lo que concuerda con que se vea una activación constante de la telomerasa en la mayoría de los casos de cáncer (Kim *et al.*, 1994; Shay y Bacchetti, 1997). Teniendo en cuenta estos datos, se puede deducir que para que el cáncer se desarrolle, las células tienen que evitar la entrada en senescencia replicativa alargando los telómeros. La inducción de senescencia replicativa limita la proliferación de células que ya se han dividido en numerosas ocasiones, protegiendo al organismo del cáncer y favoreciendo la aparición de enfermedades asociadas a la edad avanzada.

La inducción de senescencia provocada por el acortamiento de los telómeros no es la única forma que tiene el organismo de defenderse de la aparición de cáncer, sino que hay otros inductores que también pueden propiciar la aparición de senescencia.

4.2 SENESCENCIA INDUCIDA POR ONCOGENES

Los oncogenes son genes que han sufrido una mutación que promueve el desarrollo de cáncer. El primer oncogén identificado como inductor de senescencia fue *Hras*^{G12V}, una forma mutada del gen *Hras* (Serrano *et al.*, 1997). Las proteínas codificadas por los genes de la familia *RAS* están encargadas de transmitir señales de los receptores de las células a su interior, promoviendo la división celular cuando se encuentran en su forma activa (Malumbres y Barbacid, 2003). La expresión prolongada del oncogén *Hras*^{G12V} hizo que células normales presentasen características típicas de senescencia replicativa (Serrano *et al.*, 1997). Las células fueron capaces de detectar que el ADN se estaba replicando más de lo normal y activaron la respuesta al daño en el ADN (Di Micco *et al.*, 2006), de forma que optaron por detener de manera estable su proliferación para evitar la aparición de células de cáncer. Se ha descrito una respuesta equiparable expresando altos niveles del mismo oncogén en el epitelio de la mama (Sarkisian *et al.*, 2007). Por otra parte, la expresión del oncogén *Kras*^{G12V}, perteneciente a la misma familia, provoca la aparición de tumores premalignos en el pulmón en los que se puede identificar células senescentes (Collado *et al.*, 2005). La proteína BRAF es un efector de las proteínas RAS (Malumbres y Barbacid, 2003), y también se ha identificado al oncogén *Braf*^{V600E} en tumores pulmonares benignos y lesiones de piel benignas con células senescentes (Michaloglou *et al.*, 2005; Dankort *et al.*, 2007). Así pues, en lesiones benignas o premalignas se han identificado células que entran en senescencia debido a la expresión de oncogenes.

La evidencia apunta a que la respuesta a la expresión de los oncogenes depende de la intensidad de la señal. La expresión de niveles fisiológicos de *Kras*^{G12V} no induce senescencia (Guerra *et al.*, 2003) y, de forma similar, los niveles bajos de *Hras*^{G12V} tampoco lo hacen, sino que promueven la proliferación (Sarkisian *et al.*, 2007). En línea con esto, la expresión de *Braf*^{V600E} a niveles normales participa en la aparición de melanomas (Dhomen *et al.*, 2009).

Estos estudios indican que la expresión de las formas mutadas y activas de estos genes promueve la proliferación; aunque si el nivel de expresión es lo suficientemente elevado, las células identifican la excesiva proliferación como daño en el ADN y entran en senescencia para evitar propagar el daño. La entrada en senescencia como mecanismo de control tumoral también depende en este caso de la ausencia de expresión de otros oncogenes y de la expresión de los genes supresores de tumores, que tienen un papel determinante en la aparición del cáncer.

4.3 SENESCENCIA INDUCIDA POR INACTIVACIÓN DE SUPRESORES TUMORALES

Los genes supresores de tumores codifican proteínas encargadas del control de la división celular, impidiendo la proliferación descontrolada; motivo por el cual su correcto funcionamiento es indispensable. De una forma similar a lo que ocurre con la expresión de los oncogenes, la inactivación de los supresores tumorales también puede ser considerada una amenaza por parte de las células y provocar la inducción de senescencia celular. De manera análoga a la activación de la proteína RAS por la expresión de oncogenes; la inhibición del supresor tumoral NF1, que facilita que la proteína RAS permanezca activa, es capaz de inducir senescencia en fibroblastos humanos. En este sentido, también se han podido identificar células senescentes en los tumores benignos de pacientes que no expresan NF1 (Courtois-Cox *et al.*, 2006).

Paralelamente, la inactivación completa del gen supresor de tumores *Pten* es responsable de la aparición de tumores benignos y senescentes en la próstata. Si además de inactivar por completo *Pten*, también se inactiva el supresor tumoral *p53*, la progresión del tumor se acelera, llegando a ser letal (Chen *et al.*, 2005). En consonancia con lo anterior, la evolución del cáncer hepático provocada por la expresión del oncogén *Hras^{G12V}* en conjunto con la supresión de la expresión de *p53*, se puede detener recuperando la expresión de *p53*. En este caso, el tumor ya formado entra en senescencia y las células inmunes lo eliminan (Xue *et al.*, 2007).

De acuerdo con los datos disponibles, la inducción de senescencia puede actuar previniendo el desarrollo del cáncer o su evolución; siempre y cuando el tumor no active mecanismos que le permitan evitar la entrada en senescencia.

4.4 SENESCENCIA INDUCIDA POR TERAPIA

A pesar de que las células de cáncer son capaces de encontrar vías para obviar las señales inductoras de senescencia, eso no impide que se puedan utilizar estímulos como la radiación ionizante, los agentes quimioterápicos o los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas para forzar su entrada en senescencia.

4.4.1 Radiación ionizante

La radiación ionizante induce senescencia provocando daño en el ADN de células de cáncer de mama (Jones *et al.*, 2005), de pulmón (Suzuki *et al.*, 2001) o del cerebro (Quick y Gerwitz, 2006); aunque también puede hacerlo en células normales (Le *et al.*, 2010; Demaria *et al.*, 2014). La radioterapia se utiliza ampliamente para el tratamiento de distintos tipos de cáncer y, aunque resulta beneficiosa al inducir muerte y/o senescencia en las células de cáncer, la presencia de células normales senescentes en la zona irradiada podría contribuir a los efectos secundarios de esta terapia (Schaue y McBride, 2015).

4.4.2 Agentes quimioterápicos

Los agentes quimioterápicos también se utilizan para controlar el desarrollo del cáncer, generalmente procurando su eliminación. Esto no ocurre en todos los casos, ya que se ha

demostrado que la quimioterapia no solo puede inducir muerte celular, sino también senescencia.

Un ejemplo es el caso de Bleomicina, que provoca roturas de cadena simple y cadena doble del ADN de forma similar a la radiación ionizante, resultando en muerte celular y/o senescencia. Dado que el tratamiento con Bleomicina en pacientes con linfoma o con cáncer de próstata puede afectar negativamente al pulmón (Chen y Stubbe, 2005), se ha investigado su efecto a nivel pulmonar, describiéndose la inducción de senescencia tanto en fibroblastos (Robles y Adami, 1998) como en la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549 (Aoshiba *et al.*, 2003). En la actualidad, se sigue utilizando Bleomicina para el tratamiento de linfomas y tumores de células germinales, aunque se permanece alerta para detectar posibles alteraciones pulmonares (Watson *et al.*, 2018). Además, se utiliza la administración intratraqueal de Bleomicina en ratones como modelo de fibrosis pulmonar idiopática, ya que se ha descrito que los pulmones de estos pacientes presentan marcadores de senescencia y este modelo recapitula las características de la enfermedad (Schafer *et al.*, 2017).

Otro agente quimioterápico con la capacidad de inducir senescencia es Doxorubicina, que se intercala en el ADN e impide su reparación por parte de las topoisomerasas; de modo que se termina desencadenando una respuesta de daño al ADN (Thorn *et al.*, 2011). Este quimioterápico ha sido capaz de provocar la entrada en senescencia en líneas celulares de cáncer de mama (Elmore *et al.*, 2002), pulmón (Su *et al.*, 2009), colon (Chang, Xuan, *et al.*, 1999) y fibrosarcoma (Chang, Brounde, *et al.*, 1999).

Las células que reciben el tratamiento con Doxorubicina pueden responder entrando en muerte celular y/o senescencia, aunque también existe la posibilidad de que continúen proliferando. El tratamiento con Doxorubicina a una dosis más alta de la que se utiliza para inducir senescencia provoca la muerte de las células de cáncer de colon, aunque aquellas que sobreviven conservan la capacidad para proliferar (Chang, Xuan, *et al.*, 1999). La diversidad de respuestas de las células de cáncer al tratamiento con Doxorubicina hace necesario ajustar bien las condiciones para obtener los resultados deseados.

Se puede evitar la inducción de senescencia tras el tratamiento con Doxorubicina inactivando al supresor tumoral *p53*. En tales circunstancias, las células de cáncer de colon disminuyen su entrada en senescencia (Chang, Xuan, *et al.*, 1999) y las células de cáncer de mama presentan muerte celular (Elmore *et al.*, 2002). También se ha demostrado que la inhibición de un tipo de muerte concreto, la apoptosis, es responsable de que las células de neuroblastoma entren en senescencia tras el tratamiento con Doxorubicina (Rebbaa *et al.*, 2003). Se podría interpretar que la detección de daño en el ADN por parte de las células de cáncer activa los mecanismos de control de la célula y esta opta por un camino u otro dependiendo de las vías moleculares que se vean involucradas y de la dosis de Doxorubicina.

Con respecto a las células normales, se han identificado marcadores de senescencia como p16^{INK4a} en células sanguíneas de pacientes de cáncer de mama que han recibido Doxorubicina (Sanoff *et al.*, 2014). Por este motivo, se han investigado los efectos del tratamiento con Doxorubicina en ratones con el mismo tipo de cáncer. La eliminación de las células normales del ratón que expresan p16^{INK4a} tras el tratamiento disminuye la formación de metástasis antes y después de la resección quirúrgica del tumor, reduce el tamaño del tumor que vuelve a crecer tras la resección y mejora la supervivencia (Demaria *et al.*, 2017). Es importante tener esto en cuenta, ya que Doxorubicina se utiliza para tratar a pacientes con diversos tipos de cáncer como leucemias, linfomas, mama, pulmón, ovario, tiroides, vejiga o estómago (Sritharan y Sivalingam, 2021); y la inducción de senescencia en el resto del organismo podría favorecer el desarrollo del tumor.

De forma similar a Doxorubicina, el tratamiento con otros inhibidores de topoisomerasas como Mitoxantrona, SN-38, Etopósido y Camptotecina también puede provocar la entrada de las células de cáncer en senescencia. El tratamiento con Mitoxantrona aumenta los marcadores de senescencia en células normales y en biopsias de pacientes con cáncer de próstata (Coppé *et al.*, 2008). SN-38 y Etopósido inducen senescencia en líneas celulares de cáncer de mama, colon y ovario. Para ello, es necesario que las células de cáncer de colon conserven la capacidad para expresar el supresor tumoral *p53* (te Poele *et al.*, 2002). Las células normales también son susceptibles al tratamiento con Etopósido, que induce senescencia a dosis bajas y apoptosis a dosis altas (Probin *et al.*, 2006). De igual modo, las células de glioblastoma tratadas con SN-38 (Wang *et al.*, 2004) y las células de cáncer de colon tratadas con Camptotecina (Han *et al.*, 2002) responden entrando en senescencia si la dosis es baja y en apoptosis si la dosis es alta o si se combinan una dosis baja con la ausencia de *p53*. De esta forma, el tratamiento con una dosis baja de los inhibidores de topoisomerasas puede inducir senescencia siempre y cuando el supresor tumoral *p53* se exprese. Las células entrarán en muerte celular cuando *p53* no esté presente o la dosis sea demasiado alta.

Los agentes alquilantes, que también son quimioterápicos, pueden inducir senescencia de un modo similar. Su mecanismo de acción consiste en formar enlaces entre átomos del ADN; de forma que las zonas que presentan estos enlaces se pueden romper durante la replicación del ADN, dando lugar a una respuesta de daño al ADN. Dentro de este grupo se encuentran Cisplatino, Temolozomida, Mitomicina C o Ciclofosfamida. Cisplatino induce senescencia en células de fibrosarcoma (Chang, Xuan, *et al.*, 1999), cáncer de ovario (Li *et al.*, 2014; Nakayama *et al.*, 2017), cáncer hepático (Qu *et al.*, 2014) o melanoma (Sun *et al.*, 2018); mientras que Temolozomida provoca la entrada en senescencia en células de glioblastoma (Knizhnik *et al.*, 2013) o melanoma (Mhaidat *et al.*, 2007); y Mitomicina C induce senescencia en células de cáncer de pulmón (McKenna *et al.*, 2012). La inducción de senescencia en ratones con cáncer de pulmón tratados con Cisplatino depende de *p53* (Ge *et al.*, 2012), al igual que en ratones con linfoma tratados con Ciclofosfamida (Schmitt *et al.*, 2002).

El tratamiento con Cisplatino o su análogo Carboplatino en cáncer de pulmón no microcítico metastásico se combina en la clínica con Gemcitabina o taxanos (Duma *et al.*, 2019). Gemcitabina afecta de distintas formas a la replicación del ADN. Por una parte, puede inhibir a varias enzimas que participan en la síntesis del ADN y, por otra parte, puede unirse a la cadena de ADN y detener su formación (Song *et al.*, 2016). Este fármaco también se utiliza en solitario para el tratamiento del cáncer de páncreas y se ha descrito que es capaz de inducir senescencia en líneas celulares de este tipo de cáncer (Modrak *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2016).

Por otra parte, el mecanismo de acción de los taxanos consiste en estabilizar los microtúbulos, que son necesarios para separar los cromosomas durante la división celular, entre otras funciones. La estabilización de los microtúbulos puede resultar en muerte, detención del ciclo celular o progreso de las divisiones celulares. El taxano Paclitaxel se utiliza para el tratamiento de cáncer de mama (Mikuła-Pietrasik *et al.*, 2019) y es capaz de inducir senescencia en la línea celular de cáncer de mama MCF7 (Hu *et al.*, 2016; Khongkow *et al.*, 2016), además de en fibroblastos (Khongkow *et al.*, 2016) y células vasculares endoteliales (Ota *et al.*, 2009). El taxano Docetaxel forma parte de la terapia contra el cáncer de próstata (Mikuła-Pietrasik *et al.*, 2019) e induce senescencia en una línea celular de cáncer de próstata (Schwarze *et al.*, 2005).

En conclusión, existen múltiples terapias que se usan hoy en día en la clínica para el tratamiento del cáncer y que tienen la capacidad de inducir senescencia tanto en las células de cáncer como en las células normales. La evidencia existente *in vitro* e *in vivo* apunta a que hay varios factores que determinan que el tratamiento con agentes quimioterápicos induzca senescencia u otras respuestas distintas; lo que hace necesario entender en profundidad los mecanismos que subyacen a la inducción de senescencia con quimioterapia para tratar de utilizarla únicamente cuando sea ventajosa. A continuación, se muestra una clasificación de los quimioterápicos descritos previamente, en función del modo en el que inducen senescencia (**Figura 5**).

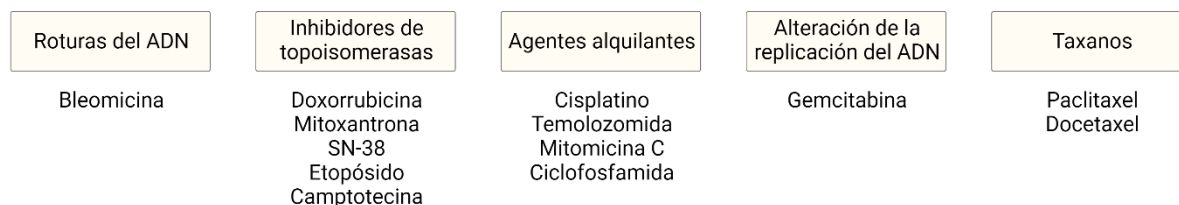


Figura 5. Senescencia inducida por quimioterapia. En este esquema se clasifican los quimioterápicos que se han identificado como inductores de senescencia en función de su mecanismo de acción. En la parte superior se indican los mecanismos de acción y, debajo de cada uno de ellos, los quimioterápicos correspondientes. Creada utilizando Biorender.com.

4.4.3 Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas

Otra terapia que se está utilizando contra el cáncer es la inhibición de la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Palbociclib, Abemaciclib y Ribociclib son inhibidores de CDKs que tienen especial afinidad por CDK4 y CDK6, y que cuentan con aprobación para su uso en pacientes con cáncer de mama avanzado (Cejuela *et al.*, 2023; Palmieri *et al.*, 2023). El mecanismo de acción de los compuestos que inhiben CDKs consiste en impedir la progresión del ciclo celular actuando directamente sobre las vías moleculares implicadas en la división celular.

Palbociclib es capaz de inducir senescencia en líneas celulares de glioblastoma, sarcoma, melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de próstata (Fry *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2016; Muñoz-Espín *et al.*, 2018); y también en tumores derivados de pacientes con glioblastoma (Michaud *et al.*, 2010) y sarcoma (Perez *et al.*, 2015). Abemaciclib lo hace en líneas celulares de cáncer de mama (Torres-Guzmán *et al.*, 2017) y Ribociclib en líneas celulares de leucemia (Tao *et al.*, 2017). Los niveles de CDK4 deben ser elevados para que el tratamiento con Palbociclib limite la velocidad de crecimiento y reduzca el tamaño de los tumores derivados de pacientes con sarcoma (Perez *et al.*, 2015).

Por otra parte, la detención del ciclo celular por parte de los inhibidores de CDKs es responsable de que la proteína retinoblastoma (RB) permanezca activa. Por este motivo, la respuesta al tratamiento también depende de que se exprese la proteína RB (Yoshida y Diehl, 2015). En las líneas celulares de glioblastoma, cáncer de mama y cáncer de pulmón que presentan deleciones del gen *RB*, se ha visto que el tratamiento con Palbociclib no inhibe la proliferación (Fry *et al.*, 2004; Michaud *et al.*, 2010); y aquellas líneas de glioblastoma que responden adecuadamente, dejan de hacerlo cuando se suprime *RB* (Michaud *et al.*, 2010). De esta forma, RB y CDK4 juegan un papel central en la inducción de senescencia mediante inhibidores de CDKs.

A continuación, se indican los inductores de senescencia celular más estudiados clasificados en base al origen de la inducción de senescencia; que puede provenir de estímulos del propio organismo (endógenos) o del exterior (exógenos) (**Figura 6**).

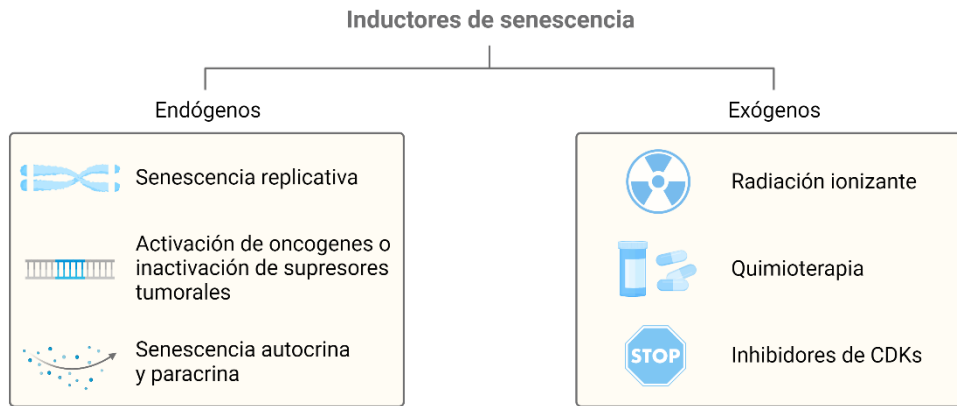


Figura 6. Inductores de senescencia. En la parte izquierda se indican los inductores endógenos y en la parte derecha se indican los inductores exógenos. Creada utilizando Biorender.com.

OBJETIVOS

Las células de cáncer pueden entrar en senescencia celular tras recibir daño en el ADN mediante tratamiento quimioterápico. La respuesta al daño en el ADN está mediada por p53, que activa al inhibidor de CDKs p21 para impedir el avance del ciclo celular. La inhibición de CDKs facilita que la proteína RB permanezca unida al factor de transcripción E2F, contribuyendo a la detención de la proliferación de las células de cáncer.

Con la finalidad de entender mejor este proceso, la presente tesis de doctorado tiene como objetivo principal estudiar el papel de las proteínas p53, p21 y RB en la senescencia inducida por quimioterapia en células de cáncer. Debido a que se ha demostrado que el aumento de p21 es suficiente para desencadenar la inducción de senescencia, resulta de especial interés el estudio del papel de esta proteína.

Los objetivos específicos han sido los siguientes:

1. Evaluar marcadores de senescencia tras tratamiento quimioterápico en células de cáncer con una disminución de la expresión de las proteínas p53, p21 y RB.
2. Estudiar el efecto de la ausencia de p21 anterior y posterior al tratamiento con quimioterapia en células de cáncer.
3. Caracterizar la senescencia celular tras quimioterapia en células de cáncer que no expresan p21.

METODOLOGÍA

1 CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares que se utilizaron en este trabajo fueron A549 (adenocarcinoma de pulmón humano), MCF7 (adenocarcinoma de mama humano) y HEK 293T (células transformadas de riñón embrionario). Estas líneas celulares se conservaron en nitrógeno líquido, resuspendidas en suero fetal bovino (Corning) con un 10% de dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich). Al descongelarlas se resuspendieron en 10 mL del mismo medio en el que se cultivan, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* con una concentración de glucosa de 4500 mg/L (Sigma-Aldrich), suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Corning), un 1% de solución de L-glutamina (Sigma-Aldrich) y un 1% de penicilina y estreptomina (Sigma-Aldrich). Seguidamente se centrifugaron, se resuspendieron en medio de cultivo y se sembraron en placas adherentes (Corning). Se mantuvieron en un incubador a 37°C con un 5% de CO₂ y atmósfera húmeda. Una vez el cultivo estuvo subconfluyente, se disgregaron las células y se sembraron en una nueva placa adherente. Para ello, se aspira el medio de cultivo, se hace un lavado con *buffer* fosfato salino (Sigma-Aldrich) y se añade tripsina (Sigma-Aldrich) a una concentración del 0,25% en *buffer* fosfato salino (Sigma-Aldrich). Se incuban las células con tripsina hasta que se disgregan y se resuspenden en medio de cultivo; tras lo cual se recoge la cantidad adecuada de la suspensión celular y se continúa cultivando las células recogidas, añadiendo el volumen de medio de cultivo necesario y sembrándolas en una nueva placa. Se realizaron test con regularidad para poder detectar posibles contaminaciones con *Mycoplasma*.

2 TRANSDUCCIÓN RETROVIRAL Y LENTIVIRAL

2.1 OBTENCIÓN DE LOS VECTORES PLASMÍDICOS

Se utilizaron bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5 α para la transformación de vectores plasmídicos retrovirales y bacterias *Escherichia coli* de la cepa Stb13 para la transformación de vectores plasmídicos lentivirales. Estas bacterias se descongelaron en hielo y se les añadió 1 μ g del plásmido, tras lo cual permanecieron en hielo durante 20 minutos más y luego se les administró un choque térmico durante 45 segundos a 42°C. Después de 5 minutos en hielo, se añadió medio de cultivo bacteriano Luria-Broth estéril, que está compuesto por triptona al 1% (Becton Dickinson), NaCl al 0,5% (Sigma-Aldrich) y extracto de levadura al 0,5% (Becton Dickinson), disueltos en agua destilada. Se incubaron las bacterias durante 45 minutos a 37°C en agitación para permitir su crecimiento. Finalmente, se sembraron en placas de agar al 1,5% con el antibiótico Ampicilina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 100 μ g/mL. Las placas se introdujeron en un incubador a 37°C durante 16 horas, tras las cuales se recogió una colonia de bacterias. Esta colonia se depositó en un matraz con 200 mL de medio de cultivo bacteriano estéril con Ampicilina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 100 μ g/mL. Se mantuvo este matraz a 37°C durante 16 horas en agitación y al día siguiente se purificó el ADN plasmídico siguiendo las instrucciones del fabricante del kit *Plasmid DNA purification NucleoBond Xtra Midi kit* (Macherey-Nagel). Tras la purificación, se cuantificó el ADN obtenido utilizando el espectrofotómetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific) y solamente se utilizó el ADN si la pureza se encontraba en unos niveles adecuados.

2.2 PLÁSMIDOS UTILIZADOS

A continuación se muestra una tabla con los vectores plasmídicos utilizados en este trabajo (Tabla 1).

Tabla 1. Vectores plasmídicos utilizados en este trabajo

PLÁSMIDO	ORIGEN
pCL-Eco	Addgene (#12371)
pLP1	Invitrogen (ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix)
pLP2	Invitrogen (ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix)
pLP-VSVG	Invitrogen (ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix)
pBabe puro IRES-EGFP	Addgene (#14430)
FUGW	Addgene (#14883)
pRetroSuper-Blast-EV	Cedido por el laboratorio de Reuven Agami
pRetroSuper-Blast-shp53	Cedido por el laboratorio de Reuven Agami
LT3GEPIR-shp21	Cedido por el laboratorio de Scott W. Lowe
pLKO.1-puro Non-Mammalian shRNA Control	Sigma-Aldrich (SHC002)
pLKO-RB1-shRNA19	Addgene (#25640)
pLKO-RB1-shRNA63	Addgene (#25641)
lentiCRISPRv2 hygro	Addgene (#98291)
CDKN1A sgRNA	Addgene (#138189)

2.3 TRANSFECCIÓN CELULAR

Para introducir los plásmidos en las líneas celulares A549 y MCF7 se hizo un paso previo en el que se generaron partículas virales utilizando células HEK 293T. Primeramente se sembraron 5×10^6 células HEK 293T en una placa de 10 centímetros de diámetro. Al día siguiente, se añadieron el plásmido de interés y una mezcla con los plásmidos pCL-ECO y pLP-VSVG en el caso de el vector de interés fuese retroviral; o una mezcla con los plásmidos pLP1, pLP2 y pLP-VSVG en el caso de el vector fuese lentiviral. Los plásmidos adicionales al plásmido de interés son los encargados de formar las partículas virales. Se resuspendieron los plásmidos indicados en 250 μ L de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Sigma-Aldrich), añadiendo un total de 5 μ g de ADN que se distribuyeron equitativamente entre los vectores necesarios. La mezcla de plásmidos se combinó con 250 μ L de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Sigma-Aldrich) a los que se habían incorporado 30 μ g de polietilimina (Polysciences). Se homogeneizaron ambas preparaciones y se incubó la solución resultante durante 10 minutos a temperatura ambiente. Durante esta incubación se renovó el medio de cultivo de las células HEK 293T y luego se añadió la mezcla de plásmidos y polietilimina al medio de cultivo. Después de 16 horas se retiró el medio de la placa, a la que se añadió medio de cultivo fresco tras lavarla con *buffer* fosfato salino (Sigma-Aldrich).

2.4 TRANSDUCCIÓN CELULAR

Pasadas 24 horas tras el paso anterior, se recogió el medio de las células HEK 293T y se filtró a través de un filtro de 0,45 μ m (Jet Biofil) para permitir el paso de las partículas virales y descartar los restos celulares que pueda contener el medio. Se añadió *Polybrene* (Sigma-Aldrich) a una concentración de 8 μ g/mL y luego se agregó este medio a las células A549 o MCF7. Las células A549 y MCF7 se sembraron el día anterior en placas de 10 centímetros de diámetro (Corning) a baja confluencia. Se añadió medio de cultivo fresco a las células HEK 293T para que se siguiesen generando partículas virales y poder añadirlas a las células A549 y MCF7 en otras dos ocasiones separadas por 12 horas. Transcurridas 12 horas desde la última vez en la que se añadieron las partículas virales, se lavaron las células A549 o MCF7 con *buffer* fosfato salino (Sigma-Aldrich) y se añadió medio de cultivo fresco. Para comprobar la eficiencia de la transducción se utilizó el microscopio de fluorescencia *Axio Vert.A1 Microscope* (Zeiss) y el programa *Zen Blue Edition* (Zeiss), ya que aquellas células transducidas

con los plásmidos pBabe puro IRES-EGFP o FUGW deberían expresar la proteína verde fluorescente. De no detectarse señal, esto sería indicativo de que hubo algún problema en la transfección o transducción celular.

3 TRATAMIENTOS

3.1 SELECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Las células A549 transducidas con los vectores pRetroSuper-Blast-EV y pRetroSuper-Blast-shp53 se seleccionaron con Blastidina (Sigma-Aldrich) a una dosis de 10 $\mu\text{g/mL}$. Las células A549 transducidas con los vectores LT3GEPiR-shp21, pLKO.1-puro Non-Mammalian shRNA Control, pLKO-RB1-shRNA19 o pLKO-RB1-shRNA63 se seleccionaron con Puomicina (Sigma-Aldrich) a una dosis de 1 $\mu\text{g/mL}$. Estos tratamientos se mantuvieron durante 9 días, disgregando el cultivo celular cada 3 días para asegurarse de que la confluencia era adecuada, tras lo cual se repitió la dosis de antibiótico. La selección de las células A549 y MCF7 transducidas con los vectores lentiCRISPRv2 hygro y CDKN1A sgRNA se alargó hasta los 12 días, ya que el tratamiento con Higromicina B (Invitrogen) a una dosis de 200 $\mu\text{g/mL}$ no era capaz de eliminar a las células que no habían incorporado el vector hasta ese momento.

3.2 INDUCCIÓN DE SENESCENCIA CON QUIMIOTERAPIA

Para la inducción de senescencia celular se utilizaron los quimioterápicos que se indican en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Quimioterápicos utilizados para inducir senescencia

QUIMIOTERÁPICO	CASA COMERCIAL	DOSIS
Bleomicina	Mylan	20 μM
Cisplatino	Sigma-Aldrich	15 μM
Doxorrubicina	Accord	0,2 μM
Etopósido	Ferrer Farma	2 μM
Gemcitabina	Pfizer	0,1 μM

Se sembró una cantidad conocida de células y, una vez adheridas a la placa, se cambió el medio de cultivo por medio de cultivo al que se había añadido el quimioterápico. El tratamiento tuvo una duración de 5 días en todos los casos.

3.3 TRATAMIENTO CON MEDIOS CONDICIONADOS

Para comprobar la capacidad para inducir senescencia paracrina de las células *in vitro*, se lavaron las células con *buffer* fosfato salino y se añadió medio de cultivo completo. Este medio se mantuvo durante 24 horas para condicionarlo con los factores secretados por las células. Luego se recogió el medio y se centrifugó para descartar los restos celulares que precipitasen. Posteriormente se cultivaron otras células con el medio condicionado (MC) durante dos rondas de 3 días, entre las cuales se hizo un pase de las células tratadas con MC. Al terminar las dos rondas, se comprobaron marcadores de senescencia en las células que recibieron el tratamiento con MC.

3.4 ELIMINACIÓN SELECTIVA DE CÉLULAS SENESCENTES

Para la eliminación selectiva de las células senescentes se utilizó el senolítico Navitoclax (AbbVie) a una concentración de 1 μM durante 24 horas.

3.5 ACTIVACIÓN DEL VECTOR INDUCIBLE

Doxiciclina (Sigma-Aldrich) es un análogo de la Tetraciclina que permite activar el sistema de expresión inducible regulado por el transactivador reverso dependiente de Tetraciclina que contiene el vector LT3GEPiR-shp21. Se utilizó a una concentración de 1 µg/mL durante 6 días, cambiando el medio de cultivo y renovando el tratamiento con Doxiciclina cada 48 horas.

3.6 INHIBICIÓN DE CDK4 Y CDK6

Se utilizó Palbociclib (MedChemExpress) para inhibir a las quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6. La dosis utilizada fue de 5 µM y el tratamiento se alargó hasta los 7 días, renovando el medio de cultivo de las células y añadiendo Palbociclib de nuevo cada 48 horas.

4 TINCIÓN CRISTAL VIOLETA

Para realizar la tinción cristal violeta se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células dos veces con *buffer* fosfato salino. A continuación, se añadió paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences) al 2% en *buffer* fosfato salino y se incubó durante 15 minutos para fijar las células. Pasado este tiempo se retiró la solución de fijación, se lavó en tres ocasiones con *buffer* fosfato salino y se añadió una solución de cristal violeta (Sigma-Aldrich) al 0,05% en *buffer* fosfato salino. Se incubó durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, tras los cuales se retiró la solución y se lavaron los pocillos con agua destilada. Finalmente, se dejaron secar los pocillos por completo. El resultado de esta tinción se utilizó tanto para obtener imágenes de campo claro utilizando el microscopio *Axio Vert.A1 Microscope* (Zeiss) y el programa *Zen Blue Edition* (Zeiss); como para escanear las placas mediante el escáner *CanoScan LiDE 210* (Canon).

5 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

5.1 CONTAJE DEL NÚMERO DE CÉLULAS

Para analizar la proliferación celular se sembró un número conocido de células. Generalmente se sembraron $1,5 \times 10^6$ células en placas de 10 centímetros de diámetro (Corning) y se evaluó cada condición experimental por triplicado en 3 placas independientes. Una vez terminado el tratamiento, se disgregaron las células y se resuspendieron en medio de cultivo para poder contar el número de células y compararlo con el número de células de partida. Los contajes celulares se realizaron utilizando el contador de células automático *LUNA II* (Logos Biosystems).

5.2 ENSAYO DE CLONOGENICIDAD

Una vez terminados los tratamientos correspondientes, se sembraron las células a baja densidad para evaluar su capacidad para proliferar. Se sembraron 5×10^4 células por pocillo en placas de 6 pocillos, a las que se cambió el medio de cultivo cada 3 días. Se sembró cada condición por triplicado. Pasados 14 días, se realizó una tinción cristal violeta. Para digitalizar las placas se utilizó el escáner *CanoScan LiDE 210* (Canon). Para la cuantificación del número de colonias y la determinación de su área se utilizó el programa *ImageJ*.

6 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

6.1 ENSAYO CON MTT

El ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) se basa en la reducción de MTT a cristales de formazán por parte de las células metabólicamente activas, de modo que permite evaluar la viabilidad celular. Se utilizaron placas de 96 pocillos (Falcon) en

las que se sembraron 1×10^3 células por pocillo. Se dejaron los bordes de la placa libres y se sembraron 12 pocillos por condición. Al día siguiente, se añadió MTT (Thermo Fisher Scientific), preparado en *buffer* fosfato salino, que se resuspendió en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Sigma-Aldrich), de forma que en cada pocillo se añadieron 7,5 μg de MTT en 100 μL de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Sigma-Aldrich). Se incubó la placa en oscuridad durante 4 horas a 37°C , tras las cuales se retiró el MTT y se añadieron 100 μL de dimetilsulfóxido para disolver los cristales formados. Se incubó durante 10 minutos en oscuridad y en agitación, y luego se midió la absorbancia a 570 nm utilizando el espectrofotómetro *Epoch2* (Biotek).

El proceso seguido para añadir MTT y luego realizar la lectura se repitió en 4 ocasiones utilizando 4 placas distintas sembradas de forma simultánea. Se realizó la lectura de una de las placas el día 0, para establecer los valores de partida; tras la cual se cambió el medio del resto de placas y se añadieron los tratamientos correspondientes. Se realizó una lectura a los dos días de tratamiento y otra a los 5 días, cuando finalizó el mismo. Una última placa se mantuvo 14 días más, cambiando el medio cada 3 días, para realizar la lectura final a los 19 días.

6.2 PRESTOBLUE™

Otro abordaje para analizar la viabilidad celular se basó en el reactivo *PrestoBlue™* (Invitrogen), que es modificado por el ambiente reductor de las células vivas para adquirir color rojo y fluorescencia. Se sembraron 10 o 12 pocillos por condición, dependiendo del experimento, a los que se añadieron los tratamientos correspondientes. Finalizado el tratamiento, se diluyó el reactivo *PrestoBlue™* 10 veces en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Sigma-Aldrich), alcanzando un total de 100 μL de medio; y se incubó durante 2 horas a 37°C en oscuridad. Se midió la absorbancia a 570 nm utilizando el espectrofotómetro *Epoch2* (Biotek).

6.3 AZUL DE TRIPANO

Se utilizó la solución de azul de tripano 0,4% (Sigma-Aldrich) para evaluar la muerte celular, ya que este colorante solamente puede teñir a las células cuya membrana no está íntegra. Se sembraron 2×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos por triplicado y se añadieron los tratamientos correspondientes. Transcurrido este tiempo, se disgregó el cultivo celular y se resuspendió en medio de cultivo suplementado. Se mezclaron a partes iguales la solución de azul de tripano y la suspensión celular y se evaluó la viabilidad celular utilizando el contador de células automático *LUNA II* (Logos Biosystems).

7 DETECCIÓN DE MARCADORES DE APOPTOSIS

7.1 DETECCIÓN DE APOPTOSIS

Para detectar la inducción de apoptosis se utilizó el reactivo *CellEvent Caspase-3/7 Detection Reagent Green* (Invitrogen), que contiene un tinte unido a un péptido. Cuando la célula contiene caspasa 3/7 activa, esta separa la unión entre el tinte y el péptido, de forma que el tinte se une al ADN y emite fluorescencia. Para utilizarlo, se lavaron las células con *buffer* fosfato salino y se añadió *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Sigma-Aldrich) con el reactivo a una concentración de 4 μM y se incubó durante 30 minutos en oscuridad. Se utilizó el microscopio de fluorescencia *Axio Vert.A1 Microscope* (Zeiss) y el programa *Zen Blue Edition* (Zeiss) para obtener imágenes de campo claro y de fluorescencia. Posteriormente se cuantificó el número de células total y el número de células fluorescentes utilizando el programa *ImageJ* para calcular el porcentaje de células apoptóticas en cada campo.

7.2 INHIBICIÓN DE APOPTOSIS

Se utilizó el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK (MedChemExpress) a una concentración de 20 μ M durante 3 días, renovándolo cada 24 horas, para inhibir la inducción de apoptosis.

8 TINCIÓN β -GALACTOSIDASA ASOCIADA A SENESCENCIA

La actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia se determinó utilizando la tinción SA β G. En primer lugar, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las placas en dos ocasiones con *buffer* fosfato salino. A continuación, se añadió la solución de fijación compuesta por paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences) al 2% y glutaraldehído (Thermo Fisher Scientific) al 0,2% en *buffer* fosfato salino. La fijación tuvo lugar durante 15 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales se retiró la solución de fijación y se lavaron las células en tres ocasiones con *buffer* fosfato salino. Se añadió la solución de tinción, que se prepara en agua destilada con los siguientes reactivos:

- *Buffer* de ácido cítrico (Sigma-Aldrich) y fosfato de sodio dibásico (Sigma-Aldrich) a una concentración de 40 mM en agua destilada y un pH de 6,0.
- NaCl (Sigma-Aldrich) a una concentración de 150 mM en agua destilada.
- K₃Fe(CN)₆ (Sigma-Aldrich) a una concentración de 5 mM en agua destilada.
- K₄Fe(CN)₆ (Sigma-Aldrich) a una concentración de 5 mM en agua destilada.
- MgCl₂ (ACROS ORGANICS) a una concentración de 2 mM en agua destilada.
- 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -Dgalactopiranosido o X-Gal (Thermo Fisher Scientific) a una concentración de 1 mg/mL en dimetilformamida (Sigma-Aldrich).

Se incubó en oscuridad a 37°C durante 16 horas, tras las cuales se retiró la solución de tinción y se lavó en dos ocasiones con agua destilada. Se añadió *buffer* fosfato salino para guardar las placas teñidas a 4°C. Se utilizó el microscopio *Axio Vert.A1 Microscope* (Zeiss) y el programa *Zen Blue Edition* (Zeiss) para obtener imágenes de las células teñidas. Posteriormente se cuantificó el número de células total y el número de células positivas para la tinción utilizando el programa *ImageJ*.

9 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO

9.1 EXTRACCIÓN DE ARN

El primer paso para analizar la expresión génica a nivel de ácido ribonucleico (ARN) mensajero a partir de extractos celulares fue realizar una extracción de ARN utilizando el kit *GeneJET RNA Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando la centrífuga *5415R* (Eppendorf). A continuación, se cuantificó el ARN extraído mediante el espectrofotómetro *NanoDrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific), que se utilizó solamente si la pureza se encontraba en unos niveles adecuados.

9.2 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO

Seguidamente se realizó la síntesis de ADN complementario a partir del ARN que se había extraído. Se utilizó el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) y el termociclador *MultiGeneTM Optimax* (Labnet) siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. Para ello, se utilizaron 2 μ g de ARN por cada muestra.

9.3 PCR CUANTITATIVA

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó el termociclador *AriaMx Real-Time PCR systems* (Agilent Technologies). Para preparar las muestras se añadieron 33 ng de ADN complementario, 5 μ L de *SYBR Green Power PCR Master Mix* (Applied Biosystems)

y una mezcla de oligonucleótidos (Eurofins Genomics) a una concentración de 0,25 μ M en un volumen total de 10 μ L de agua libre de nucleasas. Los oligonucleótidos añadidos son complementarios al ARN del gen a estudiar y sus secuencias se indican en la **Tabla 3**. El programa utilizado se inició a una temperatura de 95°C durante 3 minutos seguida de 40 ciclos de amplificación. Cada ciclo de amplificación consta de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C. Finalmente se calentó la muestra a 95°C durante 1 minuto, se disminuyó la temperatura a 55°C durante 30 segundos y se volvió a aumentar hasta los 95°C durante 30 segundos. Todas las reacciones se realizaron por triplicado para cada gen y para cada muestra a evaluar.

Para realizar el análisis se utilizó el programa *AriaMx 1.0* (Agilent Technologies). Como gen de expresión constitutiva se utilizó gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), de forma que los valores del resto de genes se relativizaron al nivel de expresión de este.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para el análisis de la expresión de ARN mensajero

GEN	OLIGONUCLEÓTIDOS
<i>GAPDH</i>	Forward: 5'-TCCATGACAACCTTGGCATCGTGG-3' Reverse: 5'-GTTGCTGTTGAAGTACAGGAGAC-3'
<i>p53</i>	Forward: 5'-CCGCAGTCAGATCCTAGCG-3' Reverse: 5'-AATCATCCATTGCTTGGGACG-3'
<i>CDKN1A</i>	Forward: 5'-CTGCCAAGCTCTACCTTCC-3' Reverse: 5'-CCCGCAGTATCTTGCCTCC-3'
<i>IL6</i>	Forward: 5'-CCAGGAGCCCAGCTATGAAC-3' Reverse: 5'-CCCAGGGAGAAGGCAACTG-3'
<i>IL8</i>	Forward: 5'-GAGTGGACCACTGCGCCA-3' Reverse: 5'-TCCACAACCCTCTGCACCCAGT-3'
<i>SERPINE1</i>	Forward: 5'-CTCATCAGCCACTGGAAAGGCA-3' Reverse: 5'-GACTCGTGAAGTCAGCCTGAAAC-3'
<i>CCL20</i>	Forward: 5'-GGCGAATCAGAAGCAGCAAGCAAC-3' Reverse: 5'-ATTGGCCAGCTGCCGTGTGAA-3'
<i>MMP1</i>	Forward: 5'-TGTGGTGTCTCACAGCTTCC-3' Reverse: 5'-CGTTTTCAACTTGCCTCCC-3'

10 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

10.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Se utilizó *buffer* de radio-inmunoprecipitación (RIPA) para extraer proteínas a partir de extractos celulares. Este *buffer* se prepara en agua destilada y está compuesto por NaCl (Sigma-Aldrich) 150 mM, Tris-HCl (Sigma-Aldrich) a un pH de 7,5 y una concentración de 10 mM, dodecilsulfato sódico (Sigma-Aldrich) 0,1%, Triton (Sigma-Aldrich) 1%, ácido etilendiaminotetraacético (Sigma-Aldrich) a un pH de 8,0 y una concentración de 5 mM y deoxicolato de sodio (Sigma-Aldrich) 1%. Al *buffer* RIPA se añaden los siguientes inhibidores: ortovanadato sódico (Sigma-Aldrich) 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Thermo Fisher Scientific) 1 mM, ditiotreitól (Sigma-Aldrich) 1 mM, fluoruro sódico (Sigma-Aldrich) 4 mM y un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). Después de resuspender los extractos celulares en *buffer* RIPA con inhibidores, se incubaron durante 20 minutos en hielo. Terminada la incubación, se resuspendieron las muestras utilizando una micropipeta y se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C de temperatura en una centrífuga *5414R* (Eppendorf). El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se utilizó para la cuantificación de proteínas.

10.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el método de Bradford mediante el kit *DC Protein Assay* (BIO-RAD). Se usaron placas de 96 pocillos (Falcon) en las que se cargaron las muestras por triplicado junto con los reactivos del kit siguiendo las instrucciones de este. Se utilizó albúmina de suero bovino para elaborar una recta de calibrado con concentraciones entre 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, que también se incluyó en la placa a cuantificar. Se midió la absorbancia a 750 nm utilizando el espectrofotómetro *Epoch2* (Biotek) y se realizaron los cálculos necesarios para equiparar la cantidad de proteínas en cada muestra.

10.3 ELECTROFORESIS

Se prepararon las muestras para realizar la electroforesis diluyendo el volumen necesario para obtener 30 μg de proteína en *buffer* RIPA con inhibidores. A estas preparaciones se les añadió *buffer* de carga preparado con un 4% de dodecilsulfato sódico (Sigma-Aldrich), un 20% de glicerol (Sigma-Aldrich), un 10% de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), un 0,004% de azul bromofenol (Sigma-Aldrich) y Tris-HCl (Sigma-Aldrich) a un pH de 6,8 en agua destilada. Una vez preparadas se calentaron a 95°C en un bloque térmico *Thermomixer Compact* (Eppendorf) durante 1 minuto.

Se cargaron las muestras en geles de poliacrilamida comerciales Bolt™ 4 a 12% (Invitrogen) colocados en el sistema *XCell SureLock™* (Invitrogen) con *buffer* Bolt MES SDS (Invitrogen). Además, se utilizó el marcador de peso molecular *PageRuler™ Plus* (Thermo Fisher Scientific). Una vez cargadas las muestras y el marcador de peso molecular, se conectó el sistema a una fuente de alimentación y se fijó el voltaje a 100 V durante 90 minutos.

10.4 TRANSFERENCIA

Terminada la separación de las proteínas de acuerdo con su peso molecular, se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno de 0,45 μm (Millipore). Para ello, se utilizó el mismo sistema *XCell SureLock™* (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en esta ocasión utilizando *buffer* de transferencia con Tris-glicina (Sigma-Aldrich) y un 20% de metanol (Merck Millipore) en agua destilada. Una vez finalizada la transferencia, se tiñeron las membranas con solución *Ponceau* (Thermo Fisher Scientific) para comprobar que el proceso se había realizado correctamente. Luego se retiró la solución *Ponceau* lavando las membranas con agua destilada.

10.5 BLOQUEO E INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS

Se bloquearon las membranas en una solución que se prepara con leche sin grasa al 5% en un *buffer* compuesto por Tris-HCl (Sigma-Aldrich) a un pH de 7,5, cloruro de sodio (Sigma-Aldrich) a 150 mM y Tween-20 (Sigma-Aldrich) al 0,05%. Se incubaron las membranas en esta solución en agitación durante una hora a temperatura ambiente.

Los anticuerpos primarios (**Tabla 4**) se prepararon en la misma solución. Las membranas se incubaron con la preparación de anticuerpo primario correspondiente en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora o a 4°C durante 16 horas. Tras la incubación, se lavaron las membranas en el *buffer* en el que se prepara la solución con leche.

A continuación, se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios (**Tabla 5**), que se prepararon en la misma solución que los primarios, en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Al terminar este paso, se lavaron las membranas en el *buffer* en el que se prepara la solución con leche.

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	HUÉSPED	DILUCIÓN
ACTINA	Santa Cruz	sc-8432	Ratón	1:1000
GAPDH (6C5)	Santa Cruz	sc-32233	Ratón	1:2000
p53	Santa Cruz	sc-126	Ratón	1:1000
p21 Waf1/Cip1 (12D1)	Cell Signaling	#2947	Conejo	1:2000
RB (4H1)	Cell Signaling	#9309	Ratón	1:2000
MDM2	Santa Cruz	sc-965	Ratón	1:1000
P- γ H2AX (Ser 139)	Cell Signaling	#9718	Conejo	1:1000

Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	HUÉSPED	DILUCIÓN
HRP anti-ratón	Santa Cruz	sc-516102	Ratón	1:5000
HRP anti-conejo	Santa Cruz	sc-2357	Ratón	1:5000

10.6 DETECCIÓN MEDIANTE QUIMIOLUMINISCENCIA

Para realizar la detección mediante quimioluminiscencia se utilizó el sustrato *Supersignal™ West Pico PLUS chemiluminescent substrate* (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones. Para el revelado se utilizó el equipo *ChemiDoc™ MP Imaging System* (BIO-RAD).

11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando la prueba t de Student de dos colas debido a que en todos los casos se analizó si dos muestras eran significativamente distintas en cuanto a una única variable. Para determinar la significación estadística, se estableció que el valor p fuese inferior a 0,05. De acuerdo con la práctica habitual, los experimentos se realizaron por triplicado. Se utilizó el programa *GraphPad Prism* (Dotmatics) para la representación gráfica, en la que se indican los valores de la media \pm desviación estándar, siendo la media el promedio de los valores obtenidos y la desviación estándar una medida de la dispersión de estos valores.

12 REPRESENTACIÓN GRÁFICA

Las representaciones gráficas que aparecen en la presente tesis son de autoría propia y se crearon utilizando el programa *BioRender*.

RESULTADOS

1 PAPEL DE P53, P21 Y RB EN LA INDUCCIÓN DE SENESCENCIA CON BLEOMICINA

La inducción de senescencia celular como respuesta al daño en el ADN está mediada por p53, que activa al inhibidor de CDKs p21 (D'Adda Di Fagagna, 2008). Esta inhibición mantiene a la proteína RB unida al factor de transcripción E2F, impidiendo la progresión del ciclo celular (Rubin *et al.*, 2020). Resulta de interés entender los mecanismos por los cuales las células de cáncer entran en senescencia celular como respuesta al tratamiento con quimioterápicos que inducen daño en el ADN.

1.1 INDUCCIÓN DE SENESCENCIA CON BLEOMICINA

En la línea de adenocarcinoma pulmonar humano A549, el quimioterápico Bleomicina provoca roturas de cadena simple y cadena doble del ADN, lo que induce senescencia (Aoshiba *et al.*, 2003; Chen y Stubbe, 2005). Esta línea celular carece de la expresión de p16^{INK4A} y no presenta mutaciones en p53, p21 ni RB; por lo que se considera un buen modelo para estudiar el papel de la vía p53-p21-RB en la inducción de senescencia *in vitro*.

A lo largo de este trabajo, el tratamiento de las células A549 con Bleomicina se realiza a una dosis de 20 μ M y se utiliza como control el vehículo en el que se prepara el fármaco. Para ello, en primer lugar, se siembra un número de células conocido y, una vez las células se han adherido a la placa, se añaden los correspondientes tratamientos, que se mantienen durante 5 días (**Figura 7A**).

Pasado este tiempo, se observa que el número de células tratadas con Bleomicina permanece inalterado desde el momento en el que se sembraron, mientras que el número de células tratadas con vehículo aumenta (**Figura 7B**). Con la finalidad de comprobar si la parada proliferativa es estable, se siembran las células a baja densidad una vez terminado el tratamiento. Después de 14 días, las células tratadas con vehículo proliferan y cubren el fondo del pocillo en el que fueron sembradas, mientras que las células tratadas con Bleomicina no son capaces de hacerlo (**Figura 7C**).

Al finalizar el tratamiento con Bleomicina o vehículo se analizan otros marcadores de senescencia además de la ausencia de proliferación celular. En las células A549 tratadas con Bleomicina se puede apreciar un aumento de la expresión del gen *CDKN1A*, que codifica la proteína p21. También se observa un aumento de la expresión de genes como *IL6*, *IL8* y *SERPINE1*, que codifican proteínas que forman parte del SASP (**Figura 7D-E**). Asimismo, las células tratadas con Bleomicina presentan un aumento de la expresión de las proteínas p53 y p21, además de ser positivas para la tinción SA β G (**Figura 7F-G**).

En los experimentos sucesivos se utilizaron células A549 tratadas con Bleomicina para estudiar el papel de las proteínas p53, p21 y RB; para lo cual se redujo la expresión de cada una de ellas utilizando ARNs de horquilla corta.

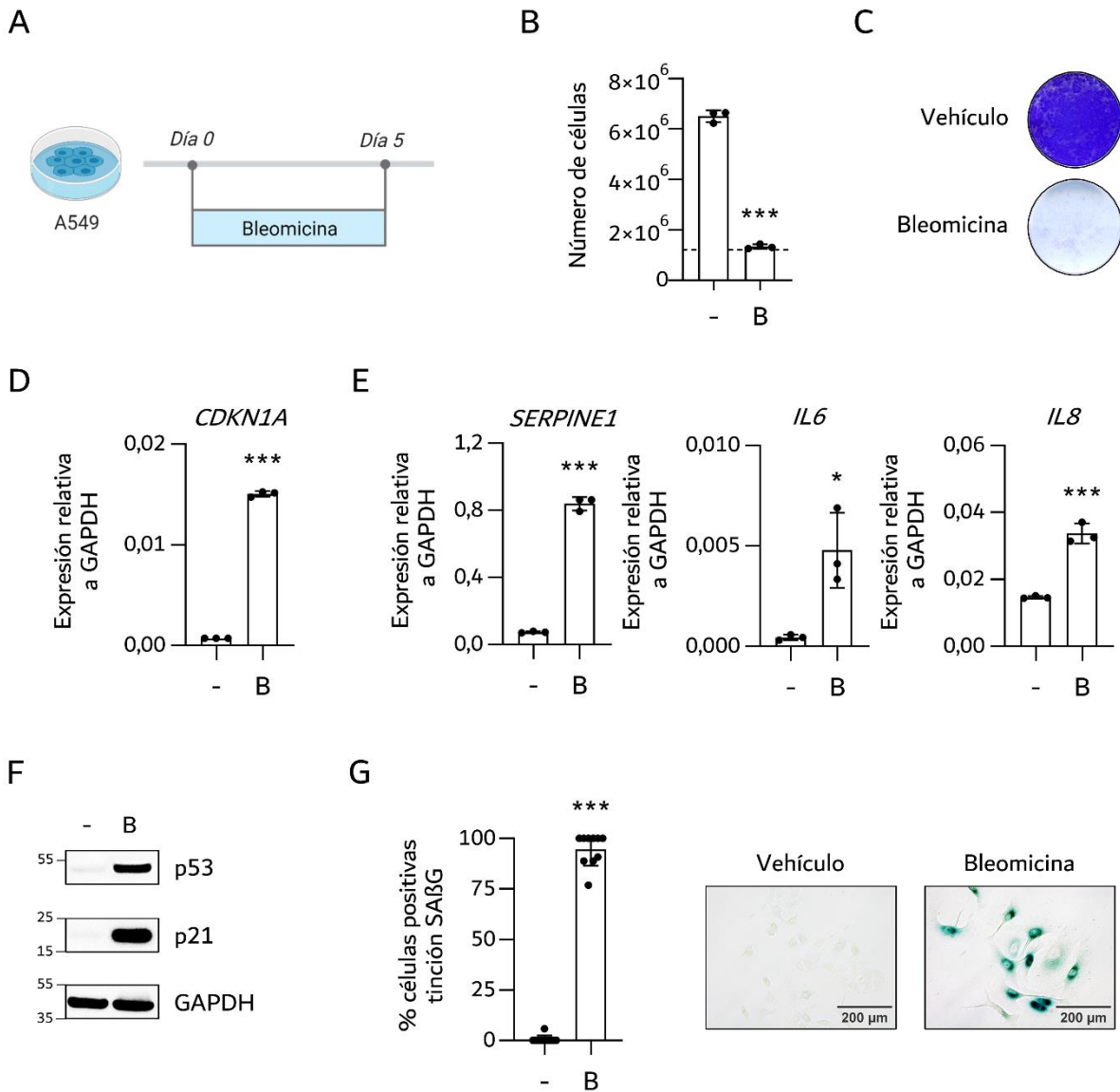


Figura 7. Inducción de senescencia celular mediante tratamiento con Bleomicina en células de adenocarcinoma pulmonar humano A549. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Número de células 5 días después de administrar vehículo o Bleomicina. La línea horizontal discontinua representa el número de células sembrado el día 0. (C) Tinción cristal violeta 14 días después de sembrar células A549 a baja densidad tras el tratamiento con vehículo o Bleomicina. (D) Análisis mediante PCR cuantitativa de la expresión de ARN mensajero del gen *CDKN1A* en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se muestra la expresión relativa al gen *GAPDH*. (E) Análisis mediante PCR cuantitativa de la expresión de ARN mensajero de los genes *SERPINE1*, *IL6* e *IL8* en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se muestra la expresión relativa al gen *GAPDH*. (F) Western blot mostrando el nivel de expresión de las proteínas p53 y p21 en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se utiliza *GAPDH* como control de carga. A la izquierda se indica la posición del marcador de peso molecular en kilodaltons. (G) Cuantificación del porcentaje de células positivas 5 días después de administrar vehículo o Bleomicina (izquierda) e imágenes representativas de la tinción SAβG (derecha). Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [SAβG]: β-galactosidasa asociada a senescencia; [%]: porcentaje. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: $p < 0,001$; [**]: $p < 0,01$; [*]: $p < 0,05$; [ns]: no significativo. (n=3)

1.2 PAPEL DE P53 EN LA INDUCCIÓN DE SENESCENCIA CON BLEOMICINA

Para estudiar la relevancia de p53, se generó una línea celular estable de células A549 transducidas con el vector retroviral pRetroSuper-Blast-shp53 (shp53), que reduce la expresión de p53 de forma constitutiva. Como control se utilizaron células A549 transducidas con el vector pRetroSuper-Blast-EV (control), cuya secuencia coincide con la del vector shp53, a excepción del ARN de horquilla corta que disminuye la expresión de la proteína. Una vez seleccionadas, las células A549 control y A549 shp53 se trataron con Bleomicina o el vehículo en el que se prepara (**Figura 8A**).

En las células A549 shp53 se observa una reducción de la expresión del gen *p53* a nivel de ARN mensajero, independientemente de que las células hayan sido tratadas con Bleomicina o con el vehículo. El tratamiento con Bleomicina aumenta los niveles de expresión del gen *CDKN1A* y de las proteínas p53 y p21, aunque lo hace de una forma marcadamente menor que en las células A549 control (**Figura 8B-C**).

El número de células A549 shp53 tratadas con Bleomicina no aumenta tras 5 días y tampoco se observa que las células proliferen 14 días después de sembrarlas a baja densidad una vez finalizado el tratamiento (**Figura 8D-E**). Además, las células A549 shp53 tratadas con Bleomicina son positivas para la tinción SA β G y se observa un aumento de la expresión de los genes *SERPINE1*, *IL6*, *CCL20* y *MMP1*, que forman parte del SASP (**Figura 8F-G**). Para comprobar si el SASP es funcional, se obtuvo medio condicionado (MC) a partir de las células A549 control y A549 shp53 tratadas previamente con vehículo o Bleomicina. A continuación, se cultivaron células A549 con el MC durante dos rondas de 3 días (**Figura 9A**). Una vez terminado el tratamiento con MC, el número de células A549 se reduce de forma significativa cuando el MC proviene de células tratadas con Bleomicina, sean A549 control o A549 shp53 (**Figura 9B**). En esta misma línea, cuando el MC proviene de células A549 control o A549 shp53 tratadas con Bleomicina, el porcentaje de células positivas para la tinción SA β G y la expresión de los genes *CDKN1A* y *SERPINE1* aumentan (**Figura 9C-D**).

1.3 PAPEL DE P21 EN EL MANTENIMIENTO DE LA SENESCENCIA INDUCIDA CON BLEOMICINA

Para estudiar el papel de la proteína p21, se generó una línea celular transduciendo A549 con el vector lentiviral LT3GEPiR-shp21 (shp21) y seleccionándolas con Puromicina. Las células A549 shp21 se trataron durante 5 días con Bleomicina para inducir senescencia. Dado que el vector shp21 es inducible mediante el tratamiento con Tetraciclina o su análogo Doxyciclina, posteriormente se trataron las células con Doxyciclina 1 μ g/mL durante 2, 4 o 6 días para reducir la expresión de la proteína p21 (**Figura 10A**).

El tratamiento con Bleomicina seguido de Doxyciclina durante 2, 4 o 6 días resulta en una disminución de la expresión del gen *CDKN1A* y en una ligera reducción de los niveles de la proteína p21, especialmente cuando se mantiene el tratamiento con Doxyciclina durante 6 días (**Figura 10B-C**). Las células A549 shp21 tratadas con Bleomicina no proliferan tras 6 días de tratamiento con Doxyciclina y tampoco lo hacen al sembrarlas a baja densidad y mantenerlas otros 14 días con Doxyciclina (**Figura 10D-E**). Tras el tratamiento con Bleomicina y Doxyciclina, las células son positivas para la tinción SA β G, no obstante, presentan una disminución estadísticamente significativa de la expresión de los genes *SERPINE1*, *IL6* y *MMP1* con respecto a las células tratadas con Bleomicina seguida de vehículo (**Figura 10F-G**).

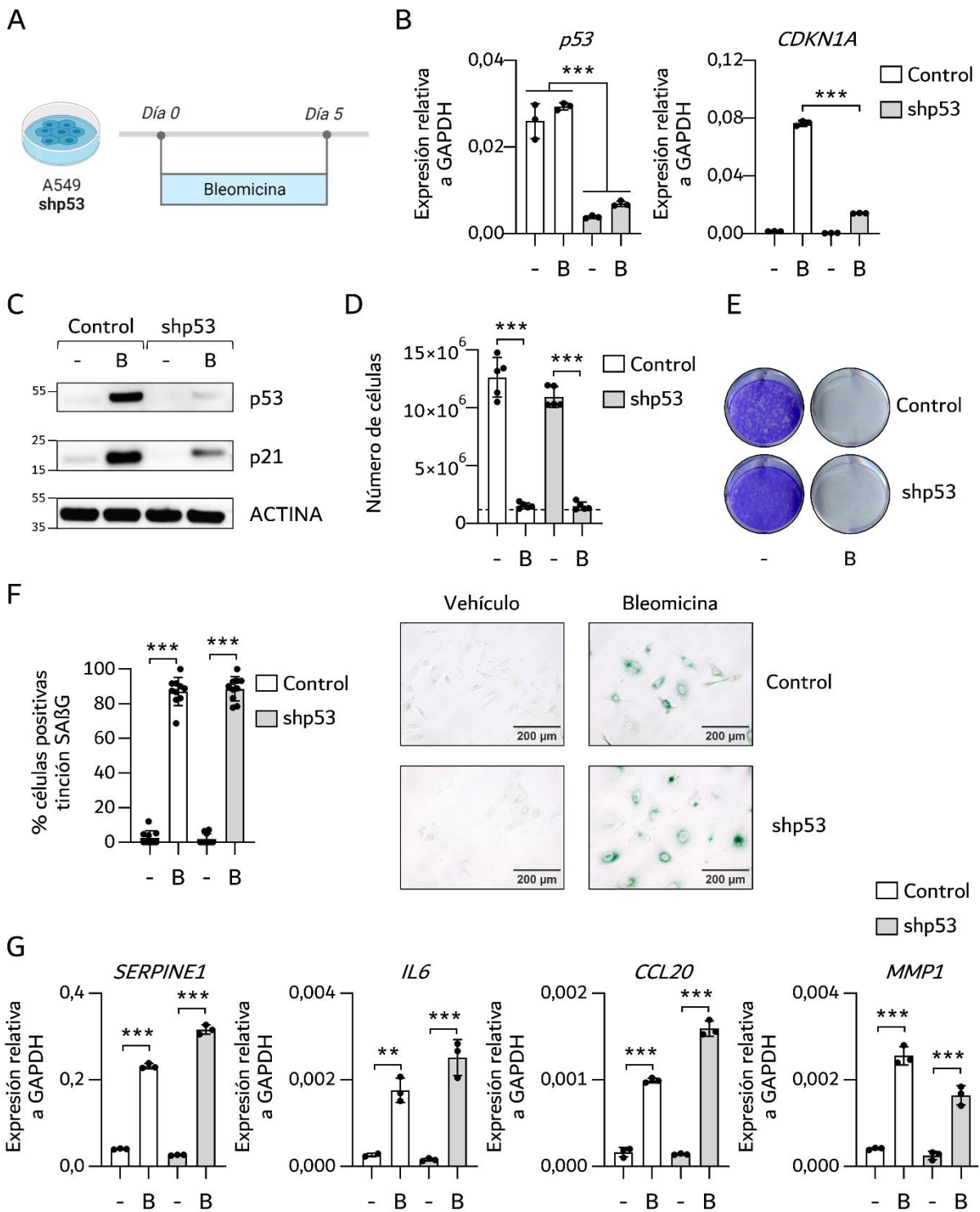


Figura 8. Inducción de senescencia celular con Bleomicina en células A549 shp53. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Análisis mediante PCR cuantitativa de la expresión de ARN mensajero de los genes *p53* y *CDKN1A* en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se muestra la expresión relativa al gen *GAPDH*. (C) Western blot mostrando el nivel de expresión de las proteínas *p53* y *p21* en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se utiliza *ACTINA* como control de carga. A la izquierda se indica la posición del marcador de peso molecular en kilodaltons. (D) Número de células 5 días después de administrar vehículo o Bleomicina. La línea horizontal discontinua representa el número de células sembrado el día 0. (E) Tinción cristal violeta 14 días después de sembrar células A549 control y células A549 shp53 a baja densidad tras el tratamiento con vehículo o Bleomicina. (F) Cuantificación del porcentaje de células positivas 5 días después de administrar vehículo o Bleomicina (izquierda) e imágenes representativas de la tinción SAβG (de-

recha) (G) Análisis mediante PCR cuantitativa de la expresión de ARN mensajero de los genes *SERPINE1*, *IL6*, *CCL20* y *MMP1* en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se muestra la expresión relativa al gen *GAPDH*. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [%]: porcentaje; [control]: A549 pRetroSuper-Blast-EV; [shp53]: A549 pRetroSuper-Blast-shp53; [SAβG]: β-galactosidasa asociada a senescencia. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: p<0,001; [**]: p<0,01; [*]: p<0,05; [ns]: no significativo. (n=3)

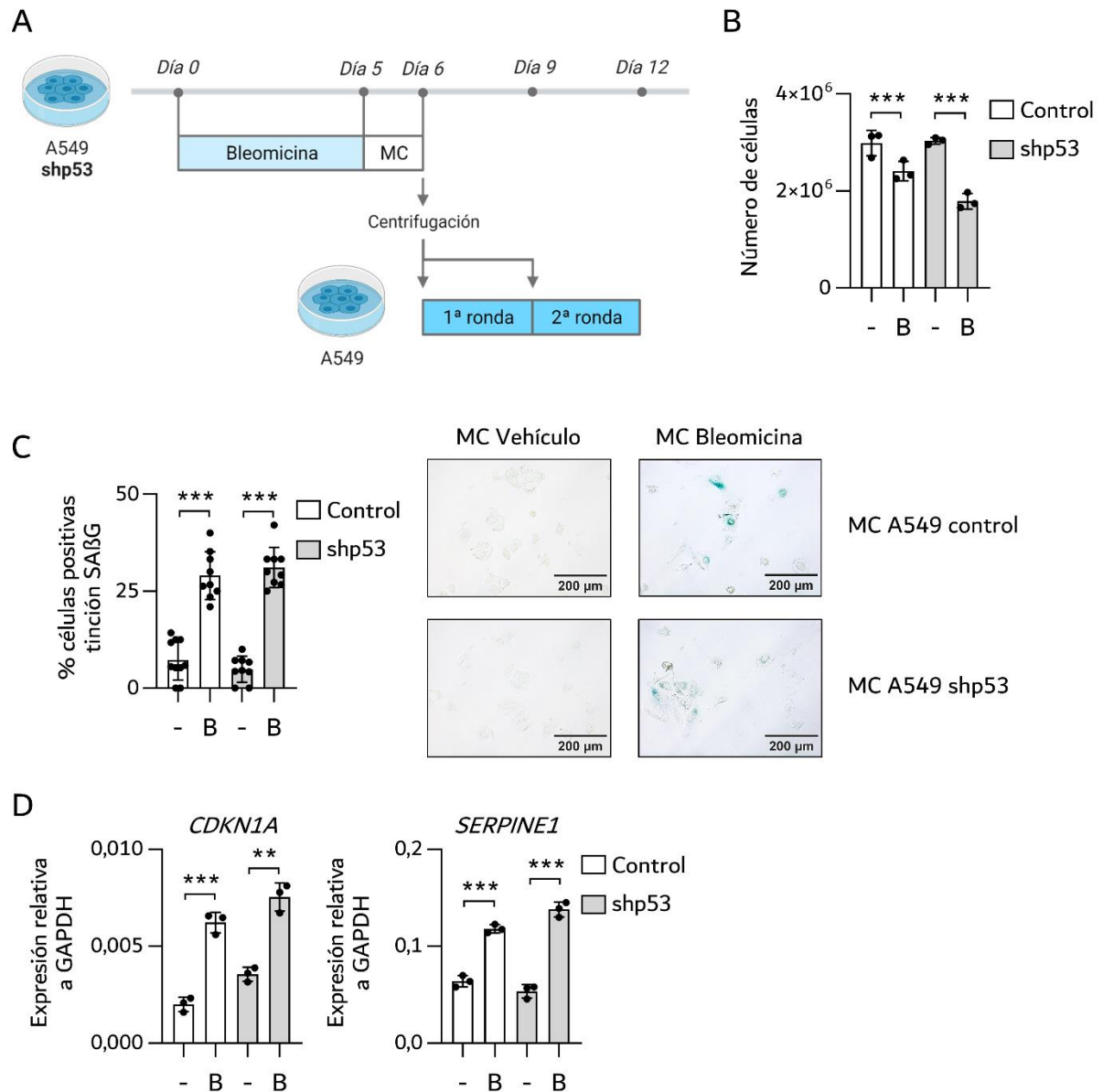


Figura 9. Inducción de senescencia paracrina mediante MC de células A549 control o A549 shp53 tratadas con vehículo o Bleomicina. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Número de células tras dos rondas de tratamiento con MC. (C) Cuantificación del porcentaje de células positivas 5 días después de los tratamientos con MC (izquierda) e imágenes representativas de la tinción SAβG (derecha). (D) Análisis mediante PCR cuantitativa de la expresión de ARN mensajero de los genes *CDKN1A* y *SERPINE1* tras el tratamiento con MC. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [%]: porcentaje; [control]: A549 pRetroSuper-Blast-EV; [shp53]: A549 pRetroSuper-Blast-shp53; [SAβG]: β-galactosidasa asociada a senescencia; [MC]: medio condicionado. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: p<0,001; [**]: p<0,01; [*]: p<0,05; [ns]: no significativo. (n=3)

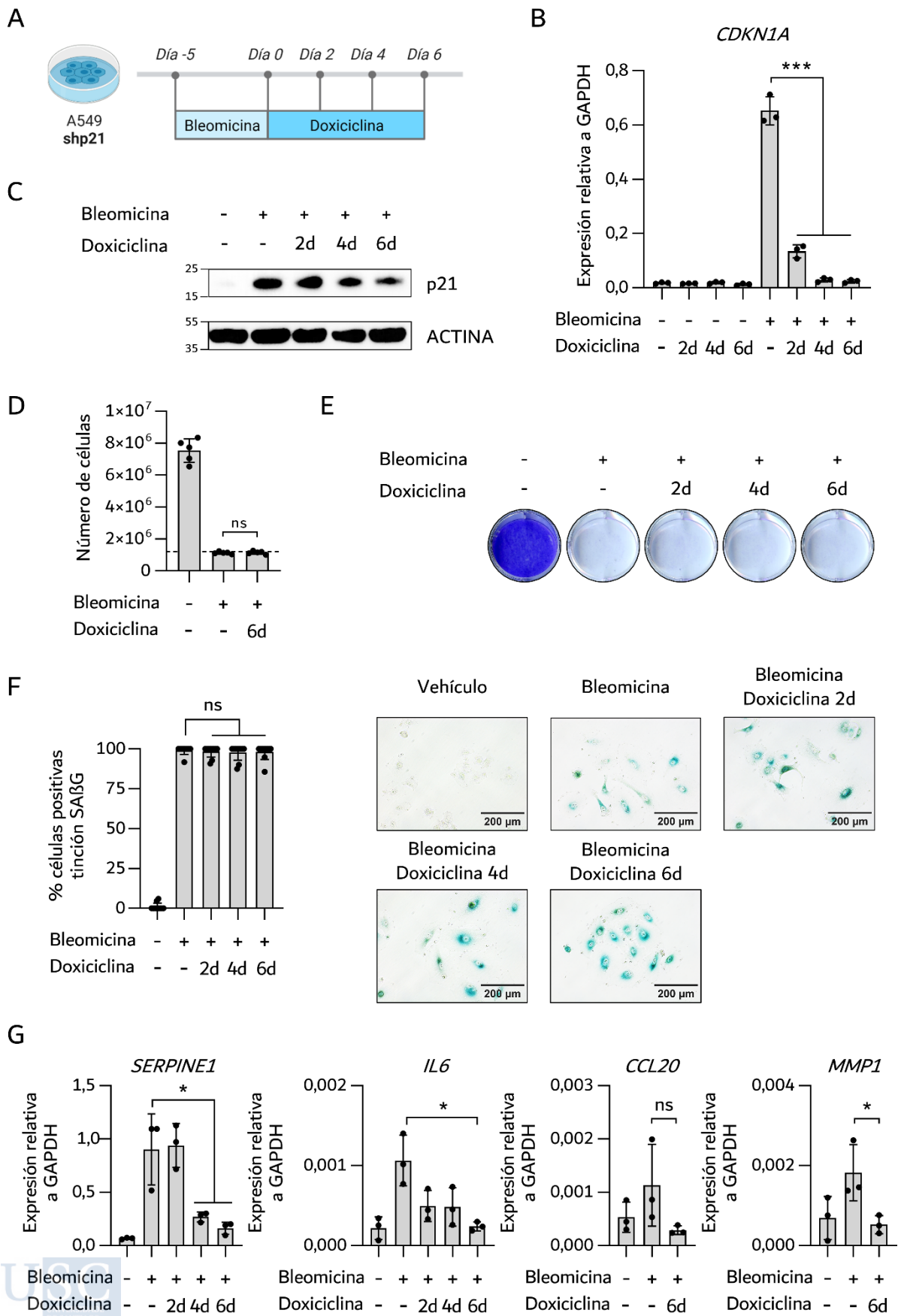


Figura 10. Inducción de senescencia celular con Bleomicina en células A549 shp21. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Análisis mediante PCR cuantitativa de la expresión de ARN mensajero del gen *CDKN1A* en células tratadas con vehículo o Bleomicina y luego con vehículo o Doxiciclina durante 2, 4 o 6 días. Se muestra la expresión relativa al gen *GAPDH*. (C) Western blot mostrando el nivel de expresión de las proteínas p53 y p21 en células tratadas con vehículo o Bleomicina y luego con vehículo o Doxiciclina durante 2, 4 o 6 días. Se utiliza ACTINA como control de carga. A la izquierda se indica la posición del marcador de peso molecular en kilodaltons. (D) Número de células 5 días después de administrar vehículo o Bleomicina y luego vehículo o Doxiciclina durante 6 días. La línea horizontal discontinua representa el número de células sembrado el día 0. (E) Tinción cristal violeta 14 días después de sembrar a baja densidad células A549 shp21 tratadas con vehículo o Bleomicina y luego con vehículo o Doxiciclina durante 2, 4 o 6 días. (F) Cuantificación del porcentaje de células positivas 5 días después de administrar vehículo o Bleomicina y luego vehículo o Doxiciclina durante 2, 4 o 6 días (izquierda) e imágenes representativas de la tinción SA β G (derecha) (G) Análisis mediante PCR cuantitativa de la expresión de ARN mensajero de los genes *SERPINE1*, *IL6*, *CCL20* y *MMP1* en células tratadas con vehículo o Bleomicina y luego con vehículo o Doxiciclina durante 2, 4 o 6 días. Se muestra la expresión relativa al gen *GAPDH*. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [d]: días; [%]: porcentaje; [shp21]: LT3GEPiR-shp21; [SA β G]: β -galactosidasa asociada a senescencia. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: $p < 0,001$; [**]: $p < 0,01$; [*]: $p < 0,05$; [ns]: no significativo. (n=3)

Para comprobar si la reducción de los niveles de expresión del SASP podría afectar a la inducción de senescencia paracrina, se realizó un experimento en el que se retiró el medio de cultivo y se añadió medio fresco tras finalizar los tratamientos de Bleomicina y Doxiciclina. En el caso de las células tratadas con Doxiciclina se mantuvo este tratamiento, ya que los niveles reducidos de p21 podrían aumentar al retirarlo. Posteriormente se cultivaron células A549 con el MC durante dos rondas de 3 días, entre las cuales se hizo un pase de las células (**Figura 11A**). El tratamiento con MC de células A549 shp21 tratadas con Bleomicina y Doxiciclina no fue capaz de reducir el número de células A549, de incrementar el porcentaje de células positivas para la tinción SA β G o de aumentar la expresión de los genes *CDKN1A* y *SERPINE1* (**Figura 11B-D**).

1.4 PAPEL DE RB EN LA INDUCCIÓN DE SENESCENCIA CON BLEOMICINA

Con la finalidad de estudiar el papel de la proteína RB en la inducción de senescencia con Bleomicina se generaron dos líneas celulares estables de A549 transducidas con el vector lentiviral pLKO-RB1-shRNA19 (shRB-1) o el vector lentiviral pLKO-RB1-shRNA63 (shRB-2), que reducen la expresión de la proteína RB de forma constitutiva. Como control se utilizaron células A549 transducidas con el vector pLKO.1-puro Non-Mammalian shRNA Control (control), que contiene un ARN de horquilla corta con una secuencia que no se une a ningún gen de mamíferos. Tras la selección con Puomicina, se trataron las líneas celulares generadas con Bleomicina o su vehículo (**Figura 12A**).

En las células A549 control tratadas con Bleomicina se aprecia un aumento de la expresión de la proteína p21 acompañado de una reducción de los niveles totales de la proteína RB. En las células A549 shRB-1 y A549 shRB-2 se observa un aumento de la expresión de la proteína p21 tras Bleomicina y una reducción de la expresión de la proteína RB, independientemente de si las células han recibido tratamiento con Bleomicina o no (**Figura 12B**).

Las células A549 control, A549 shRB-1 y A549 shRB-2 tratadas con Bleomicina no proliferan tras el tratamiento y tampoco lo hacen tras sembrarlas a baja densidad y mantenerlas durante 14 días sin tratamiento (**Figura 12C-D**). En cuanto a la tinción SA β G, tampoco se aprecian diferencias entre las células A549 control y las células A549 shRB-1 o shRB-2, siendo aquellas tratadas con el vehículo mayoritariamente negativas para la tinción y las tratadas con Bleomicina mayoritariamente positivas (**Figura 12E**).

Para comprobar la capacidad de inducir senescencia de forma paracrina, al finalizar el tratamiento con vehículo o Bleomicina en las células A549 control, A549 shRB-1 y A549 shRB-2, se realizó un experimento con MC derivados de estas células con los que se trataron

células A549 (**Figura 13A**). El número de células A549 tratadas con MC se reduce de forma significativa cuando este medio proviene de células tratadas con Bleomicina, sean células A549 control, A549 shRB-1 o A549 shRB-2 (**Figura 13B**). Tampoco se ven diferencias del efecto del MC proveniente de células A549 control y células A549 shRB-1 o A549 shRB-2 en cuanto al porcentaje de células positivas para la tinción SA β G o el aumento de la expresión de los genes *CDKN1A* y *SERPINE1* (**Figura 13C-D**).

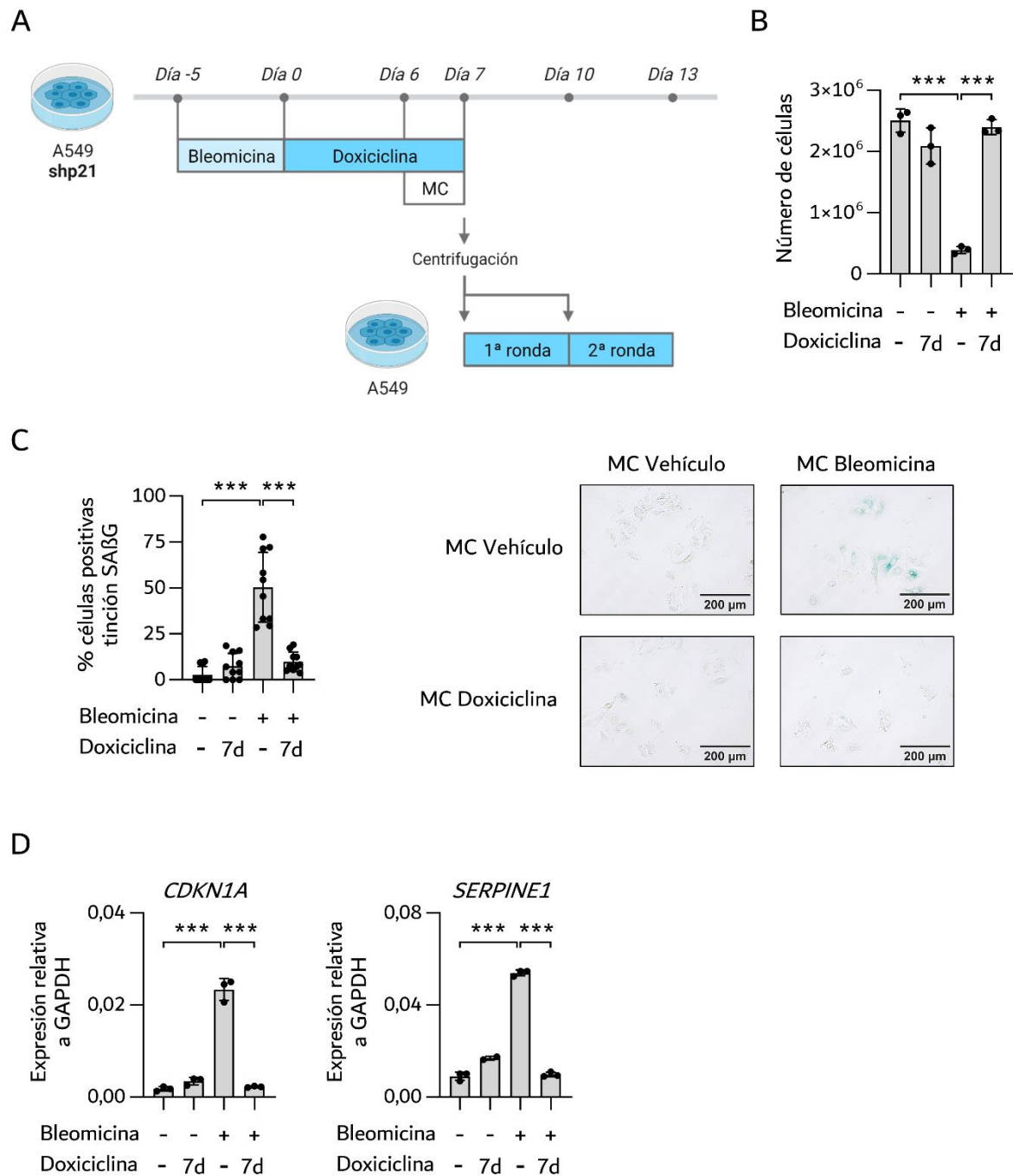


Figura 11. Inducción de senescencia paracrina mediante MC de células A549 shp21 tratadas con vehículo o Bleomicina y luego con vehículo o Doxiciclina durante 7 días. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Número de células diana tras dos rondas de tratamiento con MC. (C) Cuantificación del porcentaje de células positivas 5 días después de los tratamientos con MC (izquierda) e imágenes representativas de la tinción SAβG (derecha). (D) Análisis mediante PCR cuantitativa de la expresión de ARN mensajero de los genes *CDKN1A* y *SERPINE1* tras el tratamiento con MC. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [d]: días; [MC]: medio condicionado; [%]: porcentaje; [SAβG]: β-galactosidasa asociada a senescencia; [shp21]: LT3GEPiR-shp21. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: p<0,001; [**]: p<0,01; [*]: p<0,05; [ns]: no significativo. (n=3)

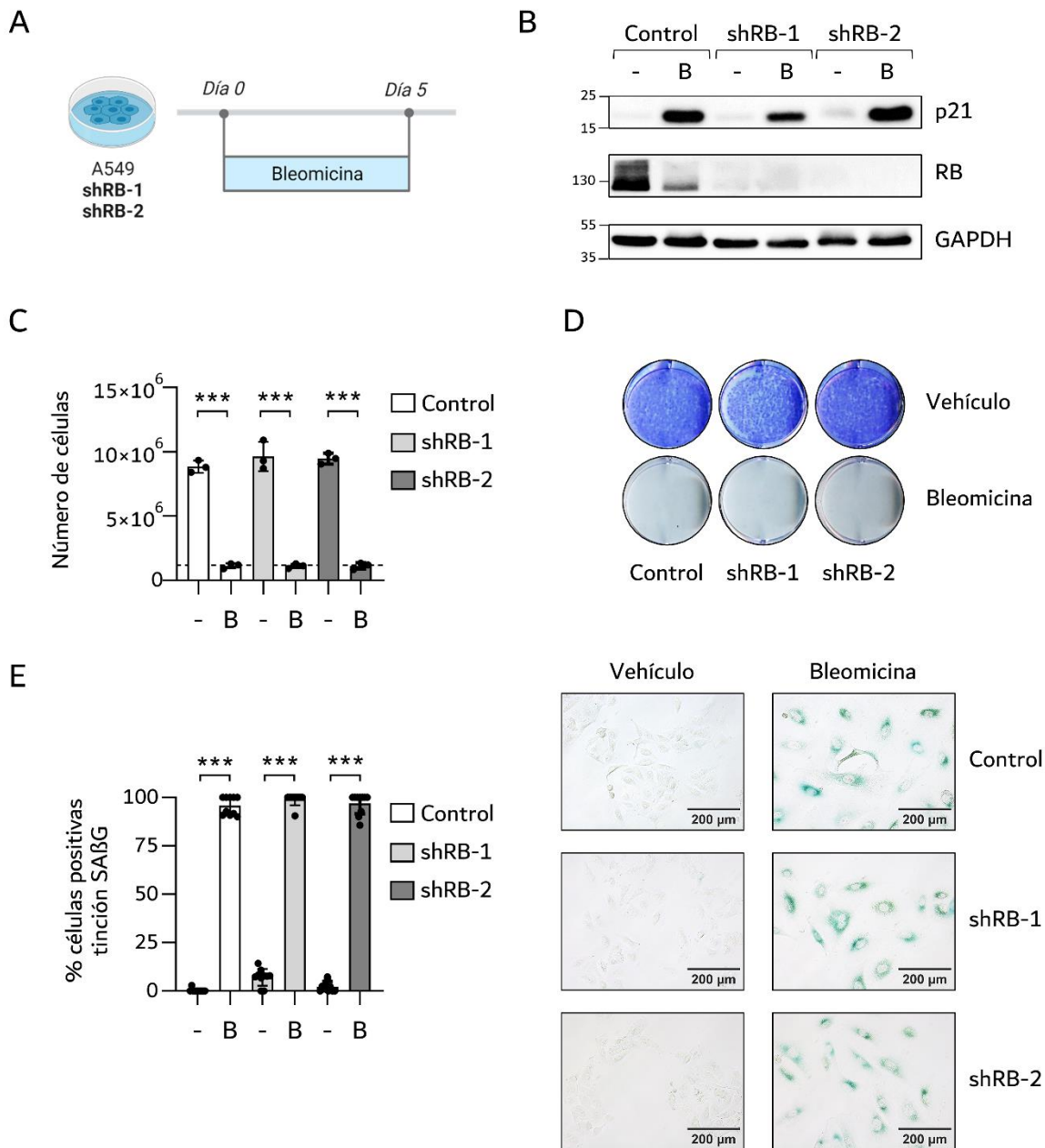


Figura 12. Inducción de senescencia celular con Bleomicina en células A549 control, A549 shRB-1 o A549 shRB-2. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Western blot mostrando el nivel de expresión de las proteínas p21 y RB en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se utiliza GAPDH como control de carga. A la izquierda se indica la posición del marcador de peso molecular en kilodaltons. (C) Número de células 5 días después de administrar vehículo o Bleomicina. La línea horizontal discontinua representa el número de células sembrado el día 0. (D) Tinción cristal violeta 14 días después de sembrar células A549 control y células A549 shpRB-1 o shRB-2 a baja densidad tras el tratamiento con vehículo o Bleomicina. (E) Cuantificación del porcentaje de células positivas 5 días después de administrar vehículo o Bleomicina (izquierda) e imágenes representativas de la tinción SAβG (derecha). Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [%]: porcentaje; [SAβG]: β-galactosidasa asociada a senescencia; [control]: A549 pLKO.1-puro Non-Mammalian shRNA Control; [shRB-1]: A549 pLKO-RB1-shRNA19; [shRB-2]: A549 pLKO-RB1-shRNA63. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: p<0,001; [**]: p<0,01; [*]: p<0,05; [ns]: no significativo. (n=3)

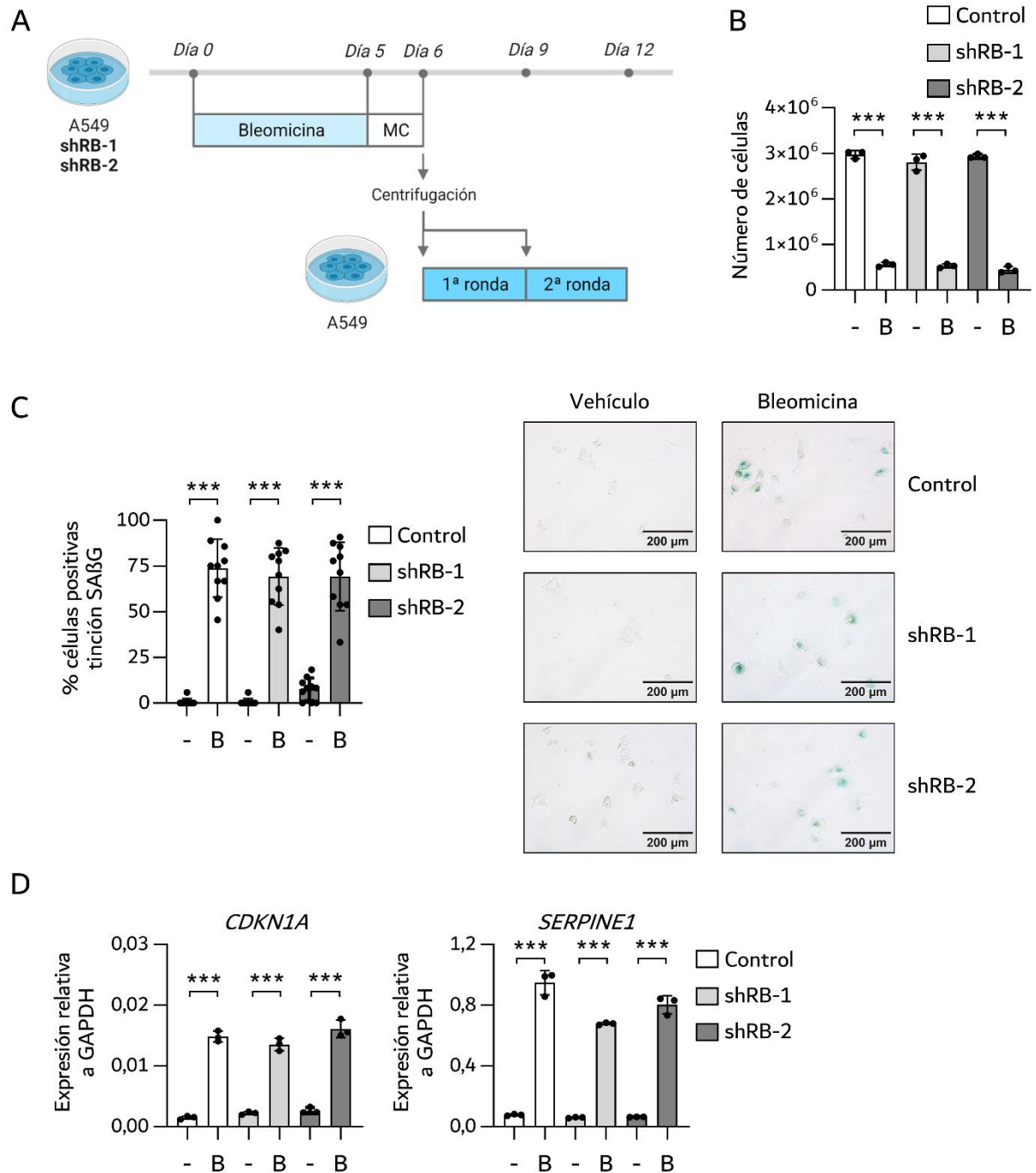


Figura 13. Inducción de senescencia paracrina mediante MC de células A549 control, A549 shRB-1 o A549 shRB-2 previamente tratadas con vehículo o Bleomicina. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Número de células diana tras dos rondas de tratamiento con MC. (C) Cuantificación del porcentaje de células positivas 5 días después de los tratamientos con MC (izquierda) e imágenes representativas de la tinción SAβG (derecha). (D) Análisis mediante PCR cuantitativa de la expresión de ARN mensajero de los genes *CDKN1A* y *SERPINE1* tras el tratamiento con MC. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [%]: porcentaje; [SAβG]: β-galactosidasa asociada a senescencia; [control]: A549 pLKO.1-puro Non-Mammalian shRNA Control; [shRB-1]: A549 pLKO-RB1-shRNA19; [shRB-2]: A549 pLKO-RB1-shRNA63. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: p<0,001; [**]: p<0,01; [*]: p<0,05; [ns]: no significativo. (n=3)

2 EFECTO DE LA AUSENCIA DE P21 ANTERIOR O POSTERIOR AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA

La reducción de los niveles de p21 cuando se tratan células A549 shp21 con Bleomicina seguida de Doxyciclina es incompleta (resultados mostrados en el apartado 1.3), mientras que el tratamiento con Doxyciclina previo y/o simultáneo al tratamiento con Bleomicina no es capaz de disminuir los niveles de expresión de p21 (resultados no mostrados).

Por este motivo, se hace necesario encontrar un sistema alternativo con el que disminuir los niveles de la proteína p21. Para impedir la expresión de p21 mediante la técnica CRISPR, se utilizó el vector lentiviral CDKN1A sgRNA (p21 KO), que codifica la nucleasa Cas9 y una guía que se une al gen que codifica a la proteína p21, *CDKN1A*. Se generó una línea celular estable de A549 transducidas con este vector y otra línea con el vector lentiCRISPRv2 hygromycin (control), que no contiene la secuencia guía.

2.1 AUSENCIA DE P21 ANTERIOR AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA

Las células A549 control y A549 p21 KO se trataron con Bleomicina o el vehículo en el que se prepara el fármaco (**Figura 14A**). Al finalizar este periodo, las células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina mostraban una disminución de la expresión del gen *CDKN1A* y de la proteína p21 en comparación con las células A549 control tratadas de igual modo (**Figura 14B-C**). Los niveles de la proteína p53 aumentan en mayor medida en las células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina, que son las únicas que presentan un aumento de la proteína *murine double minute 2* (MDM2) fragmentada (**Figura 14C-D**).

El número de células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina disminuye con respecto al número de células sembradas y su viabilidad se reduce de una forma estadísticamente significativa (**Figura 14E-F**). El porcentaje de muerte celular aumenta en torno a un 50% del cultivo y las células que permanecen adheridas a la placa presentan una morfología refringente y agrandada (**Figura 14G-H**). Para comprobar si se induce apoptosis en estas células, se utilizaron como control de apoptosis células A549 control tratadas con Bleomicina a las que luego se administró Navitoclax, que es un senolítico que induce apoptosis en células senescentes (**Figura 15A**). Para analizar el porcentaje de células apoptóticas se utilizó el reactivo *CellEvent™ Caspase-3/7*. El porcentaje de células positivas es mínimo en todas las condiciones a excepción del control de apoptosis y las células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina, cuyos porcentajes son similares (**Figura 15B-C**). Adicionalmente, se realizó otro ensayo en el que se utilizó el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK para impedir la inducción de apoptosis (**Figura 15D**). El tratamiento con Z-VAD-FMK reduce significativamente el porcentaje de muerte celular que presentan el control de apoptosis y las células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina, mejorando el aspecto del cultivo celular (**Figura 15E-F**).

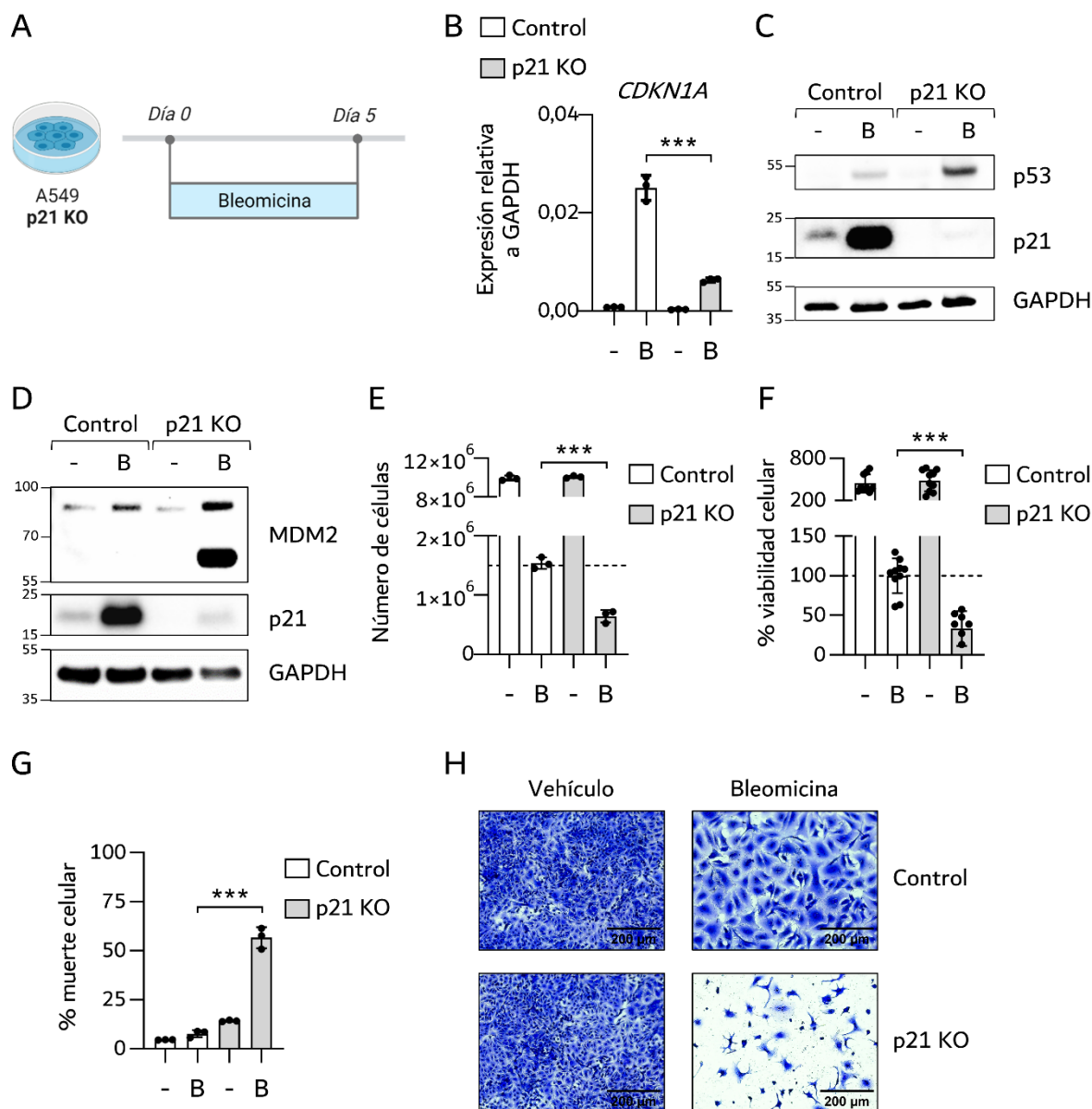
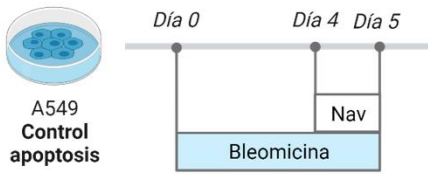
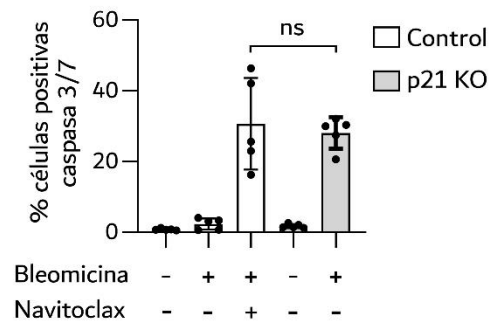


Figura 14. Respuesta de las células A549 p21 KO al tratamiento con Bleomicina. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Análisis mediante PCR cuantitativa de la expresión de ARN mensajero del gen *CDKN1A* en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se muestra la expresión relativa al gen *GAPDH*. (C) Western blot mostrando el nivel de expresión de las proteínas p53 y p21 en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se utiliza GAPDH como control de carga. A la izquierda se indica la posición del marcador de peso molecular en kilodaltons. (D) Western blot mostrando el nivel de expresión de las proteínas p21 y MDM2 en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se utiliza GAPDH como control de carga. A la izquierda se indica la posición del marcador de peso molecular en kilodaltons. (E) Número de células 5 días después de administrar vehículo o Bleomicina. La línea horizontal discontinua representa el número de células sembrado el día 0, el eje está truncado para poder distinguir los valores de la parte inferior. (F) Análisis de la viabilidad celular 5 días tras la administración de vehículo o Bleomicina utilizando PrestoBlue™. Se considera la viabilidad de las células A549 control tratadas con Bleomicina como el 100% y se relativiza los resultados del resto de condiciones frente a esta. El eje está truncado para poder distinguir los valores de la parte inferior. (G) Análisis de la muerte celular tras la administración de vehículo o Bleomicina utilizando azul de tripano para teñir las células muertas. (H) Tinción cristal violeta mostrando células A549 control y células A549 p21 KO tratadas durante 5 días con vehículo o Bleomicina. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [%]: porcentaje; [control]: A549 lentiCRISPRv2 hygro; [p21 KO]: A549 *CDKN1A* sgRNA. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: p<0,001; [**]: p<0,01; [*]: p<0,05; [ns]: no significativo. (n=3)

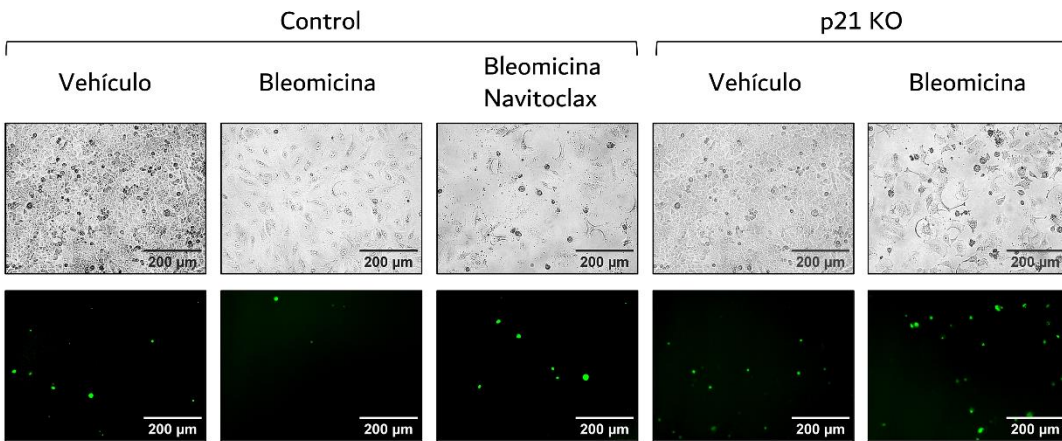
A



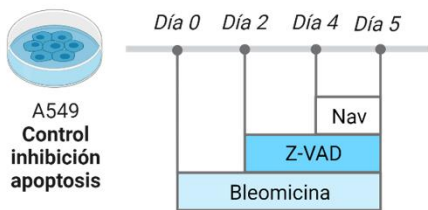
B



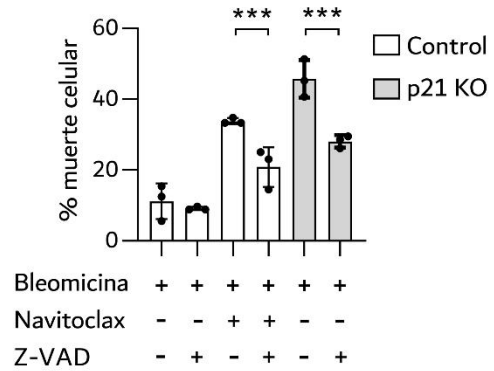
C



D



E



F

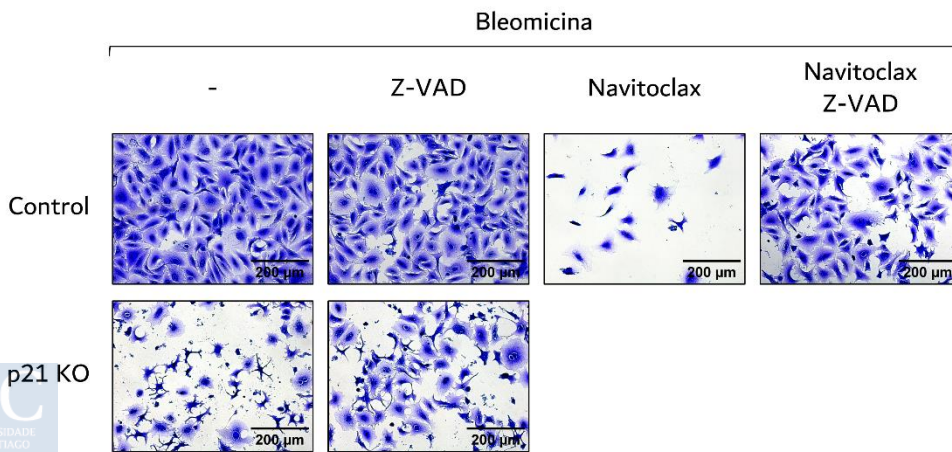


Figura 15. Detección de apoptosis en células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina. (A) Representación esquemática del diseño experimental para obtener un control de apoptosis. Creada utilizando Biorender.com. (B) Porcentaje de células A549 control y A549 p21 KO tratadas con Bleomicina que son positivas para caspasa 3/7 activa. Se utiliza como control positivo células A549 control tratadas con Bleomicina y Navitoclax. (C) Imágenes representativas del cultivo celular utilizando microscopía óptica para cuantificar el número total de células (arriba) y microscopía de fluorescencia para cuantificar el número de células positivas para caspasa 3/7 activa. (D) Representación esquemática del diseño experimental seguido para obtener un control de inhibición de apoptosis. Creada utilizando Biorender.com. (E) Análisis de la muerte celular de células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina y Z-VAD-FMK. Se utiliza como control de apoptosis células A549 control tratadas con Bleomicina y Navitoclax; y como control de inhibición de apoptosis células A549 control tratadas con Bleomicina, Z-VAD-FMK y Navitoclax. (F) Tinción cristal violeta mostrando células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina y Z-VAD-FMK. Se utiliza como control de apoptosis células A549 control tratadas con Bleomicina y Navitoclax; y como control de inhibición de apoptosis células A549 control tratadas con Bleomicina, Z-VAD-FMK y Navitoclax. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [N]: Navitoclax; [Z-VAD]: Z-VAD-FMK; [%]: porcentaje; [control]: A549 lentiCRISPRv2 hygro; [p21 KO]: A549 CDKN1A sgRNA. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: $p < 0,001$; [**]: $p < 0,01$; [*]: $p < 0,05$; [ns]: no significativo. (n=3)

A fin de valorar si el aumento de p53 en las células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina pudiese estar relacionado con la muerte celular, se redujo el nivel de expresión de p53 utilizando el vector shp53. Para ello, se realizaron transducciones de las líneas A549 control y A549 p21 KO con el vector shp53 o su respectivo control. Además de comprobar que los vectores shp53 y p21 KO son capaces de reducir la expresión de p53 y p21, respectivamente; se muestra que no hay diferencias entre las células A549 p21 KO y las células A549 shp53 + p21 KO tras el tratamiento con Bleomicina en cuanto al número de células y el aspecto del cultivo (**Figura 16**).

Para comprobar el efecto de otros quimioterápicos que inducen daño en el ADN, se utilizaron Cisplatino, Doxorubicina, Etopósido y Gemcitabina. Estos quimioterápicos producen un efecto similar al tratamiento con Bleomicina, ya que reducen el número de células, aumentan el porcentaje de muerte celular y empeoran el aspecto del cultivo de células A549 p21 KO. Además, también aumenta la expresión de p53 en células A549 p21 KO por encima de los niveles alcanzados en células A549 control (**Figura 17**).

Para comprobar la respuesta al tratamiento con Bleomicina en otra línea celular se utilizó la línea celular de adenocarcinoma de mama MCF7, que carece de la expresión de p16^{INK4A} y no presenta mutaciones en p53, p21 o RB. Con esta finalidad, se generaron líneas celulares estables transducidas con los vectores control y p21 KO (**Figura 18A**). En las células MCF7 p21 KO tratadas con Bleomicina no se observa un aumento de p53 por encima de los niveles de las células MCF7 control tratadas con Bleomicina; aunque se mantienen los resultados vistos en las células A549 p21 KO en lo relativo a la reducción del número de células, la disminución de la viabilidad celular y el empeoramiento del aspecto del cultivo (**Figura 18B-D**).

El tratamiento con un inhibidor de CDKs podría reemplazar las funciones de p21, alterando la respuesta al daño en el ADN tras el tratamiento con Bleomicina. Para comprobarlo, se trató la línea celular A549 p21 KO con Palbociclib, un inhibidor de CDKs, y luego con Bleomicina o la combinación de Bleomicina con Palbociclib (**Figura 19A**). La inhibición de CDKs aumenta significativamente el número de células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina; permitiendo que se mantenga el número de células inicial, reduciendo el porcentaje de muerte y mejorando el aspecto del cultivo celular (**Figura 19B-D**).

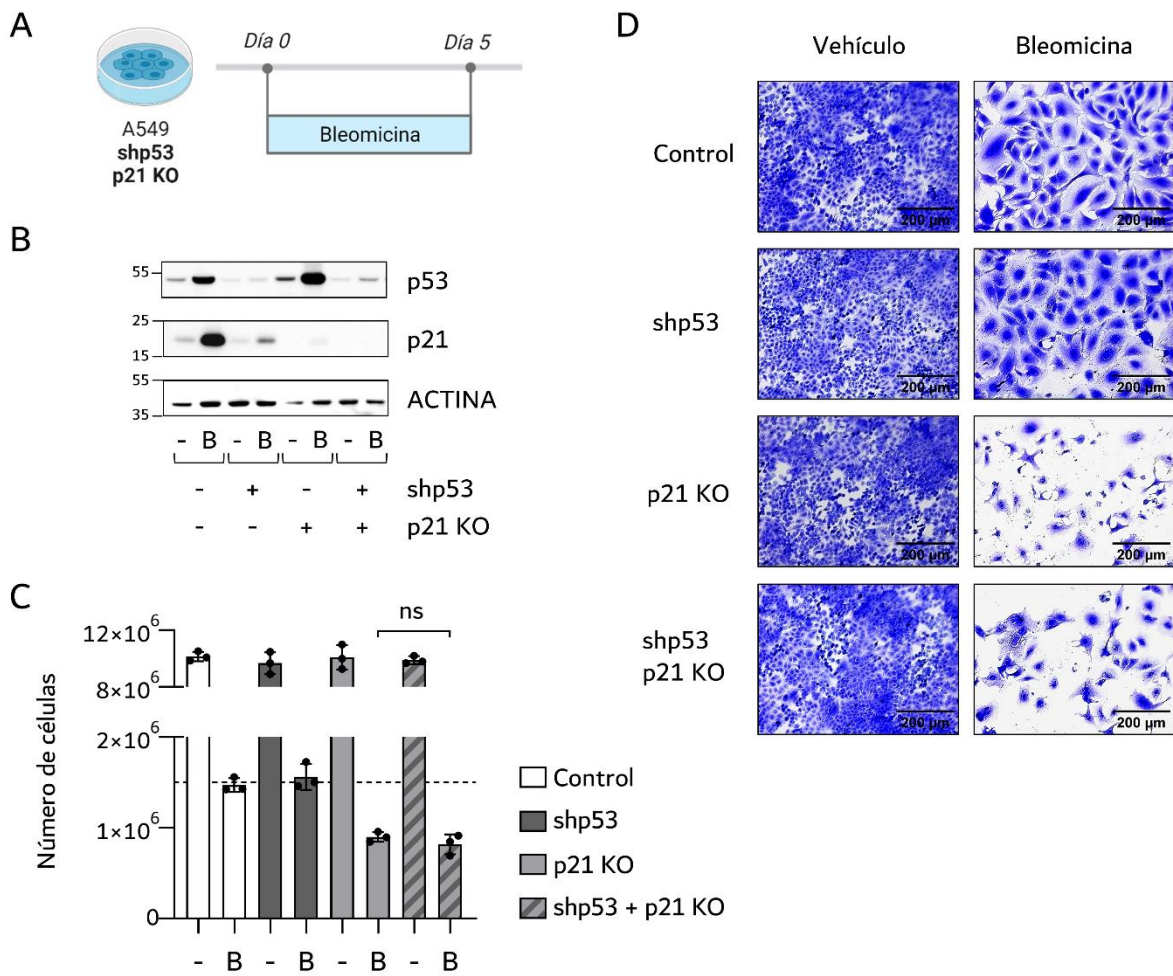


Figura 16. Respuesta al tratamiento con Bleomicina en células A549 shp53 + p21 KO. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Western blot mostrando el nivel de expresión de las proteínas p53 y p21 en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se utiliza ACTINA como control de carga. A la izquierda se indica la posición del marcador de peso molecular en kilodaltons. (C) Número de células 5 días después de administrar vehículo o Bleomicina. La línea horizontal discontinua representa el número de células sembrado el día 0, el eje está truncado para poder distinguir los valores de la parte inferior. (D) Tinción cristal violeta mostrando células A549 tratadas durante 5 días con vehículo o Bleomicina. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [%]: porcentaje; [control]: A549 con ambos vectores control; [shp53]: A549 shp53 y control de p21 KO; [p21 KO]: A549 p21 KO y control de shp53; [shp53 + p21 KO]: A549 shp53 + p21 KO. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: $p < 0,001$; [**]: $p < 0,01$; [*]: $p < 0,05$; [ns]: no significativo. (n=3)

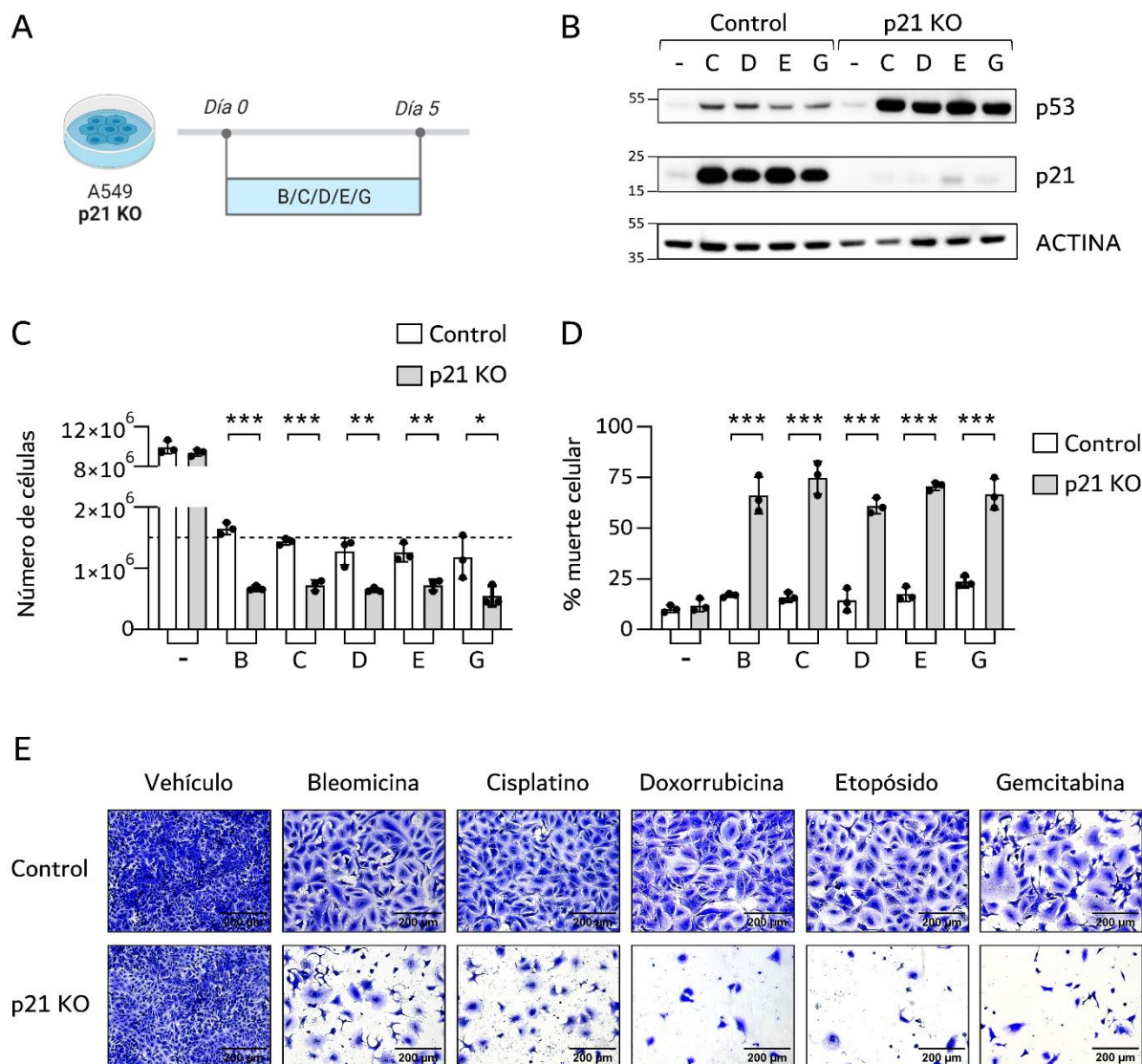


Figura 17. Respuesta al tratamiento con otros quimioterápicos en células A549 control y A549 p21 KO. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Western blot mostrando el nivel de expresión de las proteínas p53 y p21 en células A549 control y A549 p21 KO tratadas con vehículo, Cisplatino, Doxorubicina, Etopósido o Gemcitabina. Se utiliza ACTINA como control de carga. A la izquierda se indica la posición del marcador de peso molecular en kilodaltons. (C) Número de células A549 control y A549 p21 KO 5 días después de administrar vehículo, Bleomicina, Cisplatino, Doxorubicina, Etopósido o Gemcitabina. La línea horizontal discontinua representa el número de células sembrado el día 0, el eje está truncado para poder distinguir los valores de la parte inferior. (D) Análisis de la muerte celular de células A549 control y A549 p21 KO 5 días tras la administración de vehículo, Cisplatino, Doxorubicina, Etopósido o Gemcitabina. Se utiliza azul de tripano para teñir las células muertas. (E) Tinción cristal violeta mostrando células A549 control y células A549 p21 KO tratadas durante 5 días con vehículo, Cisplatino, Doxorubicina, Etopósido o Gemcitabina. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [C]: Cisplatino; [D]: Doxorubicina; [E]: Etopósido; [G]: Gemcitabina; [%]: porcentaje; [control]: A549 lentiCRISPR2 hygro; [p21 KO]: A549 CDKN1A sgRNA. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: p<0,001; [**]: p<0,01; [*]: p<0,05; [ns]: no significativo. (n=3)

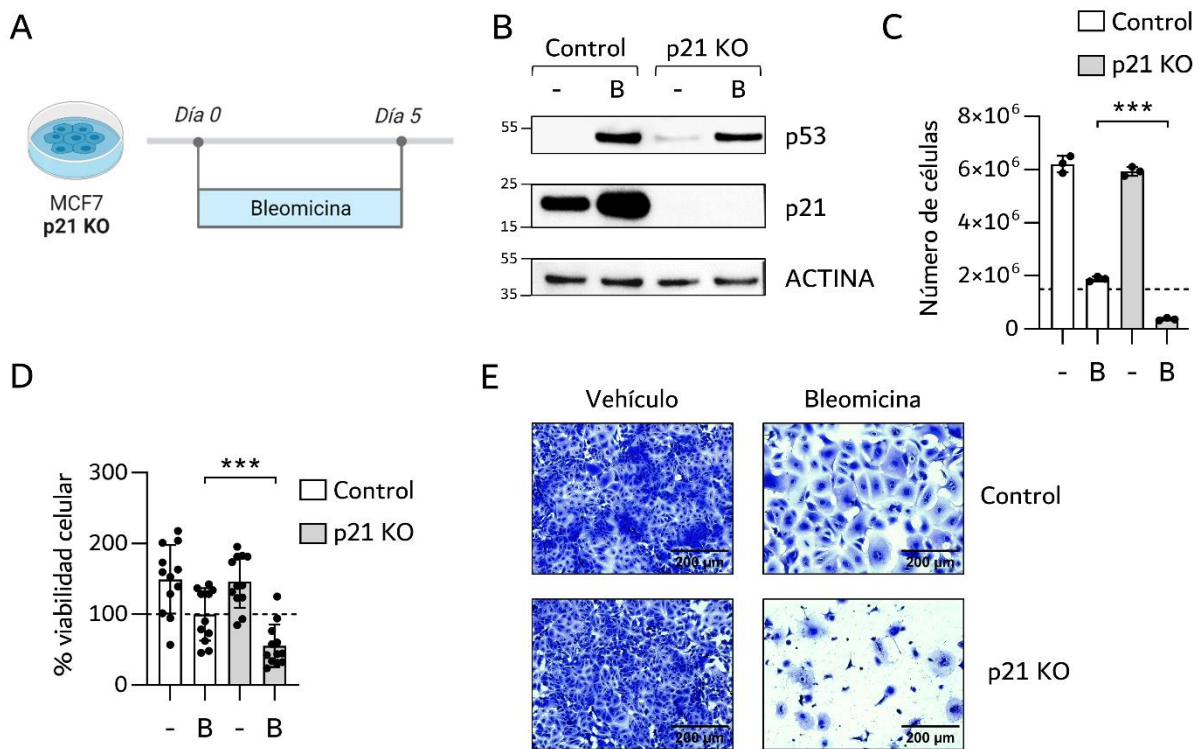


Figura 18. Respuesta al tratamiento con Bleomicina en células MCF7 p21 KO. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Western blot mostrando el nivel de expresión de las proteínas p53 y p21 en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se utiliza ACTINA como control de carga. A la izquierda se indica la posición del marcador de peso molecular en kilodaltons. (C) Número de células 5 días después de administrar vehículo o Bleomicina. La línea horizontal discontinua representa el número de células sembrado el día 0. (D) Análisis de la viabilidad celular 5 días tras la administración de vehículo o Bleomicina utilizando PrestoBlue™. (E) Tinción cristal violeta mostrando células MCF7 control y células MCF7 p21 KO tratadas durante 5 días con vehículo o Bleomicina. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [%]: porcentaje; [control]: MCF7 lentiCRISPRv2 hygro; [p21 KO]: MCF7 CDKN1A sgRNA. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: $p < 0,001$; [**]: $p < 0,01$; [*]: $p < 0,05$; [ns]: no significativo. (n=3)

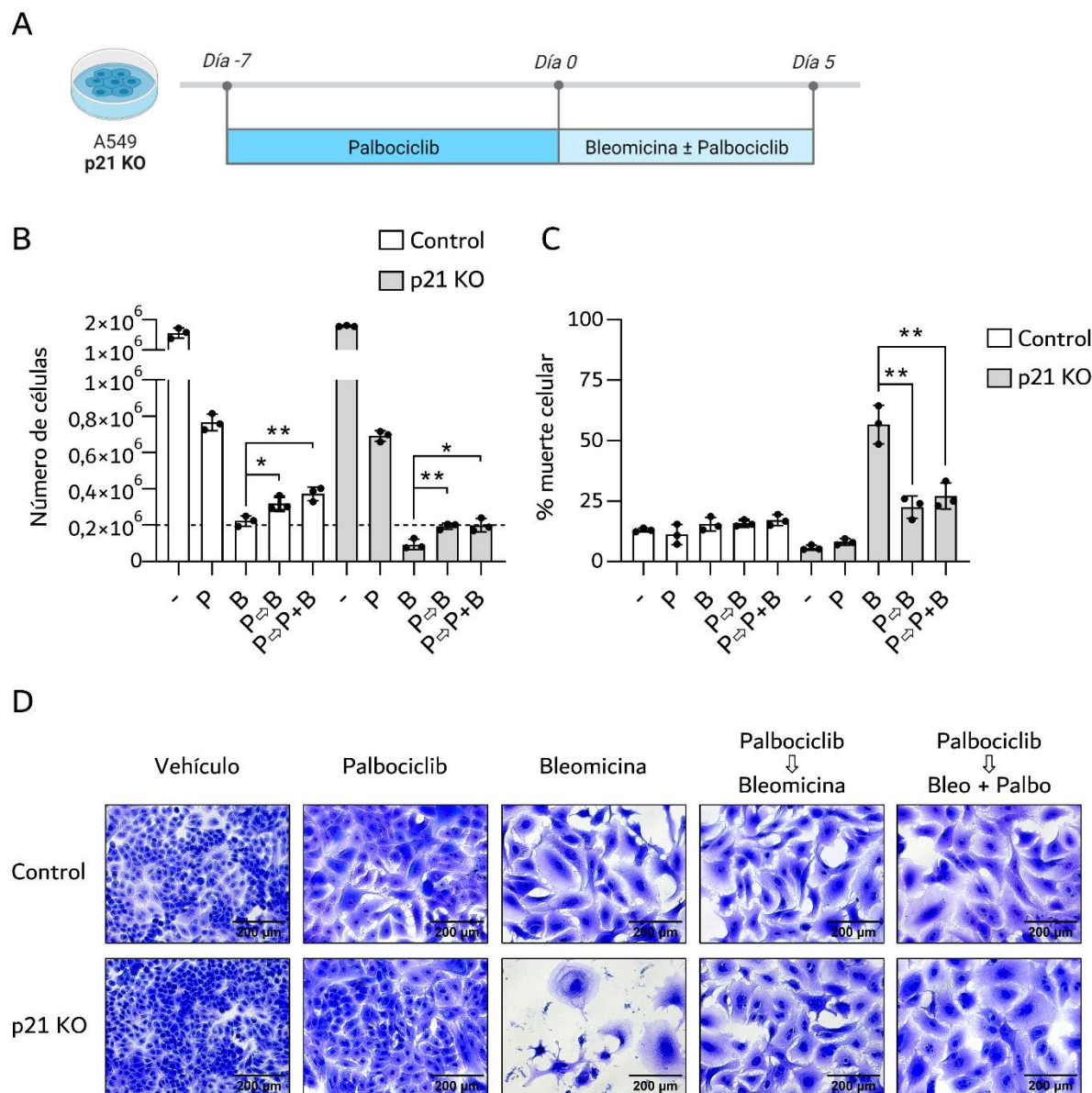


Figura 19. Respuesta al tratamiento con Palbociclib y Bleomicina en células A549 control y A549 p21 KO. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Número de células después de administrar vehículo, Palbociclib, Bleomicina o Palbociclib seguido de Bleomicina ± Palbociclib. La línea horizontal discontinua representa el número de células sembrado el día 0, el eje está truncado para poder distinguir los valores de la parte inferior. (C) Análisis de la muerte celular de células A549 control y A549 p21 KO tras la administración de vehículo, Palbociclib, Bleomicina o Palbociclib seguido de Bleomicina ± Palbociclib. Se utiliza azul de tripano para teñir las células muertas. (D) Tinción cristal violeta mostrando células A549 control y células A549 p21 KO tratadas durante 5 días con vehículo, Palbociclib, Bleomicina o Palbociclib seguido de Bleomicina ± Palbociclib. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [Bleo]: Bleomicina; [P]: Palbociclib; [Palbo]: Palbociclib; [P⇒B]: Palbociclib seguido de Bleomicina; [P⇒P+B]: Palbociclib seguido de Palbociclib y Bleomicina; [%]: porcentaje; [control]: A549 lentiCRISPRv2 hygro; [p21 KO]: A549 CDKN1A sgRNA. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: p<0,001; [**]: p<0,01; [*]: p<0,05; [ns]: no significativo. (n=3)

2.2 AUSENCIA DE p21 POSTERIOR AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA

En los experimentos realizados con anterioridad se utilizaron líneas estables que presentan una reducción de los niveles de p21 previa al tratamiento. Resulta de interés estudiar el efecto de la ausencia de p21 tanto en la inducción de senescencia celular como en el mantenimiento del estado senescente. En consecuencia, se realizaron experimentos en el orden inverso, primero induciendo senescencia celular utilizando Bleomicina en células A549 para luego transducir el vector lentiviral p21 KO o el vector control. Posteriormente, se mantuvieron estas células añadiendo Higromicina B durante 7 días (**Figura 20A**).

Las células A549 tratadas con Bleomicina y transducidas posteriormente con el vector p21 KO muestran unos niveles de expresión de p53 superiores a los de las células transducidas con el vector control, además de no presentar un aumento de los niveles de p21 (**Figura 20B**). El incremento de la expresión de p53 se corresponde con un aumento de la proteína MDM2 fragmentada (**Figura 20C**). En las células a las que se reducen los niveles de p21 tras el establecimiento del estado senescente, el porcentaje de muerte celular se eleva y el cultivo celular tiene peor aspecto que el de las células A549 tratadas con Bleomicina y transducidas con el vector control (**Figura 20D-E**).

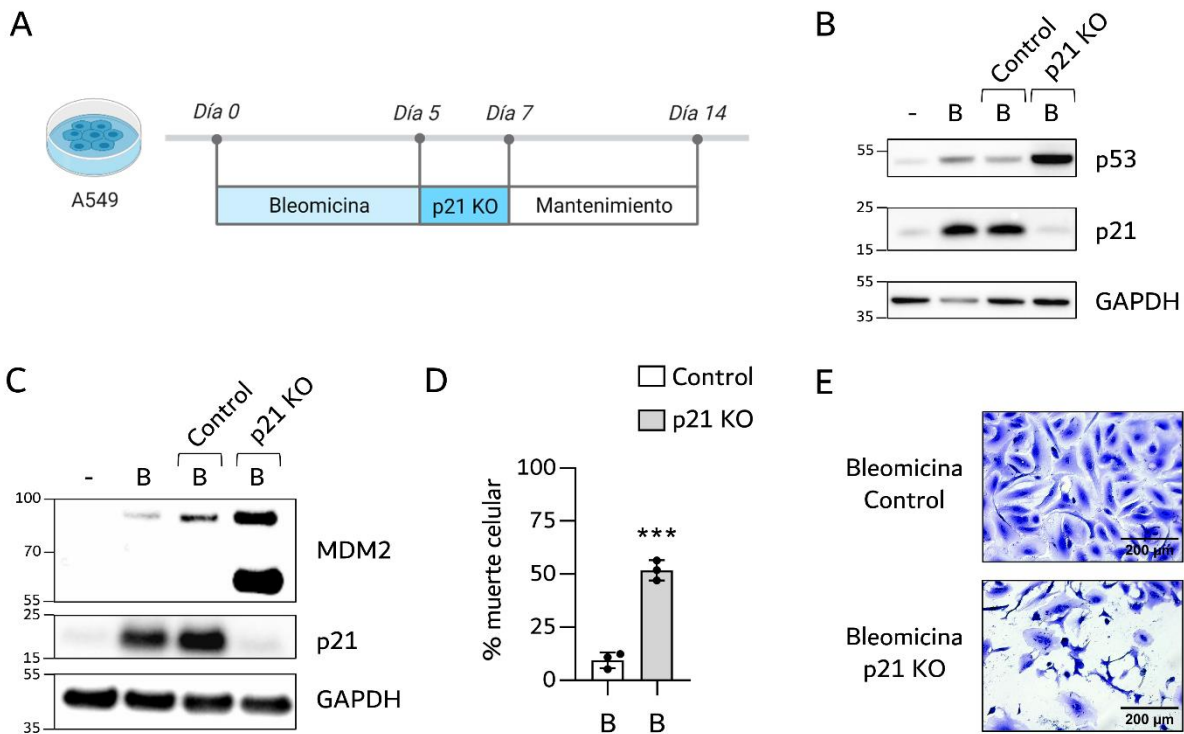


Figura 20. Efecto de la transducción del plásmido p21 KO en células A549 previamente tratadas con Bleomicina. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Western blot mostrando el nivel de expresión de las proteínas p53 y p21 en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se utiliza GAPDH como control de carga. A la izquierda se indica la posición del marcador de peso molecular en kilodaltons. (C) Western blot mostrando el nivel de expresión de las proteínas p21 y MDM2 en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se utiliza GAPDH como control de carga. A la izquierda se indica la posición del marcador de peso molecular en kilodaltons. (D) Análisis de la muerte celular 7 días tras la transducción de los plásmidos control y p21 KO en células A549 previamente tratadas con Bleomicina utilizando azul de tripano para teñir las células muertas. (E) Tinción cristal violeta mostrando células 7 días tras la transducción de los plásmidos control y p21 KO en células A549 previamente tratadas con Bleomicina. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [%]: porcentaje; [control]: A549 lentiCRISPRv2 hygro; [p21 KO]: A549 CDKN1A sgRNA. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: $p < 0,001$; [**]: $p < 0,01$; [*]: $p < 0,05$; [ns]: no significativo. (n=3)

Para limitar el aumento de p53 que se produce en las células A549 tratadas con Bleomicina cuando son transducidas con el vector p21 KO, se utilizaron como células de partida A549 shp53. Se siguió el mismo planteamiento experimental, tratando primero con Bleomicina y a continuación transduciendo el vector p21 KO (**Figura 21A-B**). Atendiendo al porcentaje de muerte celular y al aspecto del cultivo, no se aprecian diferencias entre las células A549 shp53 en las que se elimina p21 y su control sin p21 (**Figura 21C-D**).

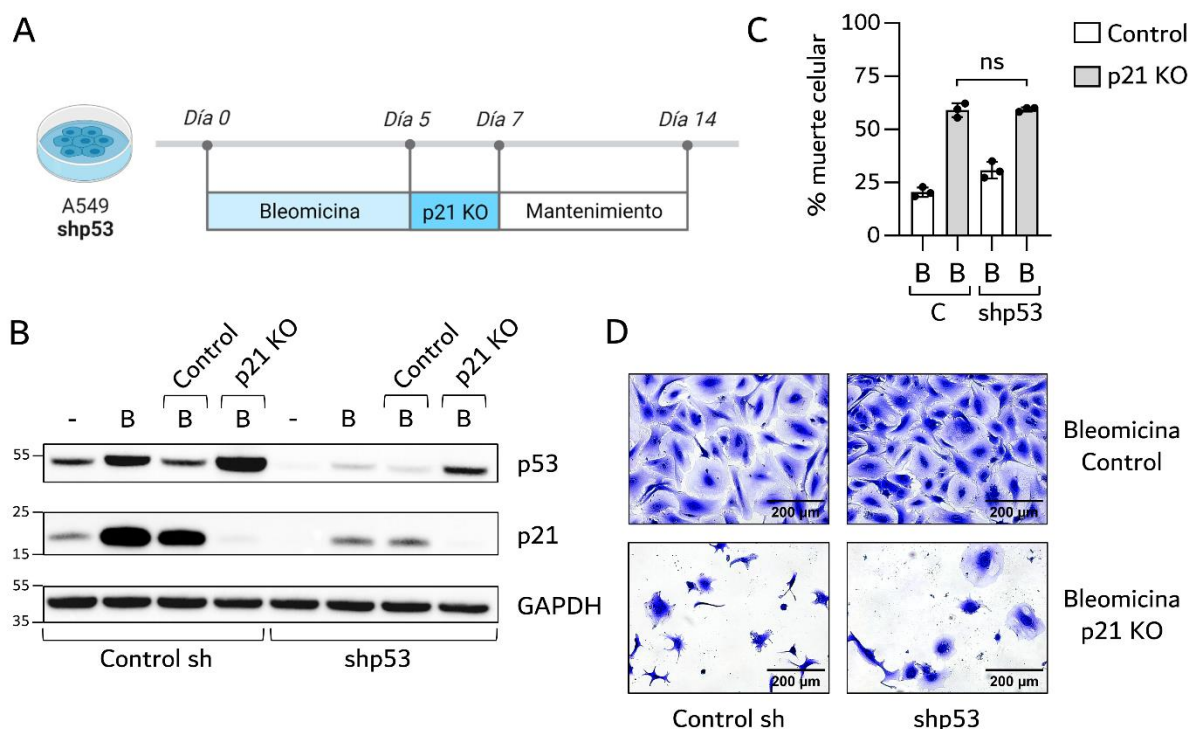


Figura 21. Efecto de la transducción del plásmido p21 KO en células A549 shp53 previamente tratadas con Bleomicina. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Western blot mostrando el nivel de expresión de las proteínas p53 y p21 en células A549 control o A549 shp53 tratadas con vehículo o Bleomicina y luego transducidas con p21 KO o su vector control. Se utiliza GAPDH como control de carga. A la izquierda se indica la posición del marcador de peso molecular en kilodaltons. (C) Análisis de la muerte celular 7 días tras la transducción de los plásmidos control y p21 KO en células A549 control o A549 shp53 previamente tratadas con Bleomicina. Se utiliza azul de tripano para teñir las células muertas. (D) Tinción cristal violeta mostrando células 7 días tras la transducción de los plásmidos control y p21 KO en células A549 control o A549 shp53 previamente tratadas con Bleomicina. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [%]: porcentaje; [C]: A549 pRetroSuper-Blast-EV; [control]: A549 lentiCRISPRv2 hygro; [Control sh]: A549 pRetroSuper-Blast-EV; [p21 KO]: A549 CDKN1A sgRNA; [shp53]: A549 pRetroSuper-Blast-shp53. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: p<0,001; [**]: p<0,01; [*]: p<0,05; [ns]: no significativo. (n=3)

3 CARACTERIZACIÓN DE SENESCENCIA CELULAR TRAS QUIMIOTERAPIA EN CÉLULAS QUE NO EXPRESAN P21

El tratamiento con quimioterapia en células p21 KO induce muerte celular, aunque no todas las células que forman parte del cultivo responden de la misma forma. Las células que permanecen viables podrían haber entrado en un estado de senescencia celular. Por ende, es necesario analizar distintos marcadores de senescencia en estas células.

3.1 MARCADORES DE SENESCENCIA TRAS QUIMIOTERAPIA EN CÉLULAS QUE NO EXPRESAN P21

En células A549 control y A549 p21 KO tratadas con Bleomicina aumentan la expresión del gen *SERPINE1* y el porcentaje de células positivas para la tinción SA β G (**Figura 22A-C**). Al terminar el tratamiento, las células se sembraron igualando el número entre condiciones y luego se trataron con el senolítico Navitoclax, que es capaz de eliminar específicamente células senescentes. El porcentaje de muerte celular después del tratamiento con Navitoclax es similar en células previamente tratadas con Bleomicina, sean A549 control o A549 p21 KO (**Figura 22D-F**).

Para comprobar si la disminución de los niveles de p53 en células A549 p21 KO podría afectar a la inducción de senescencia con Bleomicina se generó la línea celular estable A549 shp53 + p21 KO. El tratamiento con Bleomicina resulta en un aumento del marcador de daño en el ADN P- γ H2AX y un incremento del porcentaje de células positivas para la tinción SA β G. Estos resultados no difieren de los que presentan las células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina (**Figura 23**).

También se comprobó la inducción de senescencia con los quimioterápicos Cisplatino, Doxorrubicina, Etopósido o Gemcitabina para comprobar si las células viables tras el tratamiento expresaban marcadores de senescencia de forma similar a las células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina. El resto de quimioterápicos también aumentan el tamaño celular y el porcentaje de células positivas para la tinción SA β G de forma equiparable entre células A549 control y células A549 p21 KO (**Figura 24**).

En el caso de una línea celular distinta que tampoco expresa p21, MCF7 p21 KO, el tratamiento con Bleomicina aumenta el tamaño medio de las células y el porcentaje de células teñidas con la tinción SA β G (**Figura 25**).

3.2 MARCADORES DE SENESCENCIA EN CÉLULAS SENESCENTES A LAS QUE SE REDUCEN LOS NIVELES DE P21

Con la finalidad de determinar si disminuir los niveles de p21 después del establecimiento de senescencia celular afecta al estado senescente; se indujo senescencia utilizando Bleomicina y luego se realizó la transducción del vector lentiviral p21 KO. Posteriormente, se mantuvieron estas células durante 7 días añadiendo Higromicina B. Este procedimiento se realizó tanto en células A549 shp53 como en células A549 con el vector control correspondiente, para así poder evaluar si los niveles reducidos de p53 podrían alterar los resultados (**Figura 26A**). En ambos casos se observa que las células tratadas con Bleomicina y transducidas con el vector p21 KO tienen mayor tamaño que las células tratadas con vehículo (**Figura 26B**). Además, el porcentaje de células positivas para la tinción SA β G también aumenta (**Figura 26C**). Los niveles de P- γ H2AX están incrementados al finalizar el tratamiento con Bleomicina en las células control y disminuyen 7 días después. Sin embargo, en las células A549 p21 KO no se reducen de una forma equiparable a las células control (**Figura 26D**).

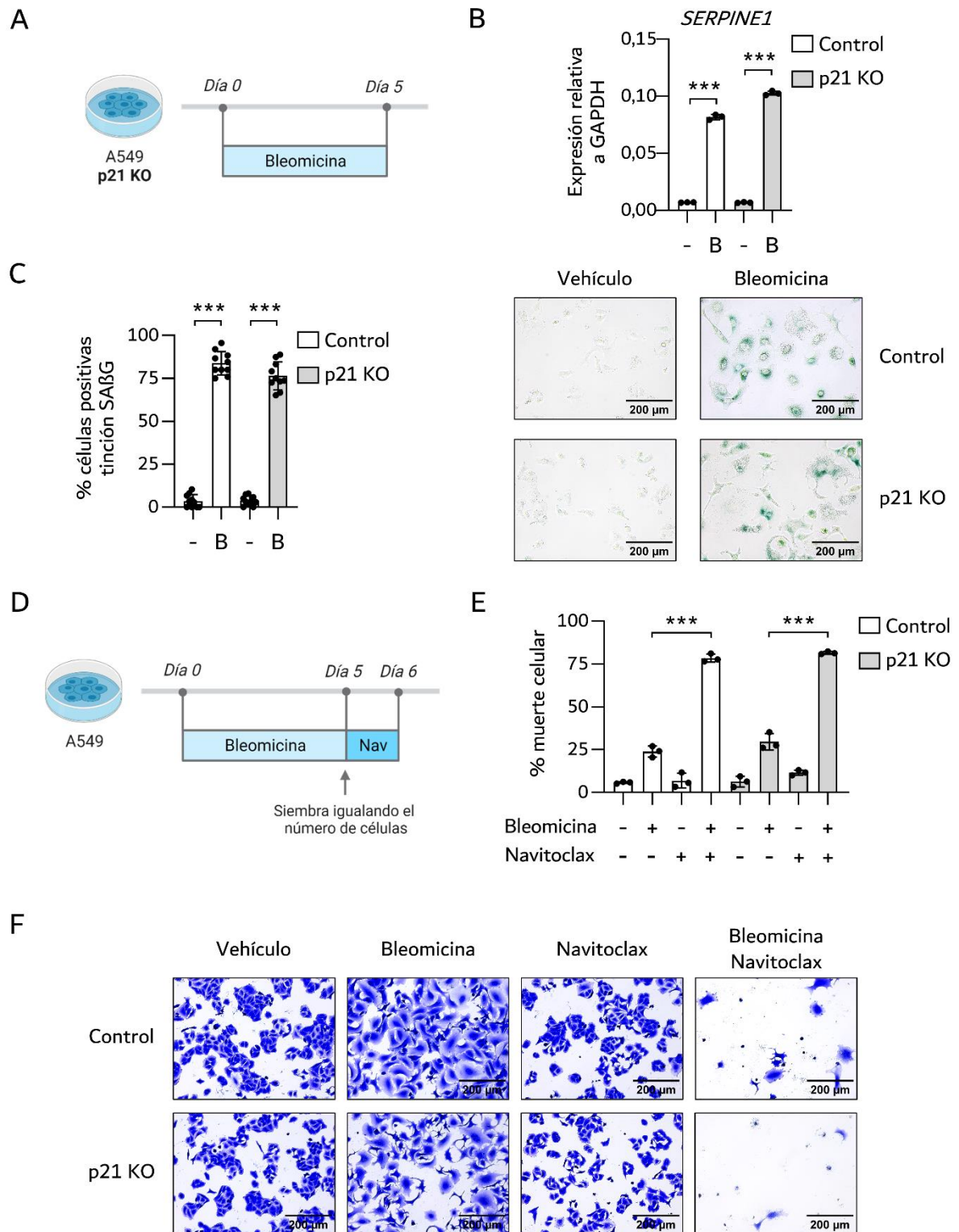


Figura 22. Marcadores de senescencia en células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Análisis mediante PCR cuantitativa de la expresión de ARN mensajero del gen *SERPINE1* en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se muestra la expresión relativa al gen *GAPDH*. (C) Cuantificación del porcentaje de células positivas para la tinción SAβG 5 días después de administrar vehículo o Bleomicina (izquierda) e imágenes representativas de la tinción (derecha). (D) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (E) Análisis de la muerte celular en células A549 control y A549 p21 KO tratadas con Bleomicina y/o Navitoclax. Se utiliza azul de

tripano para teñir las células muertas. (F) Tinción cristal violeta mostrando células A549 control y A549 p21 KO tratadas con Bleomicina y/o Navitoclax. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [Nav]: Navitoclax; [%]: porcentaje; [SAβG]: β-galactosidasa asociada a senescencia. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: $p < 0,001$; [**]: $p < 0,01$; [*]: $p < 0,05$; [ns]: no significativo. (n=3)

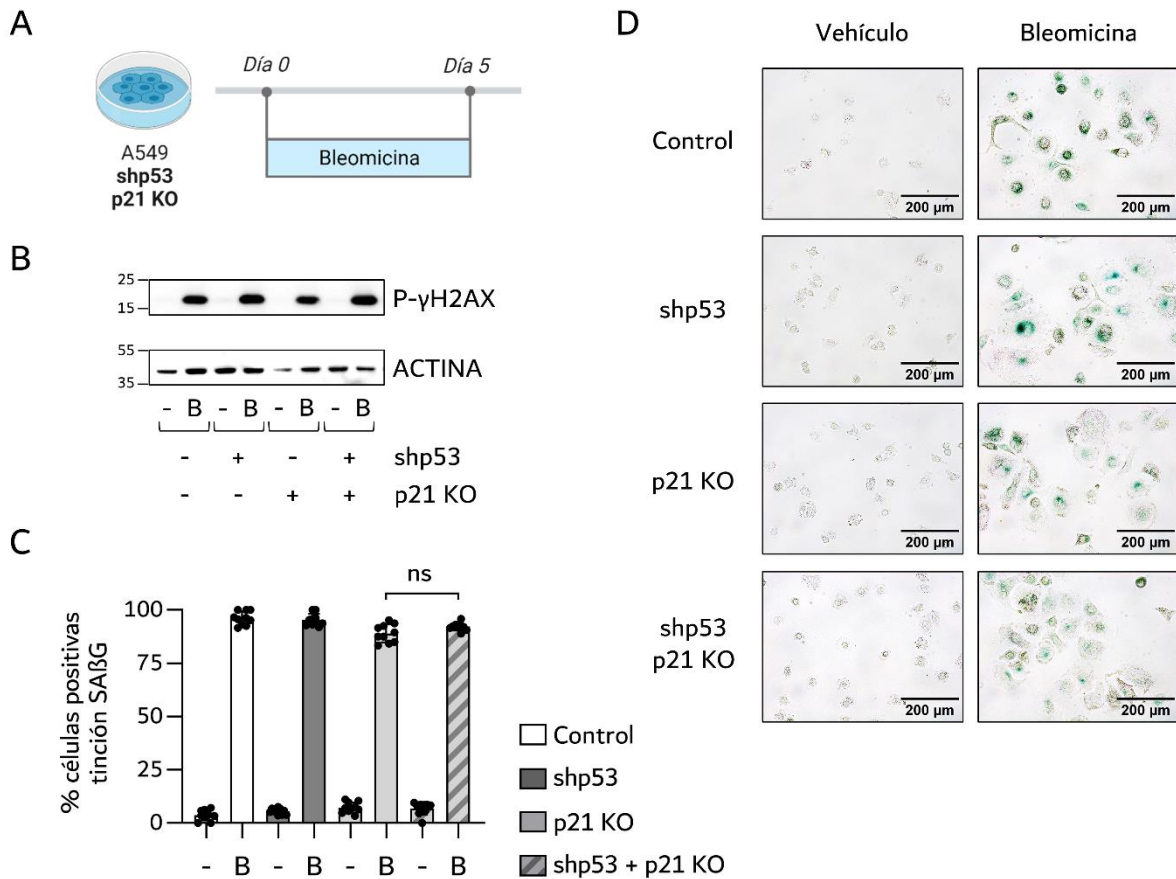


Figura 23. Marcadores de senescencia en células A549 shp53 + p21 KO tratadas con Bleomicina. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Western blot mostrando el nivel de expresión de la proteína P-γH2AX en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se utiliza ACTINA como control de carga. A la izquierda se indica la posición del marcador de peso molecular en kilodaltons. (C) Cuantificación del porcentaje de células positivas para la tinción SAβG 5 días después de administrar vehículo o Bleomicina (D) Imágenes representativas de la tinción SAβG. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [%]: porcentaje; [SAβG]: β-galactosidasa asociada a senescencia; [control]: A549 con ambos vectores control; [shp53]: A549 shp53 y control de p21 KO; [p21 KO]: A549 p21 KO y control de shp53; [shp53 + p21 KO]: A549 shp53 + p21 KO. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: $p < 0,001$; [**]: $p < 0,01$; [*]: $p < 0,05$; [ns]: no significativo. (n=3)

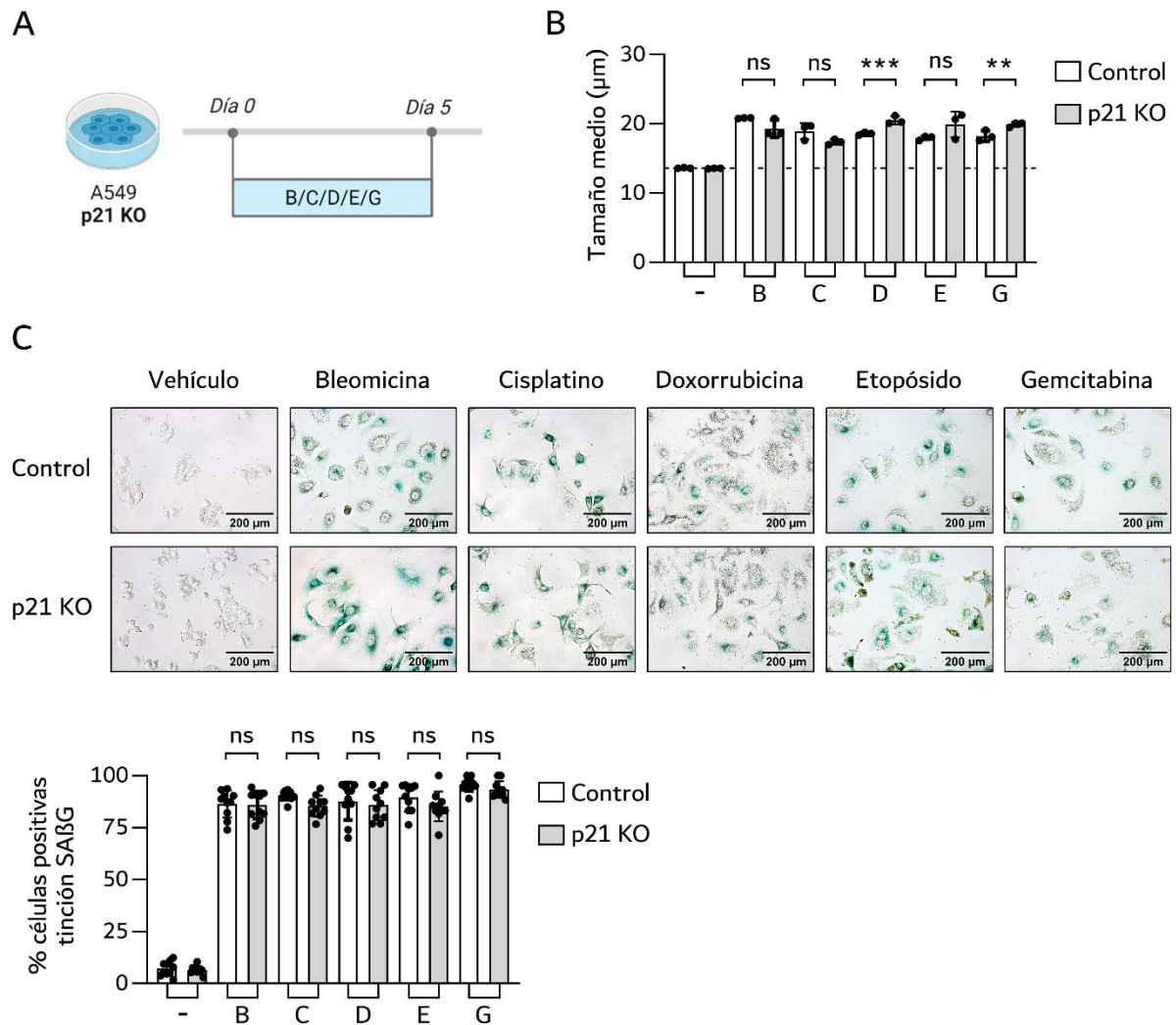


Figura 24. Marcadores de senescencia en células A549 p21 KO tratadas con otros quimioterápicos. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Tamaño medio de células A549 control y células A549 p21 KO tratadas con vehículo, Bleomicina, Cisplatino, Doxorubicina, Etopósido o Gemcitabina (C) Imágenes representativas de la tinción SABG después de administrar vehículo, Bleomicina, Cisplatino, Doxorubicina, Etopósido o Gemcitabina (arriba) y cuantificación del porcentaje de células positivas para la tinción (abajo). Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [C]: Cisplatino; [D]: Doxorubicina; [E]: Etopósido; [G]: Gemcitabina; [%]: porcentaje; [SABG]: β -galactosidasa asociada a senescencia. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: $p < 0,001$; [**]: $p < 0,01$; [*]: $p < 0,05$; [ns]: no significativo. (n=3)

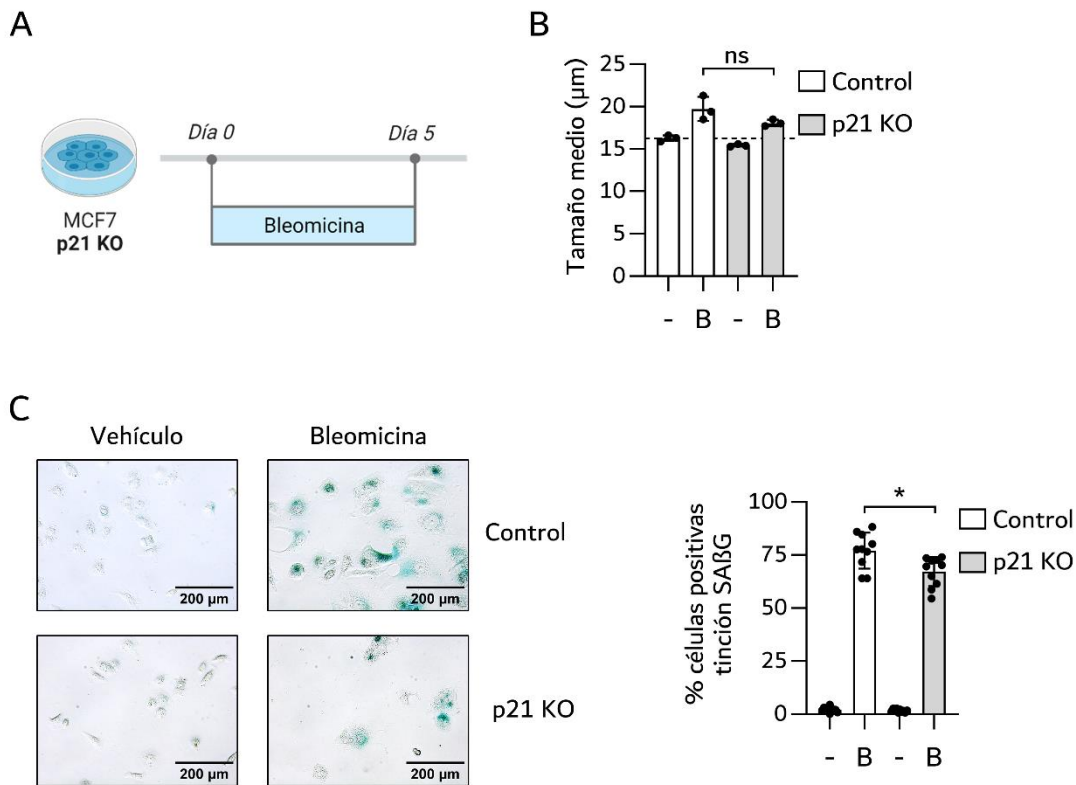


Figura 25. Marcadores de senescencia en células MCF7 p21 KO tratadas con Bleomicina. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Tamaño medio de células MCF7 control y células MCF7 p21 KO tratadas con vehículo o Bleomicina (C) Imágenes representativas de la tinción SA β G después de administrar vehículo o Bleomicina (izquierda) y cuantificación del porcentaje de células positivas para la tinción (derecha). Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [%]: porcentaje; [SA β G]: β -galactosidasa asociada a senescencia. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: $p < 0,001$; [**]: $p < 0,01$; [*]: $p < 0,05$; [ns]: no significativo. (n=3)

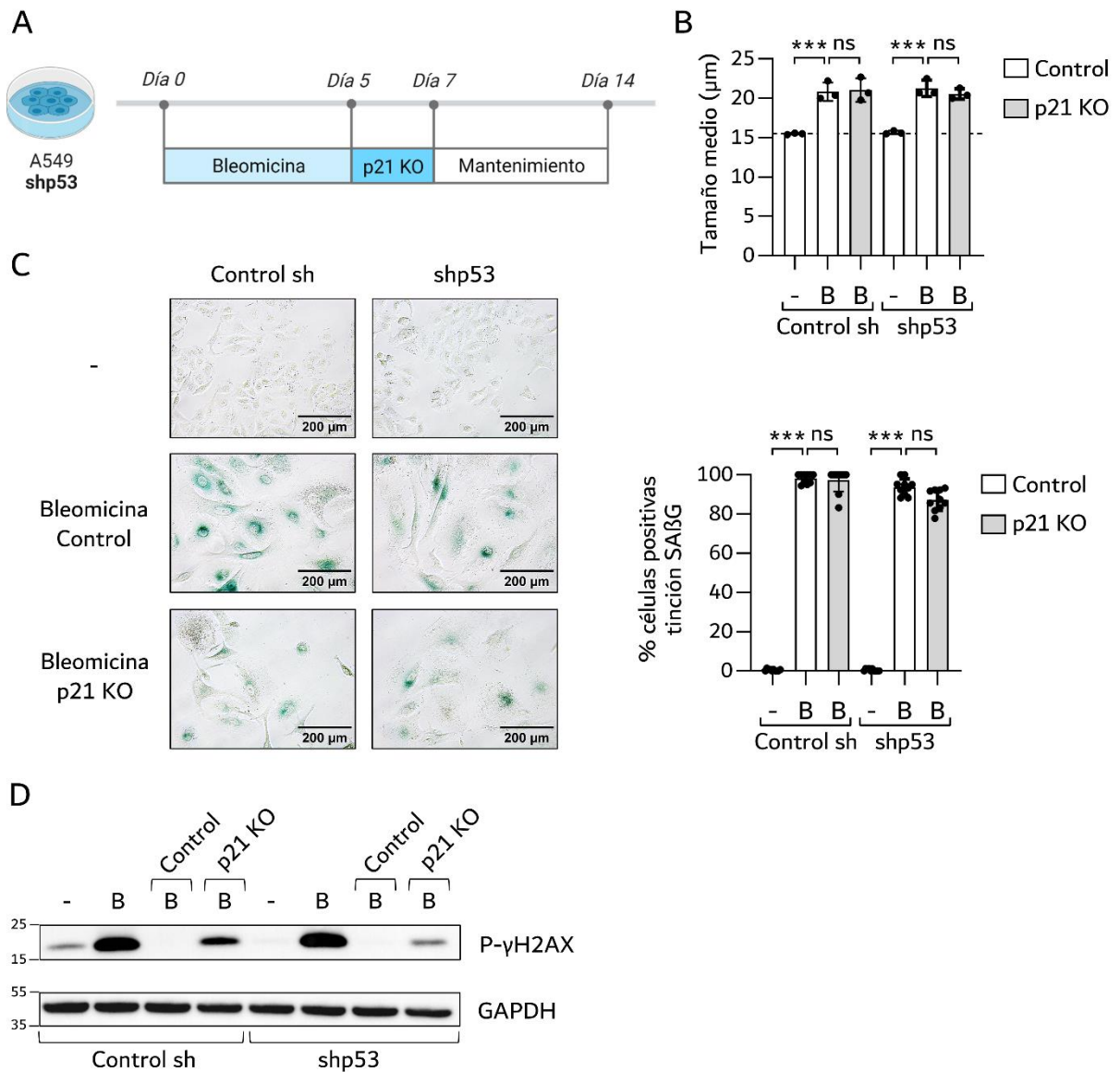


Figura 26. Marcadores de senescencia en células A549 shp53 tratadas con Bleomicina y transducidas con el vector p21 KO. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Tamaño medio de células A549 con el control de shp53 y células A549 shp53 tratadas con vehículo o Bleomicina y transducidas con el vector control o p21 KO (C) Imágenes representativas de la tinción SAβG (izquierda) y cuantificación del porcentaje de células positivas para la tinción (derecha). (D) Western blot mostrando el nivel de expresión de la proteína P-γH2AX en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se utiliza GAPDH como control de carga. A la izquierda se indica la posición del marcador de peso molecular en kilodaltons. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [control]: A549 lentiCRISPR2 hygro; [Control sh]: A549 pRetroSuper-Blast-EV; [p21 KO]: A549 CDKN1A sgRNA; [shp53]: A549 pRetroSuper-Blast-shp53; [SAβG]: β-galactosidasa asociada a senescencia; [%]: porcentaje. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: p<0,001; [**]: p<0,01; [*]: p<0,05; [ns]: no significativo. (n=3)

3.3 ESTABILIDAD DE LA DETENCIÓN DEL CICLO CELULAR

Se evaluó la viabilidad celular 14 días después de finalizar el tratamiento con Bleomicina utilizando MTT (**Figura 27A**). En el caso de las células A549 p21 KO, los resultados son muy dispares entre pocillos, ya que en 8 de ellos la viabilidad es inferior a la de las células A549 control tratadas con Bleomicina y en otros 4 es muy superior (**Figura 27B-C**). Esto no ocurre en el caso de las células MCF7 p21 KO tratadas con Bleomicina, cuya viabilidad disminuye de forma homogénea dentro de la misma condición experimental con el paso del tiempo (**Figura 27D**).

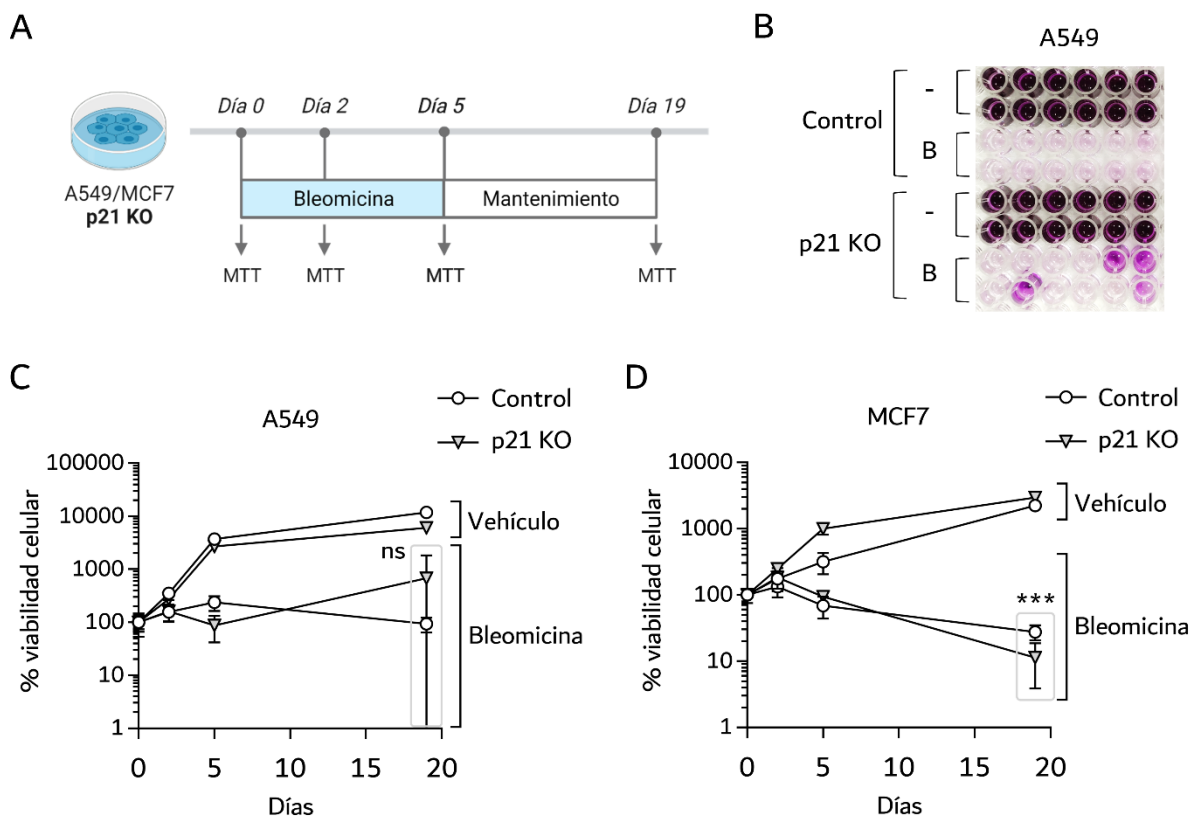


Figura 27. Análisis de la viabilidad celular tras 14 días en células A549 y MCF7 p21 KO tratadas con Bleomicina. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Imagen de la placa de cultivo en la que se sembraron y trataron las células A549 tras la incubación con MTT. (C) Viabilidad celular de las células A549 control y A549 p21 KO al inicio del tratamiento, a los 2 días del tratamiento con Bleomicina, a los 5 días del tratamiento con Bleomicina y 14 días después de haber finalizado el tratamiento. Se considera el valor obtenido en el día 0 como valor de referencia para el cálculo del porcentaje de viabilidad. Se utiliza una escala logarítmica para el eje vertical. (D) Viabilidad celular de las células MCF7 control y MCF7 p21 KO al inicio del tratamiento, a los 2 días del tratamiento con Bleomicina, a los 5 días del tratamiento con Bleomicina y 14 días después de haber finalizado el tratamiento. Se considera el valor obtenido en el día 0 como valor de referencia para el cálculo del porcentaje de viabilidad. Se utiliza una escala logarítmica para el eje vertical. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [control]: lentiCRISPRv2 hygro; [MTT]: análisis de la viabilidad celular utilizando MTT; [p21 KO]: CDKN1A sgRNA; [%]: porcentaje. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: $p < 0,001$; [**]: $p < 0,01$; [*]: $p < 0,05$; [ns]: no significativo. (n=3)

La variabilidad entre pocillos de células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina tras 14 días podría deberse a que algunas de las células tengan capacidad proliferativa. Para comprobarlo, una vez finalizado el tratamiento se sembraron las células a baja densidad y se mantuvo el cultivo durante 14 días (**Figura 28A**). Si bien las células MCF7 p21 KO tratadas con Bleomicina no proliferan, las células A549 p21 KO son capaces de formar colonias (**Figura**

28B-C). Esto también ocurre cuando el tratamiento que reciben las células A549 p21 KO es Cisplatino o Gemcitabina (**Figura 28C**). Asimismo, las células A549 shp53 + p21 KO tienen capacidad para proliferar una vez retirado el tratamiento con Bleomicina (**Figura 28D**). Las células A549 control o A549 shp53 senescentes que luego son transducidas con el vector p21 KO no son capaces de volver a entrar en el ciclo celular (**Figura 28E-G**).

Recopilando los resultados anteriores, las células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina muestran marcadores de senescencia, aunque son capaces de formar colonias 14 días después de finalizar el tratamiento. Para descifrar si las células que proliferan se encuentran en un estado senescente al finalizar el tratamiento, se realizó un experimento en el que se utilizó Navitoclax para eliminar específicamente a las células senescentes y sembrar a baja densidad a las células que sobreviven a Navitoclax para ver si son capaces de proliferar tras 14 días (**Figura 29A**). La eliminación de las células sensibles a Navitoclax resulta en un aumento no significativo del número de colonias que se forman y en un aumento significativo de su área (**Figura 29B-D**). Se puede observar que las colonias de células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina se encuentran rodeadas por células positivas para la tinción SA β G, mientras que las células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina y luego Navitoclax se encuentran rodeadas por células negativas para esta tinción, lo que indica que el uso de Navitoclax ha permitido eliminar a las células positivas para este marcador de senescencia (**Figura 29E**).

Por otra parte, debido a que el tratamiento con Palbociclib previene la muerte de células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina, se consideró la posibilidad de que el inhibidor de CDKs pudiese facilitar la inducción de senescencia con Bleomicina. Para comprobarlo, se realizó un tratamiento con Palbociclib seguido por Bleomicina \pm Palbociclib (**Figura 30A**), que resultó en un aumento de la tinción SA β G y del tamaño medio celular (**Figura 30B-D**). Posteriormente se sembraron las células a baja densidad y se mantuvo el cultivo durante 14 días sin añadir ningún tratamiento. El número de colonias de células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina se reduce si se trata previamente con Palbociclib, que en caso de mantenerse durante el tratamiento con Bleomicina es capaz de impedir la formación de colonias de células proliferativas (**Figura 30E-F**).

3.4 RESPUESTA DE LAS CÉLULAS P21 KO SUPERVIVIENTES A BLEOMICINA

Para concluir la caracterización de la senescencia inducida por quimioterapia en células de cáncer, resulta interesante indagar sobre las células supervivientes al tratamiento con quimioterapia que tienen capacidad para proliferar. Con este fin, se obtuvo una línea A549 p21 KO formada por las células supervivientes al tratamiento con Bleomicina (A549 p21 KO SV), que se expandieron partiendo de las colonias formadas tras 14 días sin tratamiento (**Figura 31A**). Las células A549 p21 KO SV se trataron con Bleomicina para comprobar si respondían de igual forma que las células A549 p21 KO (**Figura 31B**). En ambas líneas celulares aumenta la expresión de p53, pero esto no resulta en un aumento de p21, indicando que en ambas líneas se reducen adecuadamente los niveles de p21 (**Figura 31C**). Las células A549 p21 KO SV continúan proliferando durante el tratamiento con Bleomicina (**Figura 31D-E**) y no son positivas para la tinción SA β G (**Figura 32A-B**). Al sembrarlas a baja densidad y mantenerlas durante 14 días, proliferan de forma similar a aquellas tratadas con vehículo (**Figura 32C**).

Finalmente, se comprobó que el tratamiento de estas células con otros quimioterápicos que dañan el ADN como Cisplatino o Gemcitabina afecta de una forma similar tanto a las células A549 p21 KO como a las células A549 p21 KO SV, provocando una disminución del número de células. Adicionalmente, el tratamiento con Palbociclib aminora su proliferación y no induce muerte celular en ninguna de las líneas celulares (**Figura 33**).

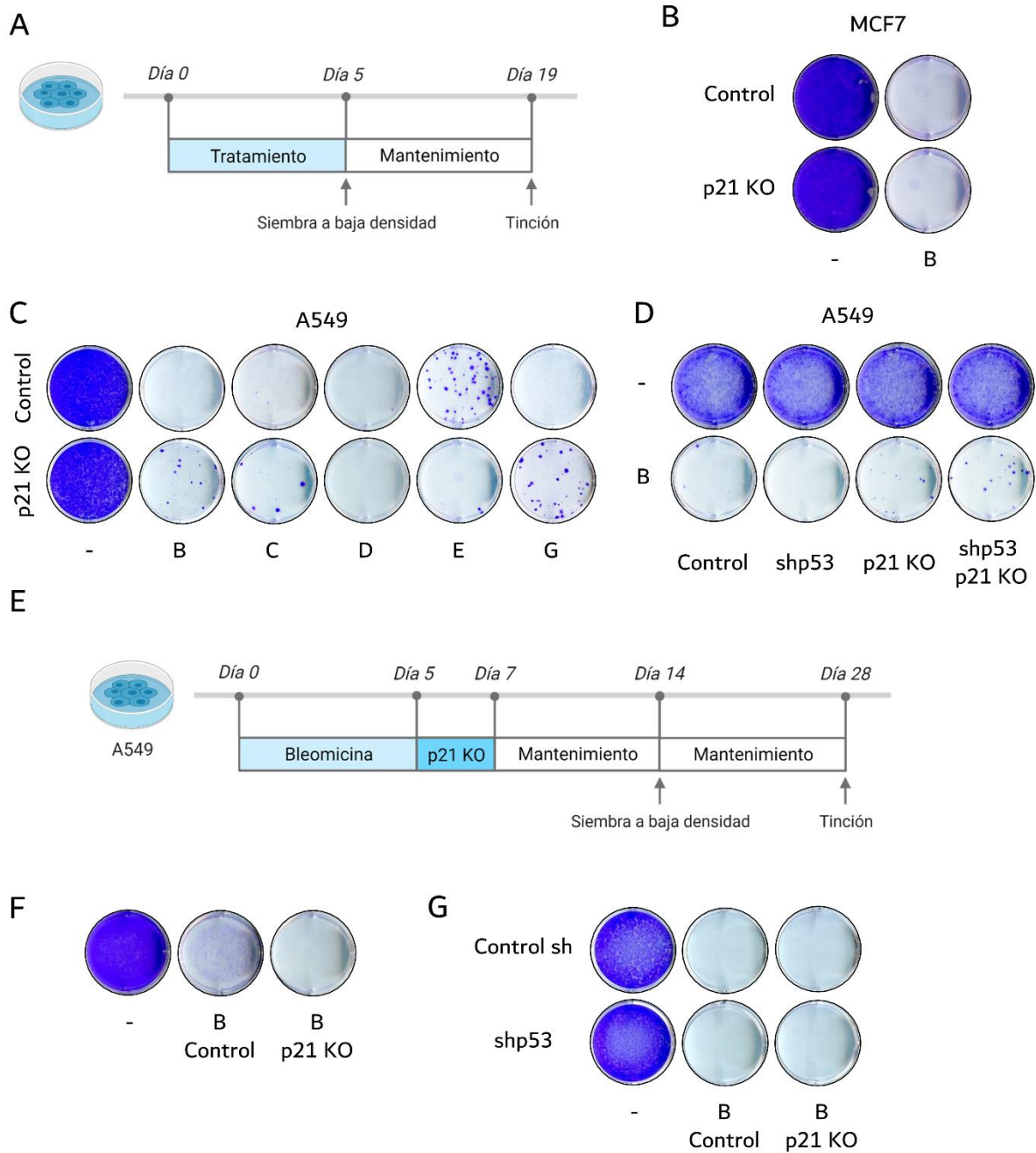


Figura 28. Estabilidad de la detención del ciclo celular en células p21 KO. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Tinción cristal violeta 14 días después de sembrar a baja densidad células MCF7 control y células MCF7 p21 KO tratadas con vehículo o Bleomicina. (C) Tinción cristal violeta 14 días después de sembrar a baja densidad células A549 control y células A549 p21 KO al finalizar los tratamientos indicados. (D) Tinción cristal violeta 14 días después de sembrar a baja densidad células A549 control, A549 shp53, A549 p21 KO y A549 shp53 + p21 KO tratadas con vehículo o Bleomicina. (E) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (F) Tinción cristal violeta mostrando células A549 tratadas con vehículo o Bleomicina y luego transducidas con p21 KO o su vector control, tras lo cual se sembraron a baja densidad y mantuvieron durante 14 días sin añadir ningún tratamiento. (G) Tinción cristal violeta mostrando células A549 control o A549 shp53 tratadas con vehículo o Bleomicina y luego transducidas con p21 KO o su vector control, tras lo cual se sembraron a baja densidad y se mantuvieron durante 14 días sin añadir ningún tratamiento. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [C]: Cisplatino; [D]: Doxorubicina; [E]: Etopósido; [G]: Gemcitabina; [control]: A549 lentiCRISPRv2 hygro; [Control sh]: A549 pRetroSuper-Blast-EV; [p21 KO]: A549 CDKN1A sgRNA; [shp53]: A549 pRetroSuper-Blast-shp53; [%]: porcentaje. (n=3)

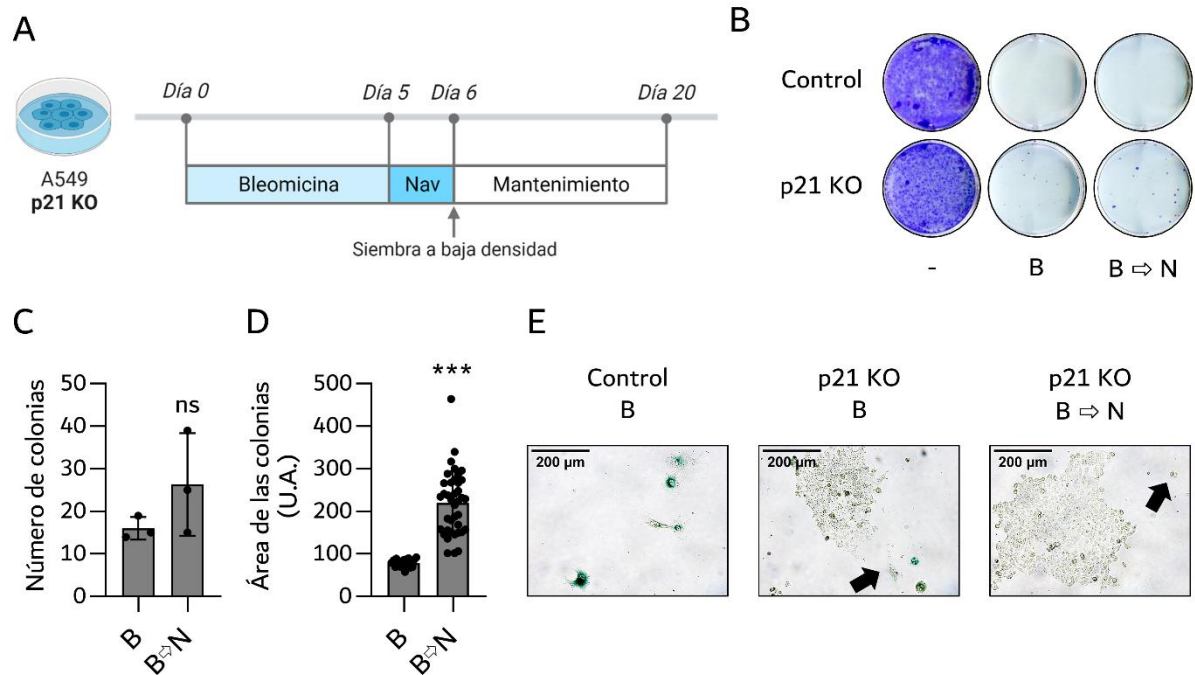


Figura 29. Análisis de la capacidad proliferativa de células A549 p21 KO tratadas con Navitoclax después del tratamiento con Bleomicina. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Tinción cristal violeta mostrando células A549 control y células A549 p21 KO tratadas con vehículo o Bleomicina y posteriormente con vehículo o Navitoclax. Una vez finalizado este último tratamiento se sembraron a baja densidad y se mantuvieron 14 días sin añadir ningún tratamiento. (C) Cuantificación del número de colonias de células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina y posteriormente con vehículo o Navitoclax. (D) Determinación del área de las colonias de células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina y posteriormente con vehículo o Navitoclax. (E) Imágenes representativas de la tinción SAβG. Las flechas señalan las células que se encuentran en las inmediaciones de las colonias. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [N]: Navitoclax; [B→N]: Bleomicina seguida de Navitoclax; [control]: lentiCRISPRv2 hygro; [p21 KO]: CDKN1A sgRNA; [SAβG]: β-galactosidasa asociada a senescencia; [%]: porcentaje. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: p<0,001; [**]: p<0,01; [*]: p<0,05; [ns]: no significativo. (n=3)

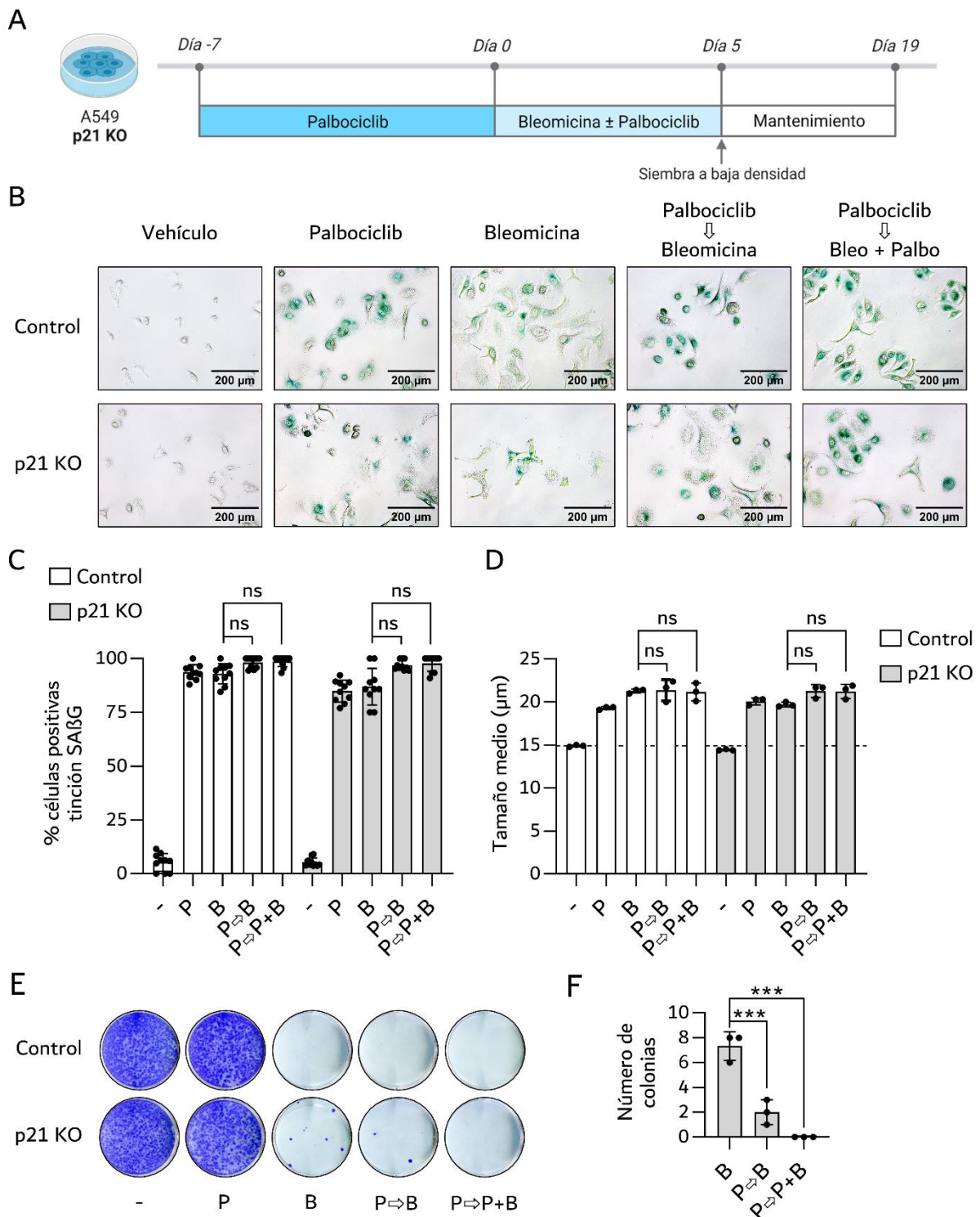


Figura 30. Marcadores de senescencia tras Palbociclib y Bleomicina en células A549 control y A549 p21 KO. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Imágenes representativas de la tinción SABG después de administrar vehículo, Palbociclib, Bleomicina o Palbociclib seguido de Bleomicina ± Palbociclib en células A549 control y A549 p21 KO. (C) Cuantificación del porcentaje de células positivas para la tinción. (D) Tamaño medio de estas células. (E) Tinción cristal violeta tras sembrar las células a baja densidad y mantenerlas 14 días sin tratamiento. (F) Cuantificación del número de colonias. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [Bleo]: Bleomicina; [P]: Palbociclib; [Palbo]: Palbociclib; [P⇒B]: Palbociclib seguido de Bleomicina; [P⇒P+B]: Palbociclib seguido de Palbociclib y Bleomicina; [%]: porcentaje; [control]: A549 lentiCRISPRv2 hygro; [p21 KO]: A549 CDKN1A sgRNA. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: p<0,001; [**]: p<0,01; [*]: p<0,05; [ns]: no significativo. (n=3)

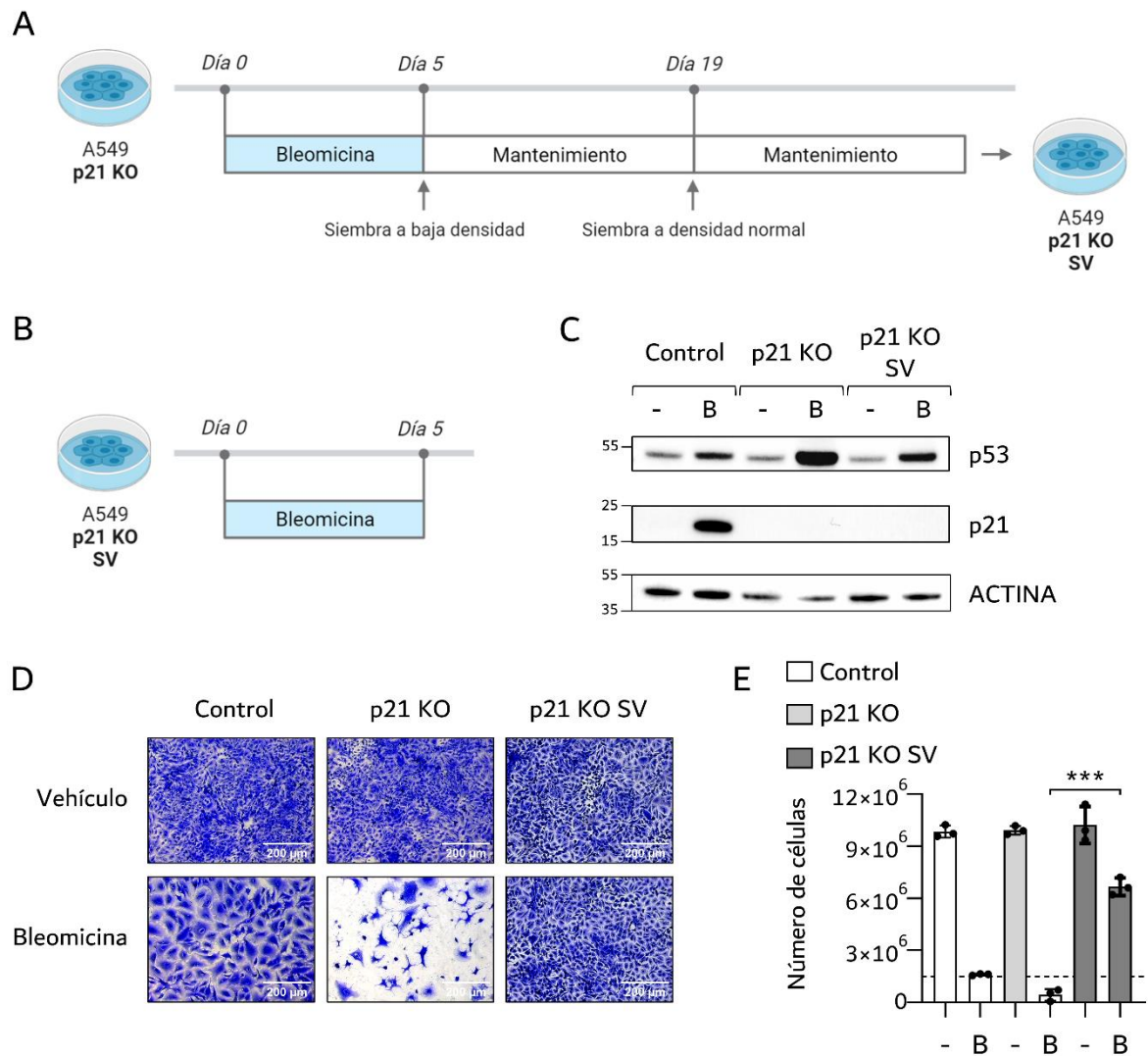


Figura 31. Respuesta al tratamiento con Bleomicina en células A549 p21 KO SV. (A) Representación esquemática del diseño experimental seguido para obtener la línea A549 p21 KO SV. Creada utilizando Biorender.com. (B) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Western blot mostrando el nivel de expresión de las proteínas p53 y p21 en células tratadas con vehículo o Bleomicina. Se utiliza ACTINA como control de carga. A la izquierda se indica la posición del marcador de peso molecular en kilodaltons. (D) Tinción cristal violeta mostrando células A549 control, células A549 p21 KO y células A549 p21 KO SV tratadas durante 5 días con vehículo o Bleomicina. (E) Número de células 5 días después de administrar vehículo o Bleomicina. La línea horizontal discontinua representa el número de células sembrado el día 0. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [%]: porcentaje; [control]: lentiCRISPRv2 hygro; [p21 KO]: CDKN1A sgRNA; [p21 KO SV]: células A549 con el vector CDKN1A sgRNA que sobrevivieron al tratamiento con Bleomicina y proliferaron. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: $p < 0,001$; [**]: $p < 0,01$; [*]: $p < 0,05$; [ns]: no significativo. (n=3)

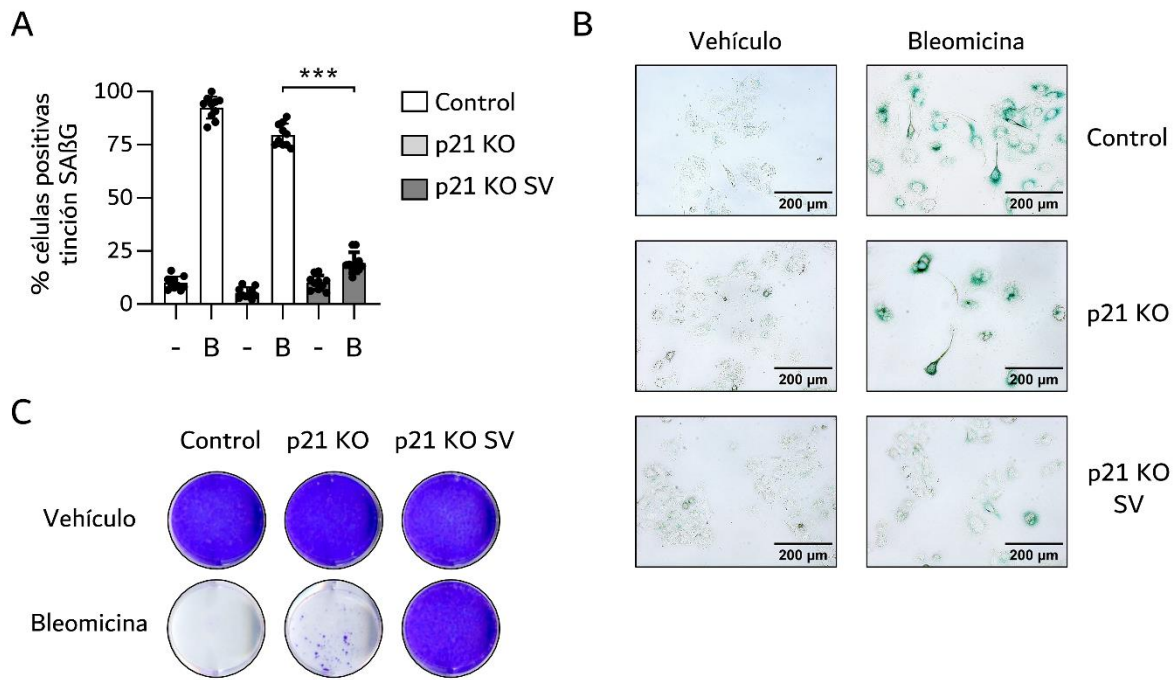


Figura 32. Marcadores de senescencia en células A549 p21 KO SV tratadas con Bleomicina. (A) Cuantificación del porcentaje de células positivas para la tinción SAβG tras 5 días de tratamiento con Bleomicina. (B) Imágenes representativas de la tinción SAβG. (C) Tinción cristal violeta tras finalizar el tratamiento con Bleomicina, sembrar las células a baja densidad y mantenerlas 14 días sin tratamiento. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [%]: porcentaje; [control]: lentiCRISPRv2 hygro; [p21 KO]: CDKN1A sgRNA; [p21 KO SV]: células A549 con el vector CDKN1A sgRNA que sobrevivieron al tratamiento con Bleomicina y proliferaron. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: $p < 0,001$; [**]: $p < 0,01$; [*]: $p < 0,05$; [ns]: no significativo. (n=3)

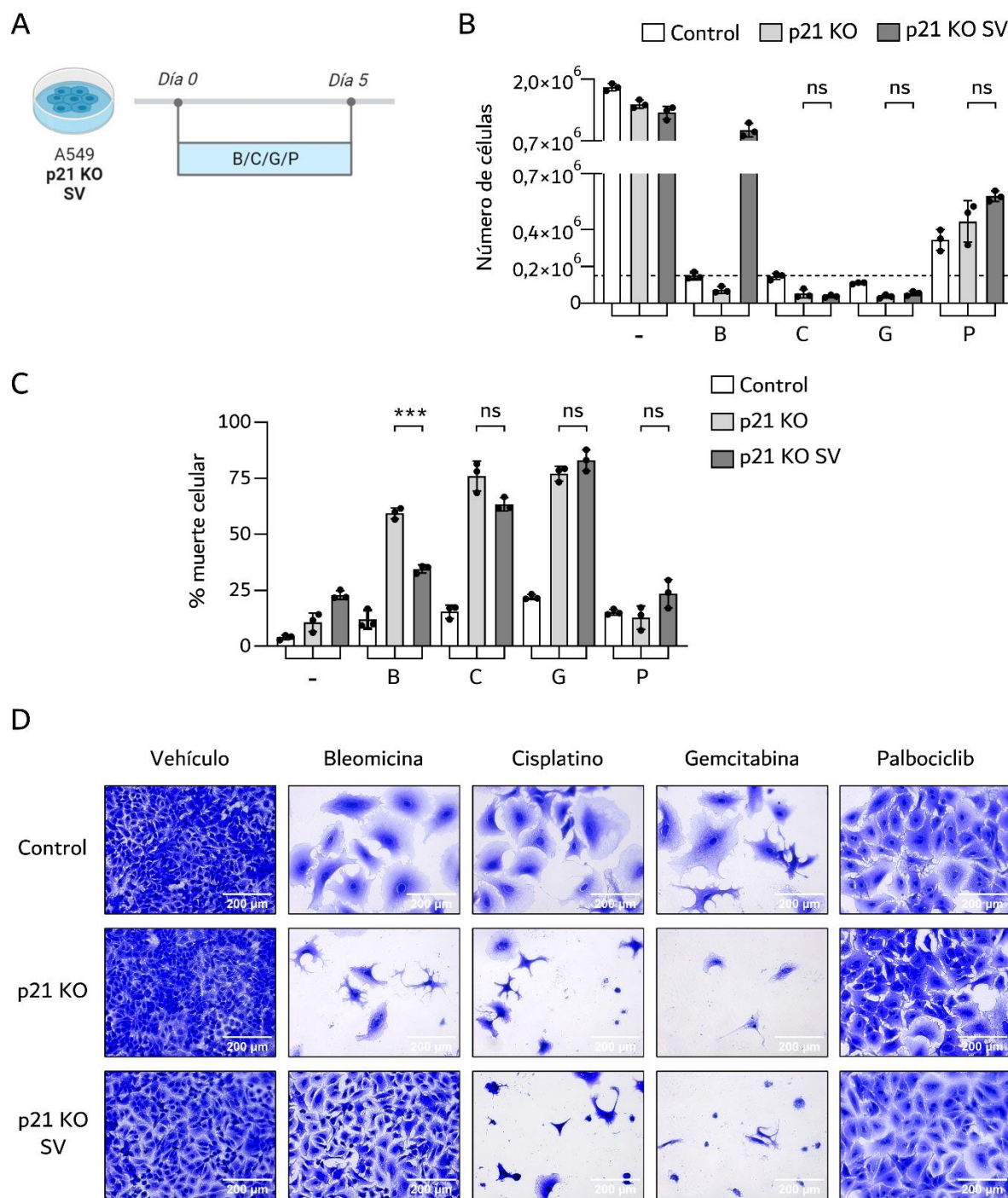


Figura 33. Respuesta de las células A549 p21 KO SV al tratamiento con Cisplatino, Gemcitabina o Palbociclib. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Creada utilizando Biorender.com. (B) Número de células 5 días después de administrar los distintos tratamientos. La línea horizontal discontinua representa el número de células sembrado el día 0, el eje está truncado para poder distinguir los valores de la parte inferior. (C) Análisis de la muerte celular al finalizar los tratamientos. Se utiliza azul de tripano para teñir las células muertas. (D) Tinción cristal violeta mostrando células A549 control, A549 p21 KO y A549 p21 KO SV al finalizar los tratamientos. Abreviaturas utilizadas: [-]: vehículo; [B]: Bleomicina; [C]: Cisplatino; [D]: Doxorrubicina; [E]: Etopósido; [G]: Gemcitabina; [%]: porcentaje; [control]: lentiCRISPRv2 hygro; [p21 KO]: CDKN1A sgRNA; [p21 KO SV]: células A549 con el vector CDKN1A sgRNA que sobrevivieron al tratamiento con Bleomicina y proliferaron. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas: [***]: $p < 0,001$; [**]: $p < 0,01$; [*]: $p < 0,05$; [ns]: no significativo. (n=3)



DISCUSIÓN

La inducción de senescencia celular previene la proliferación de células que no se encuentran en condiciones óptimas, por lo que se considera que protege al organismo de la aparición de cáncer (Gorgoulis *et al.*, 2019). Se ha demostrado que distintos quimioterápicos que se utilizan en el tratamiento contra el cáncer son capaces de provocar la entrada en senescencia, aunque también pueden eliminar a las células (Wang *et al.*, 2020). Es necesario conocer el papel de cada una de las proteínas que intervienen en la respuesta a la quimioterapia, a fin de comprender los puntos clave que determinan el resultado. El propósito de este trabajo es indagar sobre la entrada en senescencia y su mantenimiento, para lo cual es necesario utilizar un modelo en el que el tratamiento con quimioterapia induzca senescencia. El quimioterápico Bleomicina, que provoca daño en el ADN, ha demostrado inducir senescencia celular previamente en la línea de adenocarcinoma pulmonar humano A549 (Aoshiba *et al.*, 2003); de modo que el punto de partida de la presente tesis fue replicar estos resultados.

Las células A549 tratadas con Bleomicina son incapaces de proliferar a lo largo del tratamiento y tampoco lo hacen cuando este se retira. Asimismo, se observa un elevado porcentaje de células positivas para la tinción SA β G y un aumento de la expresión de las proteínas p53, p21 y de algunos genes que codifican proteínas pertenecientes al SASP. De acuerdo con las últimas recomendaciones (Gorgoulis *et al.*, 2019), se ha identificado con precisión a las células senescentes realizando primeramente un cribado de senescencia utilizando la tinción SA β G y verificando luego el estado senescente con otros marcadores como son la expresión de p21 y la ausencia de proliferación, además de detectar marcadores específicos como el incremento del SASP. Este modelo permite estudiar el papel de p53 y p21, que se ha descrito que pertenecen a la vía molecular con mayor importancia en la inducción de senescencia mediante daño en el ADN. Adicionalmente, se ha estudiado el papel de RB debido a su relevancia para la detención del ciclo celular (Matthews *et al.*, 2022).

1 PAPEL DE P53, P21 Y RB EN LA INDUCCIÓN DE SENESCENCIA CON BLEOMICINA

1.1 PAPEL DE P53 EN LA INDUCCIÓN DE SENESCENCIA CON BLEOMICINA

La expresión de la proteína p53 ha demostrado ser imprescindible para la inducción de senescencia celular con distintos quimioterápicos, como por ejemplo los inhibidores de las topoisomerasas (Chang, Xuan, *et al.*, 1999; Elmore *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2002; te Poele *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004) o los agentes alquilantes (Schmitt *et al.*, 2002; Ge *et al.*, 2012).

La expresión de esta proteína aumenta en las células A549 tratadas con Bleomicina, de modo que es posible que resulte esencial para la inducción de senescencia celular en el modelo utilizado. Para descubrir si es así, se generó una línea celular estable con una reducción de la expresión de p53 y se comprobó que el vector efectivamente reducía los niveles de expresión de ARN mensajero y proteína de forma muy notable. Tras el tratamiento con Bleomicina se observó una disminución de la proliferación y un aumento de la tinción SA β G y la expresión de algunos miembros del SASP, que era capaz de inducir senescencia paracrina. Estos resultados son análogos a los de las células que no tienen limitaciones para expresar p53, de modo que la reducción de los niveles de p53 no tuvo repercusión en la entrada en senescencia.

A pesar de que se ha descrito la inducción de senescencia con quimioterapia en algunas líneas celulares que no expresan p53 (Chang, Broude, *et al.*, 1999), la expresión de p16^{INK4a} podría provocar la entrada en senescencia. Debido a que la línea celular A549 carece de la expresión de p16^{INK4a} (Okamoto *et al.*, 1995), no es posible que la inducción de senescencia tras el tratamiento con Bleomicina dependa de esta proteína.

Se observa un incremento de p21 en las células A549 tratadas con Bleomicina en las que se disminuye p53. El aumento de p21 no es tan considerable como en las células no modificadas, pero podría bastar para la inducción de senescencia. Es posible que la reducción de los niveles de p53 en las células A549 no sea suficiente como para impedir que p53 aumente los niveles de expresión de p21 tras el tratamiento. Paralelamente, existe la posibilidad de que p21 aumente de una forma independiente a la expresión de p53, como se ha descrito tras la sobreexpresión de CHK2 en líneas celulares en las que p53 no es funcional (Aliouat-Denis *et al.*, 2005). El papel de p21 también es independiente de p53 en la inducción de senescencia durante el desarrollo embrionario, que no está mediada por daño en el ADN (Muñoz-Espín *et al.*, 2013). Además, es conocido que distintos elementos pueden activar la transcripción de p21 uniéndose a su promotor de una forma independiente a p53 (Abbas y Dutta, 2009). Debido a la importancia que podría tener el aumento de p21, que podría estar mediado por p53 total o parcialmente, el siguiente paso fue realizar un experimento similar disminuyendo su expresión.

1.2 PAPEL DE P21 EN EL MANTENIMIENTO DE LA SENESCENCIA INDUCIDA CON BLEOMICINA

Se utilizó un ARN de horquilla corta inducible para disminuir la expresión de p21, aunque su activación solamente era capaz de reducir los niveles de p21 cuando se realizaba después del establecimiento del estado senescente. La reducción de los niveles de la proteína p21 es mínima y solamente se produce cuando el tratamiento que activa el sistema inducible se alarga hasta 6 días. Esta disminución no afecta a la proliferación ni a la tinción SA β G, aunque disminuye la expresión de algunos genes del SASP y provoca que los factores secretados por las células no sean capaces de inducir senescencia de forma paracrina.

Estos resultados concuerdan con los del grupo de Jan M. van Deursen; que muestran que la reducción de los niveles de p21 tras inducir senescencia utilizando varios estímulos en células primarias también reduce los niveles de expresión de una parte de los factores del SASP. Además, la realización de análisis funcionales durante su investigación permitió detectar una disminución de la migración de macrófagos al reducir los niveles de p21. En contraste, la sobreexpresión de p21 en fibroblastos embrionarios de ratón induce senescencia, provoca un aumento de los factores secretados y aumenta la migración de los macrófagos. La atracción de macrófagos por parte de las células que expresan p21 parece ser esencial para que se eliminen las células hepáticas en las que se induce senescencia tras la sobreexpresión de KRAS^{G12V}. El reclutamiento de macrófagos a los hepatocitos depende también de la expresión de RB, ya que el aumento de p21 no resulta en la atracción de las células inmunes si se deleciona RB. Además, la disminución de los niveles de RB también aminora la expresión de parte de los factores del SASP (Sturmlechner *et al.*, 2021).

1.3 PAPEL DE RB EN LA INDUCCIÓN DE SENESCENCIA CON BLEOMICINA

Debido a la relevancia que podría tener RB, se utilizaron ARNs de horquilla corta para disminuir su expresión en células A549. El tratamiento con Bleomicina en las células no modificadas disminuye los niveles de la proteína RB total; lo que no impide que cese la proliferación, aumente la tinción SA β G y se induzca senescencia paracrina. El uso de ARNs de horquilla corta para reducir los niveles de expresión de RB no afecta a estos marcadores de senescencia tras el tratamiento con Bleomicina. Teniendo en cuenta que Bleomicina reduce los

niveles de RB total en células sin modificar, resulta lógico pensar que una mayor disminución de estos niveles no afecte a la inducción de senescencia.

En células A549, la parada del ciclo celular inducida por el tratamiento con Bleomicina parece tener lugar en la fase G2 (Linge *et al.*, 2007), en la cual la represión génica asociada al tratamiento con Doxorrubicina está asociada a las proteínas p107 y p130, que pertenecen a la misma familia que RB. El papel de RB tiene mayor importancia en las fases G1 y S, en las que coopera con p130 para reprimir la expresión génica. Las proteínas p107 y p130 son capaces de impedir la división celular tras el tratamiento con Doxorrubicina incluso en ausencia de RB y se ha descrito que la delección de RB resulta en un aumento de p107 que podría compensar su ausencia (Schade *et al.*, 2019). Apoyando estos datos, la falta de RB tampoco afecta a la mayoría de los cambios de la expresión génica que se producen como consecuencia de la inducción de senescencia en células primarias por la sobreexpresión de Ras (Chicas *et al.*, 2010). En otros experimentos de esta tesis se ha visto que el tratamiento de células A549 con Bleomicina aumenta los niveles de MDM2. MDM2 puede regular los niveles de RB tras daño en el ADN en las distintas fases del ciclo celular, aumentándolos en las primeras fases y disminuyéndolos en las fases finales (Hernandez-Monge *et al.*, 2021). Por esta razón, el tratamiento con Bleomicina, que detendría el ciclo celular en la fase G2, podría provocar un aumento de la expresión de MDM2 y esta podría disminuir los niveles de la proteína RB.

En la presente tesis no se han examinado los niveles de p107 o p130 tras el tratamiento con Bleomicina, que podrían explicar la entrada en senescencia de las células A549 a pesar de la reducción de los niveles de RB. Aunque sería muy interesante caracterizar en profundidad la contribución de RB, p107 y p130; se decidió centrar la investigación en el papel de p21. Por una parte, esta decisión estuvo motivada porque la delección conjunta de RB, p107 y p130 no es capaz de invertir por completo la represión de los genes de las fases G2 y M que provoca el tratamiento con Doxorrubicina (Schade *et al.*, 2019). Adicionalmente, p21 puede inactivar la transcripción de E2F, lo que posibilitaría que controle su actividad de forma independiente a RB (Delavaine y La Thangue, 1999). Por otra parte, en el presente estudio no se observaron diferencias al reducir notablemente los niveles de p53 o RB con anterioridad a la inducción de senescencia, mientras que una ligera disminución de los niveles de p21 tras el establecimiento del estado senescente fue capaz de afectar a la capacidad de inducir senescencia paracrina. La imposibilidad de reducir los niveles de p21 con anterioridad al tratamiento con Bleomicina generó la necesidad de buscar una herramienta molecular alternativa que permitiese reducir los niveles de p21 en mayor medida. De esta forma, se podría valorar tanto el mantenimiento del estado senescente al retirar p21, como la inducción de senescencia con quimioterapia en células que no expresan p21.

2 EFECTO DE LA AUSENCIA DE P21 ANTERIOR Y POSTERIOR AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA

El sistema seleccionado para reducir los niveles de p21 fue un vector lentiviral que codifica tanto la proteína Cas9 como una guía que se une al gen *CDKN1A*. Se realizó la transducción de forma previa a la inducción de senescencia con Bleomicina en células A549 y también tras el establecimiento del estado senescente. En ambas situaciones se observa una disminución de los niveles de p21 y un aumento de los niveles de las proteínas p53 y MDM2 cortada. De acuerdo con la literatura, la proteína MDM2 se puede unir a p53 para regularla negativamente (Momand *et al.*, 1992); aunque cuando se produce daño en el ADN, ATM fosforila a MDM2, lo que posibilita que aumente la síntesis de p53 y evita su degradación (Gajjar *et al.*, 2012). Por otra

parte, se ha descrito la escisión de MDM2 durante la apoptosis mediada por p53 (Chen *et al.*, 1997). El aumento de p53 y MDM2 cortada coinciden con el aumento de la muerte de células A549 que han sido tratadas con Bleomicina antes o después de suprimir la expresión de p21. Además, en el caso de las células a las que se redujo los niveles de p21 con anterioridad al tratamiento, se observa un aumento del porcentaje de células positivas para el marcador de apoptosis caspasa 3/7 activa. Adicionalmente, se puede apreciar una reducción de la muerte celular cuando se añade el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK de forma simultánea al tratamiento con Bleomicina. Esta disminución permite afirmar que al menos una parte de las células A549 p21 KO entran en apoptosis tras el tratamiento con Bleomicina.

Con la intención de comprobar si prevenir el aumento de p53 evitaría la muerte celular, se utilizaron las líneas celulares generadas previamente en las que se reducen los niveles de p53; que fueron transducidas con el vector p21 KO antes o después del tratamiento con Bleomicina. En ambos casos se observó un aumento de la muerte en las células p21 KO a las que se indujo senescencia o que ya eran senescentes. A pesar de que el ARN de horquilla corta fue capaz de reducir los niveles de p53, la reducción no fue completa y se observó un aumento de p53 en las células que carecían de p21; de modo que no se puede descartar el papel de p53 en la inducción de apoptosis.

Seguidamente, se comprobó si las células A549 p21 KO tenían una respuesta similar al tratamiento con otros quimioterápicos que inducen daño en el ADN. Se utilizaron Doxorubicina y Etopósido, que son inhibidores de topoisomerasas; Cisplatino, que es un agente alquilante; y Gemcitabina, que altera la replicación del ADN. En todos los casos se observa un aumento de la expresión de p53 y de la muerte celular tras el tratamiento, de forma similar a lo que ocurre tratando con Bleomicina. Para contrastar estos resultados en una línea celular distinta se utilizó la línea celular MCF7, en la que también disminuye la viabilidad celular a pesar de que no se aprecia un aumento de p53.

La muerte celular asociada a la falta de p21 cuando se trata con quimioterápicos que inducen senescencia se ha descrito en otros estudios, en los que se refleja la necesidad de p21 para mantener la viabilidad celular tras daño en el ADN. El tratamiento con Etopósido antes o después de reducir los niveles de p21 disminuye la viabilidad de células primarias y células de carcinoma pulmonar H1299. Asimismo, el uso de inhibidores de caspasas permitió mejorar la supervivencia de células primarias senescentes a las que se reducen los niveles de p21 (Yosef *et al.*, 2017). De forma similar, el tratamiento de células de cáncer de colon HCT116 con Camptotecina induce apoptosis en lugar de senescencia cuando estas células carecen de la expresión de p21. Esto coincide con un aumento de p53 por encima de los niveles de las células no modificadas (Han *et al.*, 2002).

En estos estudios también se describe que la disminución de los niveles de p53 antes o después de la inducción de senescencia mediante inhibidores de topoisomerasas reduce la viabilidad celular de forma equiparable a lo que ocurre cuando se disminuye la expresión de p21 (Han *et al.*, 2002; Yosef *et al.*, 2017). En el estudio en el que se reducen los niveles de p53 con anterioridad al tratamiento con Camptotecina (Han *et al.*, 2002), se muestra la reducción total de los niveles de p53 junto a un ligero aumento de p21 con el paso del tiempo. En cambio, la reducción de los niveles de p53 en células A549 que reciben el tratamiento con Bleomicina no es capaz de impedir por completo la expresión de p53, lo que podría aumentar los niveles de p21 hasta un nivel que sea suficiente como para favorecer la supervivencia. Además, como se ha indicado previamente, también es posible que los niveles de p21 aumenten por vías independientes de p53.

En vista de la importancia de p21 para mantener la viabilidad celular tras el tratamiento con Bleomicina, a continuación se trató de encontrar alguna alternativa que compensase su

ausencia. Unos niveles suficientemente altos de p16^{INK4a} son capaces de mantener la parada del ciclo celular a pesar de la inactivación de p53 en fibroblastos senescentes (Beauséjour *et al.*, 2003). Como ya se ha indicado en varias ocasiones, las células A549 carecen de p16^{INK4a} así que su expresión no puede protegerlas de las deficiencias en la vía de p53 y p21. El inhibidor de CDKs Palbociclib presenta afinidad por CDK4 y CDK6, a las que inhibe la proteína p16^{INK4a}. Para evaluar si la inhibición de estas CDKs podría conseguir que las células A549 p21 KO evitasen la entrada en apoptosis, se utilizó el inhibidor Palbociclib con anterioridad al tratamiento con Bleomicina. El porcentaje de muerte celular disminuyó, tanto si se mantenía este inhibidor durante el tratamiento con Bleomicina como si se retiraba. Por consiguiente, la inhibición de CDKs podría prevenir la muerte celular relacionada con la ausencia de p21 tras daño en el ADN.

3 CARACTERIZACIÓN DE SENESCENCIA CELULAR TRAS QUIMIOTERAPIA EN CÉLULAS QUE NO EXPRESAN P21

3.1 MARCADORES DE SENESCENCIA EN CÉLULAS QUE NO EXPRESAN P21

Seguidamente se evaluaron marcadores de senescencia en las células que continuaban siendo viables al finalizar la terapia, ya que alrededor de un tercio del cultivo de células A549 p21 KO tratadas con distintos quimioterápicos consiguió sobrevivir. El tratamiento con Bleomicina aumentaba el tamaño celular, la expresión del miembro del SASP *SERPINE1*, el porcentaje de células positivas para la tinción SA β G, el marcador de daño en el ADN P- γ H2AX y la sensibilidad al senolítico Navitoclax. El aumento del tamaño celular y la tinción SA β G también se producen al tratar las células A549 p21 KO con Cisplatino, Doxorrubicina, Etopósido o Gemcitabina y la línea celular MCF7 p21 KO con Bleomicina; al igual que cuando se disminuyen los niveles de p21 en células A549 senescentes. No se ven diferencias en los marcadores de senescencia evaluados cuando se reducen los niveles de p53 con anterioridad al tratamiento con Bleomicina.

El hecho de reducir los niveles de p21 después del tratamiento con Bleomicina impide que los niveles de P- γ H2AX disminuyan 7 días tras la retirada del fármaco. Esto coincide con observaciones previas en las que se ve un aumento de las roturas del ADN y de los niveles de proteínas relacionadas con la respuesta al daño en el ADN (ATM, CHK2, γ H2AX y p53) al reducir los niveles de p21 en células primarias a las que se indujo senescencia mediante Etopósido (Yosef *et al.*, 2017).

3.2 ESTABILIDAD DE LA DETENCIÓN DEL CICLO CELULAR

Al realizar un ensayo de viabilidad a largo plazo se obtuvieron resultados dispares en las células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina, ya que en algunos pocillos aumentaba la viabilidad por encima del nivel de partida mientras en otros disminuía. Para comprobar si estas células son capaces de proliferar tras el tratamiento con quimioterapia, se realizó un ensayo de formación de colonias en el que se sembraron a baja densidad las células que eran viables tras el tratamiento y se mantuvo el cultivo durante 14 días. Las células A549 p21 KO tratadas con Bleomicina, Cisplatino o Gemcitabina fueron capaces de formar colonias, mientras que las tratadas con Doxorrubicina o Etopósido no proliferaron. La formación de colonias tampoco ocurrió en células MCF7 p21 KO. Al combinar la ausencia de p21 con la disminución de p53 no se afecta la capacidad para formar colonias tras el tratamiento con Bleomicina.

De esta forma, a pesar de que parece que las células A549 p21 KO tratadas con quimioterápicos son senescentes de acuerdo con todos los marcadores examinados previamente; no parece que el tratamiento con Bleomicina, Cisplatino o Gemcitabina tras la disminución de p21 provoque una parada estable del ciclo celular. De acuerdo con las observaciones mediante microscopía, no todas las células forman colonias. Por este motivo, surge la pregunta de si las células que forman colonias son capaces de revertir el estado senescente o no llegaron a entrar en senescencia en ningún momento.

Se utilizó Navitoclax para eliminar selectivamente a las células senescentes antes de sembrar el ensayo de formación de colonias. Las células que permanecen viables tras el tratamiento con Navitoclax no deberían ser senescentes, de modo que la tendencia hacia una mayor proliferación tras la eliminación de las células senescentes apunta a que las células que son capaces de dividirse tras el tratamiento no son las que presentan marcadores de senescencia. El tratamiento con Palbociclib con anterioridad a Bleomicina reduce el número de colonias formadas y su mantenimiento junto a Bleomicina provoca que las colonias desaparezcan por completo. Debido a que Palbociclib no induce una parada estable del ciclo celular en A549, la ausencia de colonias podría deberse a la retención de Palbociclib en los lisosomas, que se podría ir liberando paulatinamente (Llanos *et al.*, 2019) e impediría el avance del ciclo celular mientras el compuesto se mantuviese en el medio, aunque no sería capaz de inducir senescencia.

Al contrario que en las células A549 p21 KO a las que se trata con Bleomicina, las células A549 senescentes tras Bleomicina no proliferan cuando se disminuyen los niveles de p21. Esto podría deberse a que el aumento inicial de p21 es suficiente para establecer una parada del ciclo celular estable. Una vez esto ha ocurrido, p21 sería necesario para mantener la viabilidad celular pero no para impedir que la célula se divida. Por el contrario, cuando los niveles de partida de p21 no pueden aumentar, es posible que se afecten tanto la inducción de senescencia como el mantenimiento de la viabilidad. De esta forma, la carencia de p21 con anterioridad al tratamiento con Bleomicina, Cisplatino o Gemcitabina provocaría una respuesta compuesta en la que una parte de las células consigue entrar en senescencia, otra parte entra en muerte celular y una última parte consigue continuar proliferando. La imposibilidad de proliferar de las células A549 p21 KO tratadas con Palbociclib de forma simultánea a Bleomicina parece apuntar a que la causa de la proliferación se encuentra en la regulación del avance del ciclo celular. Para comprobarlo sería necesario examinar los niveles de expresión de las proteínas que forman parte del ciclo celular a lo largo de todo el tratamiento con quimioterapia.

Se ha descrito previamente que la respuesta al tratamiento con Doxorrubicina en células A549 depende del nivel de expresión de p21. El aumento gradual del nivel de p21, que al inicio del tratamiento es bajo y luego se incrementa, desencadena la entrada en senescencia. Un nivel intermedio de p21 inmediatamente tras el tratamiento puede disminuir posteriormente, de forma que la célula prolifera; o puede seguir aumentando, produciéndose la entrada en senescencia. El uso de ARNs pequeños de interferencia para impedir el aumento de p21 al inicio del tratamiento disminuye el número de células positivas para el marcador de proliferación Ki-67, lo que implica que la expresión de p21 inmediatamente después del tratamiento es necesaria para que luego se produzca la división celular (Hsu *et al.*, 2019). Esto concuerda con la ausencia de formación de colonias de las células A549 p21 KO tratadas con Doxorrubicina, que necesitarían de la expresión transitoria de p21 para poder proliferar. Por otra parte, las células A549 control tratadas con Etopósido proliferan al retirar el tratamiento, pero no lo hacen al disminuir los niveles de p21. De acuerdo con las observaciones de este trabajo, el tratamiento de células A549 con inhibidores de topoisomerasas no permite que las células proliferen tras su retirada si carecen de la expresión de p21. Sería necesario estudiar las células de forma individual para ser capaces de asociar los patrones de expresión de las proteínas que determinan

el avance del ciclo celular con la respuesta a la quimioterapia, que puede ser apoptosis, senescencia o proliferación (**Figura 34**).

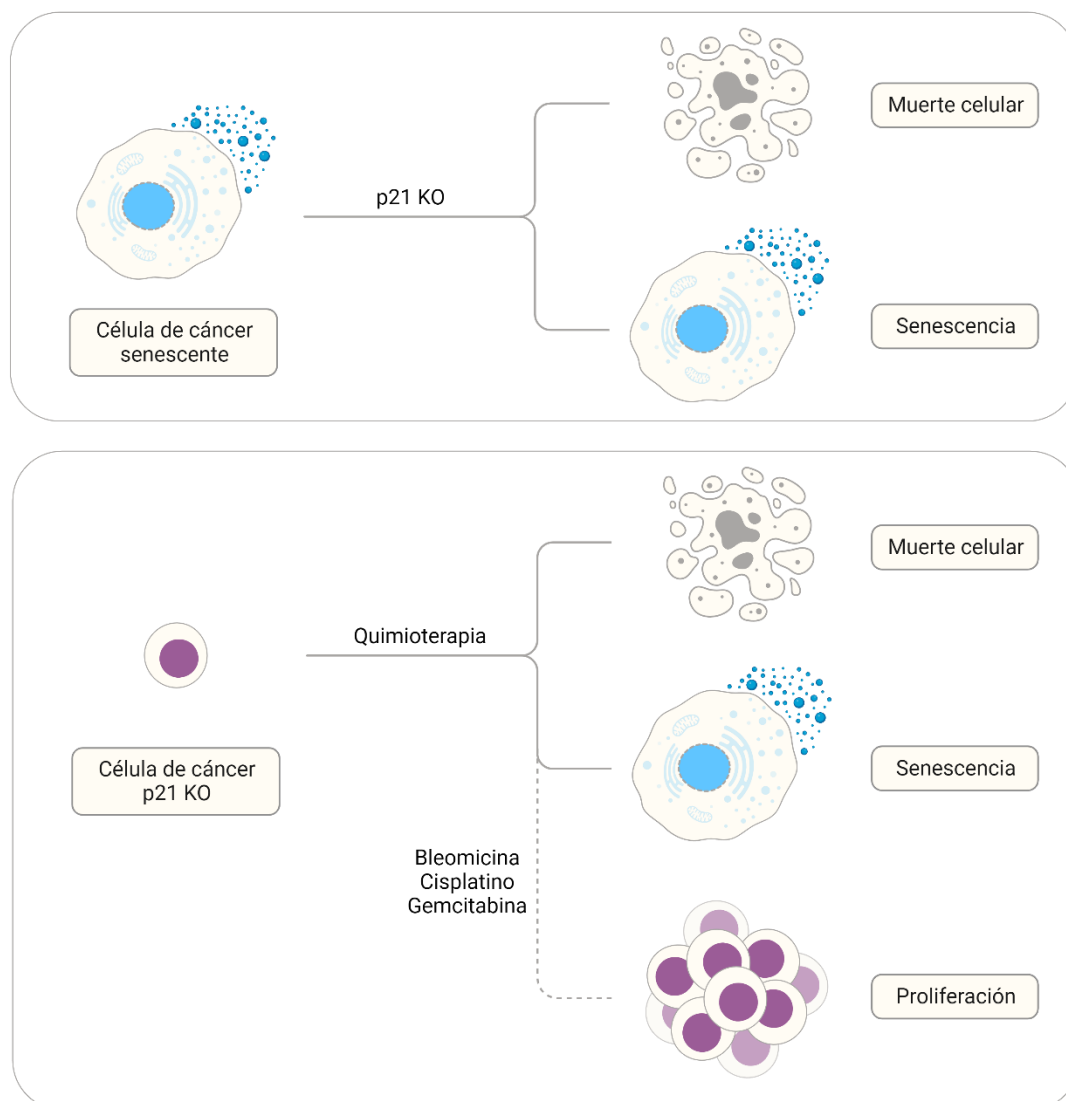


Figura 34. Respuesta de las células de cáncer a la ausencia de p21 antes o después de recibir quimioterapia. Las células de cáncer senescentes a las que se reduce los niveles de p21 pueden entrar en muerte celular o mantener su estado senescente. Las células de cáncer que no expresan p21 y son tratadas con quimioterapia pueden entrar en muerte celular o senescencia. Con los quimioterápicos Bleomicina, Cisplatino y Gemcitabina existe un tercer resultado que es la continuación de la división celular. Abreviaturas utilizadas: [p21 KO]: vector CDKN1A sgRNA. Creada utilizando Biorender.com.

Por otra parte, se ha descrito que la secreción de una parte de los factores del SASP depende de p21 (Sturmlechner *et al.*, 2021) y que el SASP tiene la capacidad de inducir senescencia paracrina (Wajapeyee *et al.*, 2008; Coppé *et al.*, 2010; Kuilman *et al.*, 2010; Acosta *et al.*, 2013). Es posible que las células A549 p21 KO que no entran en senescencia tras el tratamiento continúen proliferando porque la ausencia de p21 afecta negativamente a la secreción de factores por parte de las células en las que se detiene el ciclo celular. En consonancia con lo anterior, las células A549 shp21 no eran capaces de inducir senescencia de forma paracrina.

Una aproximación para dilucidar si la proliferación se debe a este motivo sería seleccionar a las células senescentes tras el tratamiento con Bleomicina y comparar la capacidad de las células control senescentes y las células p21 KO senescentes para inducir senescencia paracrina. El medio condicionado también se podría añadir en ausencia o en presencia del quimioterápico para comprobar si potencia la inducción de senescencia.

3.3 RESPUESTA DE LAS CÉLULAS p21 KO SUPERVIVIENTES AL TRATAMIENTO CON BLEOMICINA

Finalmente, para tratar de caracterizar en mayor medida a las células A549 p21 KO que permanecen viables tras el tratamiento con Bleomicina y que son capaces de proliferar, se generó una línea a partir de las células que se sembraron en el ensayo de formación de colonias. Para ello, se realizaron pases seriados hasta que el número de células aumentó lo suficiente como para realizar experimentos con estas células supervivientes al tratamiento con Bleomicina (A549 p21 KO SV). A pesar de que se observa un incremento de p53 tras tratarlas de nuevo con Bleomicina, en estas células no aumentan los niveles de p21 y no cesa la proliferación. Además, el porcentaje de células positivas para la tinción SA β G apenas varía con respecto a las células tratadas con vehículo. El tratamiento de estas células con otros inductores de daño en el ADN como son Cisplatino y Gemcitabina aumenta la muerte celular. De forma similar a las células control y las células p21 KO, las células p21 KO SV responden a Palbociclib disminuyendo la proliferación y no se observa muerte celular. Es decir, si bien las células p21 KO SV responden al tratamiento con Bleomicina de forma distinta a las células p21 KO, la respuesta es equiparable en el resto de escenarios.

En definitiva, la ausencia de p21 puede provocar que la respuesta mayoritaria a la terapia inductora de senescencia sea la muerte celular. De esta forma, la cantidad de células senescentes que se acumularía sería inferior, lo que prevendría los posibles efectos negativos de su acumulación. No obstante, existe el riesgo de que algunas de las células que reciben el tratamiento no entren en senescencia ni en muerte celular, sino que continúen proliferando. Se podría eliminar a estas células mediante un segundo quimioterápico o limitar su crecimiento tratando con Palbociclib, aunque probablemente el tratamiento con Palbociclib no sea la mejor opción, ya que su retirada podría revertir el efecto.

Este estudio permite profundizar en el conocimiento sobre el papel de las proteínas p53, p21 y RB en la respuesta a quimioterapia inductora de senescencia. La proteína que ha demostrado tener mayor importancia en las condiciones experimentales establecidas ha sido p21, siendo relevante para el control del avance del ciclo celular, el mantenimiento de la viabilidad y la inducción de senescencia paracrina.

CONCLUSIONS

1. The evaluation of cellular senescence markers after chemotherapy treatment in A549 cells showed that:
 - Downregulating the expression of p53 or RB does not affect the induction of cellular senescence by Bleomycin.
 - Downregulating p21 expression in Bleomycin-induced senescent cells diminishes the expression of some SASP factors and prevents the induction of paracrine senescence.
2. p21 absence alters the effect of senescence-inducing chemotherapy as indicated:
 - Bleomycin induces cell death in MCF7 and A549 cells; as well as Cisplatin, Doxorubicin, Etoposide and Gemcitabine do in A549 cells.
 - Apoptosis is induced by Bleomycin in A549 cells lacking p21 expression.
 - Palbociclib treatment prevents Bleomycin-induced cell death in these cells.
 - Senescent A549 cells that were previously treated with Bleomycin enter cell death when p21 is removed.
3. The characterization of cellular senescence after chemotherapy in cancer cells lacking p21 expression showed that:
 - Senescence markers were present in A549 cells that survived the treatment with Bleomycin, Cisplatin, Doxorubicin, Etoposide or Gemcitabine; and MCF7 cells that survived the treatment with Bleomycin. Likewise, these markers were present in Bleomycin-induced senescent A549 cells that survived after p21 removal.
 - A549 cells lacking p21 expression that survived the treatment with Bleomycin, Cisplatin or Gemcitabine can proliferate forming colonies after removing the treatment.
 - Colony formation in A549 cells that survived Bleomycin is favored by Navitoclax treatment and hindered by Palbociclib treatment.
 - A549 cells that survived Bleomycin and formed colonies do not present markers of senescence when Bleomycin is administered.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, T. y Dutta, A. (2009) "p21 in cancer: Intricate networks and multiple activities", *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, pp. 400-414. doi:10.1038/nrc2657.

Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., Athineos, D., Kang, T. W., Lasitschka, F., Andrulis, M., Pascual, G., Morris, K. J., Khan, S., Jin, H., Dharmalingam, G., Snijders, A. P., Carroll, T., Capper, D., Pritchard, C., Inman, G. J., Longerich, T., Sansom, O. J., Benitah, S. A., Zender, L. y Gil, J. (2013) "A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence", *Nature Cell Biology*, 15(8), pp. 978-990. doi:10.1038/ncb2784.

Aliouat-Denis, C. M., Dendouga, N., Van Den Wyngaert, I., Goehlmann, H., Steller, U., Van De Weyer, I., Van Slycken, N., Andries, L., Kass, S., Luyten, W., Janicot, M. y Vialard, J. E. (2005) "p53-independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by Chk2", *Molecular Cancer Research*, 3(11), pp. 627-634. doi:10.1158/1541-7786.MCR-05-0121.

Antelo-Iglesias, L., Picallos-Rabina, P., Estévez-Souto, V., Da Silva-Álvarez, S. y Collado, M. (2021) "The role of cellular senescence in tissue repair and regeneration", *Mechanisms of Ageing and Development*. Elsevier Ireland Ltd, 198. doi:10.1016/j.mad.2021.111528.

Aoshiha, K., Tsuji, T. y Nagai, A. (2003) "Bleomycin induces cellular senescence in alveolar epithelial cells", *European Respiratory Journal*, 22(3), pp. 436-443. doi:10.1183/09031936.03.00011903.

Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., A. Saltness, R., Jeganathan, K. B., Verzosa, G. C., Pezeshki, A., Khazaie, K., Miller, J. D. y Van Deursen, J. M. (2016) "Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan", *Nature*. Nature Publishing Group, 530(7589), pp. 184-189. doi:10.1038/nature16932.

Beauséjour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P. y Campisi, J. (2003) "Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and p16 pathways", *EMBO Journal*, 22(16), pp. 4212-4222. doi:10.1093/emboj/cdg417.

Bhat, R., Crowe, E. P., Bitto, A., Moh, M., Katsetos, C. D., Garcia, F. U., Johnson, F. B., Trojanowski, J. Q., Sell, C. y Torres, C. (2012) "Astrocyte Senescence as a Component of Alzheimer's Disease", *PLoS ONE*, 7(9). doi:10.1371/journal.pone.0045069.

Biran, A., Zada, L., Abou Karam, P., Vadai, E., Roitman, L., Ovadya, Y., Porat, Z. y Krizhanovsky, V. (2017) "Quantitative identification of senescent cells in aging and disease", *Aging Cell*. Blackwell Publishing Ltd, 16(4), pp. 661-671. doi:10.1111/accel.12592.

Cavalier-Smith, T. (1974) "Palindromic base sequences and replication of eukaryote chromosomes ends", *Nature*, 250, pp. 467-470. doi:10.1038/250467a0.

Cejuela, M., Gil-Torralvo, A., Castilla, M. Á., Domínguez-Cejudo, M. Á., Falcón, A., Benavent, M., Molina-Pinelo, S., Ruiz-Borrego, M. y Salvador Bofill, J. (2023) "Abemaciclib, Palbociclib, and Ribociclib in Real-World Data: A Direct Comparison of First-Line Treatment for Endocrine-Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer", *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 24(10), p. 8488. doi:10.3390/ijms24108488.

Chang, B.-D., Brounde, E. V., Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., Kandel, E. S., Lausch, E., Christov, K. y Roninson, I. B. (1999) "A Senescence-like Phenotype Distinguishes Tumor Cells That Undergo Terminal Proliferation Arrest after Exposure to Anticancer Agents", *CANCER RESEARCH*, 59, pp. 3761-3767.

Chang, B.-D., Xuan, Y., Broude, E. V, Zhu, H., Schott, B., Fang, J. y Roninson, I. B. (1999) "Role of p53 and p21 waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs", *Oncogene*, 18, pp. 4808-4818. doi:10.1038/sj.onc.1203078.

Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R. M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N. E., Ding, S., Feng, W., Luo, Y., Wang, X., Aykin-Burns, N., Krager, K., Ponnappan, U., Hauer-Jensen, M., Meng, A. y Zhou, D. (2016) "Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice", *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 22(1), pp. 78-83. doi:10.1038/nm.4010.

Chen, J. y Stubbe, J. A. (2005) "Bleomycins: Towards better therapeutics", *Nature Reviews Cancer*, pp. 102-112. doi:10.1038/nrc1547.

Chen, L., Marechal, V., Moreau, J., Levine, A. J. y Chen, J. (1997) "Proteolytic Cleavage of the mdm2 Oncoprotein during Apoptosis", *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 272(36), pp. 22966-22973. doi:10.1074/jbc.272.36.22966.

Chen, Z., Trotman, L. C., Shaffer, D., Lin, H. K., Dotan, Z. A., Niki, M., Koutcher, J. A., Scher, H. I., Ludwig, T., Gerald, W., Cordon-Cardo, C. y Pandolfi, P. P. (2005) "Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis", *Nature*, 436(7051), pp. 725-730. doi:10.1038/nature03918.

Chicas, A., Wang, X., Zhang, C., McCurrach, M., Zhao, Z., Mert, O., Dickins, R. A., Narita, M., Zhang, M. y Lowe, S. W. (2010) "Dissecting the Unique Role of the Retinoblastoma Tumor Suppressor during Cellular Senescence", *Cancer Cell*. Cell Press, 17(4), pp. 376-387. doi:10.1016/j.ccr.2010.01.023.

Chiche, A., Le Roux, I., von Joest, M., Sakai, H., Aguín, S. B., Cazin, C., Salam, R., Fiette, L., Alegria, O., Flamant, P., Tajbakhsh, S. y Li, H. (2017) "Injury-Induced Senescence Enables In Vivo Reprogramming in Skeletal Muscle", *Cell Stem Cell*. Cell Press, 20(3), pp. 407-414. doi:10.1016/j.stem.2016.11.020.

Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J. y van Deursen, J. M. (2014) "Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates?", *EMBO reports*. EMBO, 15(11), pp. 1139-1153. doi:10.15252/embr.201439245.

Childs, B. G., Baker, D. J., Wijshake, T., Conover, C. A., Campisi, J. y Van Deursen, J. M. (2016) "Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 354(6311), pp. 472-477. doi:10.1126/science.aaf6659.

Chinta, S. J., Woods, G., Demaria, M., Rane, A., Zou, Y., McQuade, A., Rajagopalan, S., Limbad, C., Madden, D. T., Campisi, J. y Andersen, J. K. (2018) "Cellular Senescence Is

Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease", *Cell Reports*. Elsevier B.V., 22(4), pp. 930-940. doi:10.1016/j.celrep.2017.12.092.

Chkhotua, A. B., Gabusi, E., Altimari, A., D'Errico, A., Yakubovich, M., Vienken, J., Stefoni, S., Chieco, P., Yussim, A. y Grigioni, W. F. (2003) "Increased expression of p16(INK4a) and p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor genes in aging human kidney and chronic allograft nephropathy", *American Journal of Kidney Diseases*. W.B. Saunders, 41(6), pp. 1303-1313. doi:10.1016/S0272-6386(03)00363-9.

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguría, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., Beach, D. y Serrano, M. (2005) "Senescence in premalignant tumours", *Nature*, 436, p. 642.

Collado, M. y Serrano, M. (2010) "Senescence in tumours: Evidence from mice and humans", *Nature Reviews Cancer*, 10(1), pp. 51-57. doi:10.1038/nrc2772.

Collins, K. y Mitchell, J. R. (2002) "Telomerase in the human organism", *Oncogene*, 21, pp. 564-579. doi:10.1038/sj/onc/1205083.

Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A. y Campisi, J. (2010) "The senescence-associated secretory phenotype: The dark side of tumor suppression", *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5, pp. 99-118. doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102144.

Coppé, J. P., Kauser, K., Campisi, J. y Beauséjour, C. M. (2006) "Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence", *Journal of Biological Chemistry*, 281(40), pp. 29568-29574. doi:10.1074/jbc.M603307200.

Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y. y Campisi, J. (2008) "Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor.", *PLoS biology*, 6(12). doi:10.1371/journal.pbio.0060301.

Coppé, J. P., Rodier, F., Patil, C. K., Freund, A., Desprez, P. Y. y Campisi, J. (2011) "Tumor suppressor and aging biomarker p16 INK4a induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype", *Journal of Biological Chemistry*, 286(42), pp. 36396-36403. doi:10.1074/jbc.M111.257071.

Courtois-Cox, S., Genter Williams, S. M., Reczek, E. E., Johnson, B. W., McGillicuddy, L. T., Johannessen, C. M., Hollstein, P. E., MacCollin, M. y Cichowski, K. (2006) "A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence", *Cancer Cell*. Cell Press, 10(6), pp. 459-472. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.003.

Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. y Adams, J. M. (2014) "Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), pp. 49-63. doi:10.1038/nrm3722.

D'Adda Di Fagagna, F. (2008) "Living on a break: Cellular senescence as a DNA-damage response", *Nature Reviews Cancer*, 8(7), pp. 512-522. doi:10.1038/nrc2440.

D'Adda Di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P. y Jackson, S. P. (2003) "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence", *Nature*, 426(6963), pp. 194-198. doi:10.1038/nature02118.

Dankort, D., Filenova, E., Collado, M., Serrano, M., Jones, K. y McMahon, M. (2007) "A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors", *Genes and Development*, 21(4), pp. 379-384. doi:10.1101/gad.1516407.

Davaapil, H., Brockes, J. P. y Yun, M. H. (2017) "Conserved and novel functions of programmed cellular senescence during vertebrate development", *Development (Cambridge)*. Company of Biologists Ltd, 144(1), pp. 106-114. doi:10.1242/dev.138222.

Delavaine, L. y La Thangue, N. B. (1999) "Control of E2F activity by p21 Waf1/Cip1", *Oncogene*, 18, pp. 5381-5392. doi:10.1038/sj.onc.1202923.

Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., Laberge, R. M., Vijg, J., VanSteeg, H., Dollé, M. E. T., Hoeijmakers, J. H. J., deBruin, A., Hara, E. y Campisi, J. (2014) "An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA", *Developmental Cell*. Cell Press, 31(6), pp. 722-733. doi:10.1016/j.devcel.2014.11.012.

Demaria, M., O'Leary, M. N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., Koenig, K., Le, C., Mitin, N., Deal, A. M., Alston, S., Academia, E. C., Kilmarx, S., Valdovinos, A., Wang, B., De Bruin, A., Kennedy, B. K., Melov, S., Zhou, D., Sharpless, N. E., Muss, H. y Campisi, J. (2017) "Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse", *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc., 7(2), pp. 165-176. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0241.

Dhomen, N., Reis-Filho, J. S., da Rocha Dias, S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C. y Marais, R. (2009) "Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice", *Cancer Cell*. Cell Press, 15(4), pp. 294-303. doi:10.1016/j.ccr.2009.02.022.

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M. y Campisi, J. (1995) "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(20), pp. 9363-9367. doi:10.1073/pnas.92.20.9363.

Duma, N., Santana-Davila, R. y Molina, J. R. (2019) "Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment", *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier Ltd, 94(8), pp. 1623-1640. doi:10.1016/j.mayocp.2019.01.013.

Elmore, L. W., Rehder, C. W., Di, X., McChesney, P. A., Jackson-Cook, C. K., Gewirtz, D. A. y Holt, S. E. (2002) "Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction", *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), pp. 35509-35515. doi:10.1074/jbc.M205477200.

Evangelou, K., Lougiakis, N., Rizou, S. V., Kotsinas, A., Kletsas, D., Muñoz-Espín, D., Kastrinakis, N. G., Pouli, N., Marakos, P., Townsend, P., Serrano, M., Bartek, J. y Gorgoulis, V. G. (2017) "Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens", *Aging Cell*. Blackwell Publishing Ltd, 16(1), pp. 192-197. doi:10.1111/acel.12545.

Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M. y Campisi, J. (2012) "Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker", *Molecular Biology of the Cell*, 23(11), pp. 2066-2075. doi:10.1091/mbc.E11-10-0884.

Fry, D. W., Harvey, P. J., Keller, P. R., Elliott, W. L., Meade, M., Trachet, E., Albassam, M., Zheng, X., Leopold, W. R., Pryer, N. K. y Toogood, P. L. (2004) "Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts", *Mol Cancer Ther*, 3(11), pp. 1427-1464. doi:10.1158/1535-7163.1427.3.11.

Gajjar, M., Candeias, M. M., Malbert-Colas, L., Mazars, A., Fujita, J., Olivares-Illana, V. y Fåhræus, R. (2012) "The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls mdm2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following dna damage", *Cancer Cell*. Cell Press, 21(1), pp. 25-35. doi:10.1016/j.ccr.2011.11.016.

Ge, H., Ni, S., Wang, Xingan, Xu, N., Liu, Y., Wang, Xun, Wang, L., Song, D., Song, Y. y Bai, C. (2012) "Dexamethasone Reduces Sensitivity to Cisplatin by Blunting p53-Dependent Cellular Senescence in Non-Small Cell Lung Cancer", *PLoS ONE*, 7(12), p. e51821. doi:10.1371/journal.pone.0051821.

Georgakopoulou, E., Evangelou K, Tsimaratou K, Fernandez, M.-P., Zoumpourlis, V., Trougakos, I., Kletsas, D., Bartek, J., Serrano, M. y Gorgoulis, V. (2013) "Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues", *AGING*, 5(1), pp. 37-50. doi:10.18632/aging.100527.

Gibaja, A., Aburto, M. R., Pulido, S., Collado, M., Hurle, J. M., Varela-Nieto, I. y Magariños, M. (2019) "TGFβ2-induced senescence during early inner ear development", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 9(1), p. 5912. doi:10.1038/s41598-019-42040-0.

Godwin, J. W., Pinto, A. R. y Rosenthal, N. A. (2013) "Macrophages are required for adult salamander limb regeneration", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(23), pp. 9415-9420. doi:10.1073/pnas.1300290110.

González-Suárez, E., Geserick, C., Flores, J. M. y Blasco, M. A. (2005) "Antagonistic effects of telomerase on cancer and aging in K5-mTert transgenic mice", *Oncogene*, 24(13), pp. 2256-2270. doi:10.1038/sj.onc.1208413.

Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovskiy, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., Schmitt, C. A., Sedivy, J., Vougas, K., von Zglinicki, T., Zhou, D., Serrano, M. y Demaria, M. (2019) "Cellular Senescence: Defining a Path Forward", *Cell*. Cell Press, 179(4), pp. 813-827. doi:10.1016/j.cell.2019.10.005.

Gray-Schopfer, V. C., Cheong, S. C., Chong, H., Chow, J., Moss, T., Abdel-Malek, Z. A., Marais, R., Wynford-Thomas, D. y Bennett, D. C. (2006) "Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: A role for p16?", *British Journal of Cancer*, 95(4), pp. 496-505. doi:10.1038/sj.bjc.6603283.

Greider, C. W. y Blackburn, E. H. (1985) "Identification of a Specific Telomere Terminal Transferase Activity in Tetrahymena Extracts", *Cell*, 43, pp. 405-413. doi:10.1016/0092-8674(85)90170-9.

Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V. y Barbacid, M. (2003) "Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context", *Cancer Cell*. doi:10.1016/s1535-6108(03)00191-0.

Han, Z., Wei, W., Dunaway, S., Darnowski, J. W., Calabresi, P., Sedivy, J., Hendrickson, E. A., Balan, K. V., Pantazis, P. y Wyche, J. H. (2002) "Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin", *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), pp. 17154-17160. doi:10.1074/jbc.M112401200.

Hanahan, D. (2022) "Hallmarks of Cancer: New Dimensions", *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc., 12(1), pp. 31-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

Harley, C. B., Futcher, A. B. y Greider, C. W. (1990) "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts", *Nature*, 345(6274), pp. 458-460. doi:10.1038/345458a0.

Hayflick, L. (1989) "A novel technique for transforming the theft of mortal human cells into praiseworthy federal policy", *American Association of Tissue Banks*, 33(2), pp. 191-207. doi:10.1016/s0531-5565(97)00115-0.

Hayflick, L. y Moorhead, P. S. (1961) "The serial cultivation of human diploid cell strains", *Experimental Cell Research*, 25, pp. 585-621. doi:10.1016/0014-4827(61)90192-6.

He, S. y Sharpless, N. E. (2017) "Senescence in Health and Disease", *Cell*. Cell Press, 169(6), pp. 1000-1011. doi:10.1016/j.cell.2017.05.015.

Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D. y Sedivy, J. M. (2006) "Cellular senescence in aging primates", *Science*, 311(5765), p. 1257. doi:10.1126/science.1122446.

Hernandez-Monge, J., Martínez-Sánchez, M., Rousset-Roman, A., Medina-Medina, I. y Olivares-Illana, V. (2021) "MDM2 regulates RB levels during genotoxic stress", *EMBO reports*. EMBO, 22(1), p. e50615. doi:10.15252/embr.202050615.

Hernandez-Segura, A., Nehme, J. y Demaria, M. (2018) "Hallmarks of Cellular Senescence", *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 28(6), pp. 436-453. doi:10.1016/j.tcb.2018.02.001.

Hsu, C. H., Altschuler, S. J. y Wu, L. F. (2019) "Patterns of Early p21 Dynamics Determine Proliferation-Senescence Cell Fate after Chemotherapy", *Cell*. Cell Press, 178(2), pp. 361-373.e12. doi:10.1016/j.cell.2019.05.041.

Hu, W., Sung, T., Jessen, B. A., Thibault, S., Finkelstein, M. B., Khan, N. K. y Sacca, A. I. (2016) "Mechanistic investigation of bone marrow suppression associated with palbociclib and its differentiation from cytotoxic chemotherapies", *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., 22(8), pp. 2000-2008. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1421.

Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., Tuyn, J. Van, Nelson, D. M., Singh Rai, T., Shah, P. P., Hewitt, G., Korolchuk, V. I., Passos, J. F., Wu, H., Berger, S. L. y Adams, P. D. (2013) "Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence", *Journal of Cell Biology*, 202(1), pp. 129-143. doi:10.1083/jcb.201212110.

Jeon, O. H., Kim, C., Laberge, R. M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A. P., Chung, J. W., Kim, D. H., Poon, Y., David, N., Baker, D. J., Van Deursen, J. M., Campisi, J. y Elisseeff, J. H. (2017) "Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment", *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 23(6), pp. 775-781. doi:10.1038/nm.4324.

Jeyapalan, J. C., Ferreira, M., Sedivy, J. M. y Herbig, U. (2007) "Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates", *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(1), pp. 36-44. doi:10.1016/j.mad.2006.11.008.

Jones, K. R., Elmore, L. W., Jackson-Cook, C., Demasters, G., Povirk, L. F., Holt, S. E. y Gewirtz, D. A. (2005) "p53-dependent accelerated senescence induced by ionizing radiation in breast tumour cells", *International Journal of Radiation Biology*, 81(6), pp. 445-458. doi:10.1080/09553000500168549.

Kang, T. W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., Iken, M., Vucur, M., Weiss, S., Heikenwalder, M., Khan, S., Gil, J., Bruder, D., Manns, M., Schirmacher, P., Tacke, F., Ott, M., Luedde, T., Longerich, T., Kubicka, S. y Zender, L. (2011) "Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development", *Nature*, 479(7374), pp. 547-551. doi:10.1038/nature10599.

Khongkow, P., Gomes, A. R., Gong, C., Man, E. P. S., Tsang, J. W. H., Zhao, F., Monteiro, L. J., Coombes, R. C., Medema, R. H., Khoo, U. S. y Lam, E. W. F. (2016) "Paclitaxel targets FOXM1 to regulate KIF20A in mitotic catastrophe and breast cancer paclitaxel resistance", *Oncogene*. Nature Publishing Group, 35(8), pp. 990-1002. doi:10.1038/onc.2015.152.

Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L. C., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L. y Shay, J. W. (1994) "Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer", *Science*, 266(5193), pp. 2011-2015. doi:10.1126/science.7605428.

Knizhnik, A. V., Roos, W. P., Nikolova, T., Quiros, S., Tomaszowski, K. H., Christmann, M. y Kaina, B. (2013) "Survival and Death Strategies in Glioma Cells: Autophagy, Senescence and Apoptosis Triggered by a Single Type of Temozolomide-Induced DNA Damage", *PLoS ONE*, 8(1). doi:10.1371/journal.pone.0055665.

Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M. R., Kovalev, G. I., Al-Regaiey, K., Su, L. y Sharpless, N. E. (2004) "Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging", *Journal of Clinical Investigation*. The American Society for Clinical Investigation, 114(9), pp. 1299-1307. doi:10.1172/JCI22475.

Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L. y Lowe, S. W. (2008) "Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis", *Cell*. Elsevier B.V., 134(4), pp. 657-667. doi:10.1016/j.cell.2008.06.049.

Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.-Y. y Campisi, J. (2001) "Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging", *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(21), pp. 12072-12077. doi:10.1073/pnas.211053698.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J. y Peeper, D. S. (2010) "The essence of senescence", *Genes and Development*, 24(22), pp. 2463-2479. doi:10.1101/gad.1971610.

De Lange, T. (2005) "Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres", *Genes and Development*, 19(18), pp. 2100-2110. doi:10.1101/gad.1346005.

Le, O. N. L., Rodier, F., Fontaine, F., Coppe, J. P., Campisi, J., DeGregori, J., Laverdière, C., Kokta, V., Haddad, E. y Beauséjour, C. M. (2010) "Ionizing radiation-induced long-term expression of senescence markers in mice is independent of p53 and immune status", *Aging Cell*. Blackwell Publishing Ltd, 9(3), pp. 398-409. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00567.x.

Li, C., Shen, Y., Huang, L., Liu, C. y Wang, J. (2021) "Senolytic therapy ameliorates renal fibrosis postacute kidney injury by alleviating renal senescence", *FASEB Journal*. John Wiley and Sons Inc, 35(1), p. e21229. doi:10.1096/fj.202001855RR.

Li, W., Wang, W., Dong, H., Li, Y., Li, L. I., Han, L., Han, Z., Wang, S., Ma, D. y Wang, H. (2014) "Cisplatin-induced senescence in ovarian cancer cells is mediated by GRP78", *Oncology Reports*. Spandidos Publications, 31(6), pp. 2525-2534. doi:10.3892/or.2014.3147.

Linge, A., Weinhold, K., Bläsche, R., Kasper, M. y Barth, K. (2007) "Downregulation of caveolin-1 affects bleomycin-induced growth arrest and cellular senescence in A549 cells", *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(10), pp. 1964-1974. doi:10.1016/j.biocel.2007.05.018.

Llanos, S., Megias, D., Blanco-Aparicio, C., Hernández-Encinas, E., Rovira, M., Pietrocola, F. y Serrano, M. (2019) "Lysosomal trapping of palbociclib and its functional implications", *Oncogene*. Nature Publishing Group, 38(20), pp. 3886-3902. doi:10.1038/s41388-019-0695-8.

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. y Kroemer, G. (2023) "Hallmarks of aging: An expanding universe", *Cell*. Elsevier B.V., 186(2), pp. 243-278. doi:10.1016/j.cell.2022.11.001.

Majumder, P. K., Grisanzio, C., O'Connell, F., Barry, M., Brito, J. M., Xu, Q., Guney, I., Berger, R., Herman, P., Bikoff, R., Fedele, G., Baek, W. K., Wang, S., Ellwood-Yen, K., Wu, H., Sawyers, C. L., Signoretti, S., Hahn, W. C., Loda, M. y Sellers, W. R. (2008) "A Prostatic Intraepithelial Neoplasia-Dependent p27Kip1 Checkpoint Induces Senescence and Inhibits Cell

Proliferation and Cancer Progression", *Cancer Cell*. Cell Press, 14(2), pp. 146-155. doi:10.1016/j.ccr.2008.06.002.

Malumbres, M. y Barbacid, M. (2003) "RAS oncogenes: the first 30 years", *Nature Reviews Cancer*, 3(6), pp. 7-13. doi:10.1038/nrc1097.

Matthews, H. K., Bertoli, C. y de Bruin, R. A. M. (2022) "Cell cycle control in cancer", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Research, 23(1), pp. 74-88. doi:10.1038/s41580-021-00404-3.

McKenna, E., Traganos, F., Zhao, H. y Darzynkiewicz, Z. (2012) "Persistent DNA damage caused by low levels of mitomycin C induces irreversible cell senescence", *Cell Cycle*. Taylor and Francis Inc., 11(16), pp. 3132-3140. doi:10.4161/cc.21506.

Melk, A., Schmidt, B. M. W., Takeuchi, O., Sawitzki, B., Rayner, D. C. y Halloran, P. F. (2004) "Expression of p16 INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney", *Kidney International*, 65, pp. 510-520. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00438.x.

Mhaidat, N. M., Zhang, X. D., Allen, J., Avery-Kiejda, K. A., Scott, R. J. y Hersey, P. (2007) "Temozolomide induces senescence but not apoptosis in human melanoma cells", *British Journal of Cancer*, 97(9), pp. 1225-1233. doi:10.1038/sj.bjc.6604017.

Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garré, M., Giovanni Nuciforo, P., Bensimon, A., Maestro, R., Giuseppe Pelicci, P. y D'Adda Di Fagagna, F. (2006) "Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication", *Nature*. Nature Publishing Group, 444(7119), pp. 638-642. doi:10.1038/nature05327.

Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., Van Der Horst, C. M. A. M., Majoor, D. M., Shay, J. W., Mooi, W. J. y Peeper, D. S. (2005) "BRAF^{V600E}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi", *Nature*, 436(7051), pp. 720-724. doi:10.1038/nature03890.

Michaud, K., Solomon, D. A., Oermann, E., Kim, J. S., Zhong, W. Z., Prados, M. D., Ozawa, T., James, C. D. y Waldman, T. (2010) "Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts", *Cancer Research*, 70(8), pp. 3228-3238. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4559.

Mikuła-Pietrasik, J., Witucka, A., Pakuła, M., Uruski, P., Begier-Krasińska, B., Niklas, A., Tykarski, A. y Książek, K. (2019) "Comprehensive review on how platinum- and taxane-based chemotherapy of ovarian cancer affects biology of normal cells", *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG, 76(4), pp. 681-697. doi:10.1007/s00018-018-2954-1.

Modrak, D. E., Leon, E., Goldenberg, D. M. y Gold, D. V. (2009) "Ceramide regulates gemcitabine-induced senescence and apoptosis in human pancreatic cancer cell lines", *Molecular Cancer Research*, 7(6), pp. 890-896. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0457.

Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D. y Levine', A. J. (1992) "The mdm-2 Oncogene Product Forms a Complex with the ~53 Protein and Inhibits p53-Mediated Transactivation", *Cell*, 69, pp. 1237-1245. doi:10.1016/0092-8674(92)90644-r.

Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M. y Serrano, M. (2013) "Programmed cell senescence during mammalian embryonic development", *Cell*. Elsevier B.V., 155(5), pp. 1104-1118. doi:10.1016/j.cell.2013.10.019.

Muñoz-Espín, D., Rovira, M., Galiana, I., Giménez, C., Lozano-Torres, B., Paez-Ribes, M., Llanos, S., Chaib, S., Muñoz-Martín, M., Uceró, A. C., Garaulet, G., Mulero, F., Dann, S. G., VanArsdale, T., Shields, D. J., Bernardos, A., Murguía, J. R., Martínez-Mañez, R. y Serrano, M. (2018) "A versatile drug delivery system targeting senescent cells", *EMBO Molecular Medicine*. EMBO, 10(9), p. e9355. doi:10.15252/emmm.201809355.

Nacher, V., Carretero, A., Navarro, M., Armengol, C., Llombart, C., Rodríguez, A., Herrero-Fresneda, I., Ayuso, E. y Ruberte, J. (2006) "The quail mesonephros: A new model for renal senescence?", *Journal of Vascular Research*, 43(6), pp. 581-586. doi:10.1159/000096076.

Nakayama, K., Rahman, M., Rahman, M. T., Nakamura, K., Sato, E., Katagiri, H., Ishibashi, T., Ishikawa, M., Iida, K., Razia, S., Ishikawa, N. y Kyo, S. (2017) "Nucleus accumbens-1/GADD45GIP1 axis mediates cisplatin resistance through cellular senescence in ovarian cancer", *Oncology Letters*. Spandidos Publications, 13(6), pp. 4713-4719. doi:10.3892/ol.2017.6099.

Narita, M. y Lowe, S. W. (2005) "Senescence comes of age", *Nature Medicine*, 11(9), pp. 920-922. doi:10.1038/nm0905-920.

Okamoto, A., Hussain, S. P., Hagiwara, K., Spifiare, E. A., Rusin, M. R., Demetrick, D. J., Serrano, M., Hannon, G. J., Shiseki, M., Zariwala, M., Xiong, Y., Beach, D. H., Yokota, J. y Harris, C. C. (1995) "Mutations in the p16INK4/MTS1/CDKN2, p15INK4B/MTS2, and p18 genes in primary and metastatic lung cancer", *CANCER RESEARCH*, 55, pp. 27599-3280.

Ota, H., Eto, M., Ako, J., Ogawa, S., Iijima, K., Akishita, M. y Ouchi, Y. (2009) "Sirolimus and Everolimus Induce Endothelial Cellular Senescence Via Sirtuin 1 Down-Regulation", *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier BV, 53(24), pp. 2298-2305. doi:10.1016/j.jacc.2009.01.072.

Otto, T. y Sicinski, P. (2017) "Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy", *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 17(2), pp. 93-115. doi:10.1038/nrc.2016.138.

Ou, H. L., Hoffmann, R., González-López, C., Doherty, G. J., Korkola, J. E. y Muñoz-Espín, D. (2021) "Cellular senescence in cancer: from mechanisms to detection", *Molecular Oncology*. John Wiley and Sons Ltd, 15(10), pp. 2634-2671. doi:10.1002/1878-0261.12807.

Palmieri, C., Musson, A., Harper-Wynne, C., Wheatley, D., Bertelli, G., Macpherson, I. R., Nathan, M., McDowall, E., Bhojwani, A., Verrill, M., Eva, J., Doody, C. y Chowdhury, R. (2023) "A real-world study of the first use of palbociclib for the treatment of advanced breast

cancer within the UK National Health Service as part of the novel Ibrance® Patient Program", *British Journal of Cancer*. Springer Nature, 129(5), pp. 852-860. doi:10.1038/s41416-023-02352-5.

Perez, M., Muñoz-Galván, S., Jiménez-García, M. P., Marín, J. J. y Carnero, A. (2015) "Efficacy of CDK4 inhibition against sarcomas depends on their levels of CDK4 and p16ink4 mRNA", *Oncotarget*, 6(38), pp. 40557-40574. doi:10.18632/oncotarget.5829.

te Poele, R. H., Okorokov, A. L. y Jardine, L. (2002) "DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo", *Cancer Res*, 62, pp. 1876-1883.

Price, J. S., Waters, J. G., Darrah, C., Pennington, C., Edwards, D. R., Donell, S. T. y Clark, I. M. (2002) "The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis", *Aging Cell*, 1(1), pp. 57-65. doi:10.1046/j.1474-9728.2002.00008.x.

Probin, V., Wang, Y., Bai, A. y Zhou, D. (2006) "Busulfan selectively induces cellular senescence but not apoptosis in WI38 fibroblasts via a p53-independent but extracellular signal-regulated kinase-p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(2), pp. 551-560. doi:10.1124/jpet.106.107771.

Qu, K., Lin, T., Wang, Z., Liu, S., Chang, H., Xu, X., Meng, F., Zhou, L., Wei, J., Tai, M., Dong, Y. y Liu, C. (2014) "Reactive oxygen species generation is essential for cisplatin induced accelerated senescence in hepatocellular carcinoma", *Frontiers of Medicine in China*. Higher Education Press, 8(2), pp. 227-235. doi:10.1007/s11684-014-0327-1.

Quick, Q. A. y Gerwitz, D. A. (2006) "An accelerated senescence response to radiation in wild-type p53 glioblastoma multiforme cells", *J. Neurosurg.*, 105(1), pp. 111-118. doi:10.3171/jns.2006.105.1.111.

Rebbaa, A., Zheng, X., Chou, P. M. y Mirkin, B. L. (2003) "Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence", *Oncogene*, 22(18), pp. 2805-2811. doi:10.1038/sj.onc.1206366.

Ressler, S., Bartkova, J., Niederegger, H., Bartek, J., Scharffetter-Kochanek, K., Jansen-Dürr, P. y Wlaschek, M. (2006) "p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin", *Aging Cell*, 5(5), pp. 379-389. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00231.x.

Robles, S. J. y Adami, G. R. (1998) "Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16 INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts", *Oncogene*, 16(9), pp. 1113-1123. doi:10.1038/sj.onc.1201862.

Rubin, S. M., Sage, J. y Skotheim, J. M. (2020) "Integrating Old and New Paradigms of G1/S Control", *Molecular Cell*. Cell Press, pp. 183-192. doi:10.1016/j.molcel.2020.08.020.

Sadaie, M., Salama, R., Carroll, T., Tomimatsu, K., Chandra, T., Young, A. R. J., Narita, Masako, Pérez-Mancera, P. A., Bennett, D. C., Chong, H., Kimura, H. y Narita, Masashi (2013) "Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence", *Genes and Development*, 27(16), pp. 1800-1808. doi:10.1101/gad.217281.113.

Sagiv, A., Biran, A., Yon, M., Simon, J., Lowe, S. W. y Krizhanovsky, V. (2013) "Granule exocytosis mediates immune surveillance of senescent cells", *Oncogene*, 32(15), pp. 1971-1977. doi:10.1038/onc.2012.206.

Sanoff, H. K., Deal, A. M., Krishnamurthy, J., Torrice, C., Dillon, P., Sorrentino, J., Ibrahim, J. G., Jolly, T. A., Williams, G., Carey, L. A., Drobish, A., Gordon, B. B., Alston, S., Hurria, A., Kleinhans, K., Rudolph, K. L., Sharpless, N. E. y Muss, H. B. (2014) "Effect of cytotoxic chemotherapy on markers of molecular age in patients with breast cancer", *Journal of the National Cancer Institute*. Oxford University Press, 106(4). doi:10.1093/jnci/dju057.

Sarkisian, C. J., Keister, B. A., Stairs, D. B., Boxer, R. B., Moody, S. E. y Chodosh, L. A. (2007) "Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis", *Nature Cell Biology*, 9(5), pp. 493-505. doi:10.1038/ncb1567.

Schade, A. E., Fischer, M. y DeCaprio, J. A. (2019) "RB, p130 and p107 differentially repress G1/S and G2/M genes after p53 activation", *Nucleic acids research*. NLM (Medline), 47(21), pp. 11197-11208. doi:10.1093/nar/gkz961.

Schafer, M. J., White, T. A., Iijima, K., Haak, A. J., Ligresti, G., Atkinson, E. J., Oberg, A. L., Birch, J., Salmonowicz, H., Zhu, Y., Mazula, D. L., Brooks, R. W., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Pirtskhalava, T., Prakash, Y. S., Tchkonja, T., Robbins, P. D., Aubry, M. C., Passos, J. F., Kirkland, J. L., Tschumperlin, D. J., Kita, H. y LeBrasseur, N. K. (2017) "Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease", *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8. doi:10.1038/ncomms14532.

Schaue, D. y McBride, W. H. (2015) "Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer", *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group, 12(9), pp. 527-540. doi:10.1038/nrclinonc.2015.120.

Schmitt, C. A., Fridman, J. S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R. M. y Lowe, S. W. (2002) "A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy", *Cell*, 109(3), pp. 335-346. doi:10.1016/s0092-8674(02)00734-1.

Schwarze, S. R., Fu, V. X., Desotelle, J. A., Kenowski, M. L. y Jarrard, D. F. (2005) "The identification of senescence-specific genes during the induction of senescence in prostate cancer cells", *Neoplasia*. Neoplasia, 7(9), pp. 816-823. doi:10.1593/neo.05250.

Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E. y Beach, D. (1997) "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a", *Cell*, 88(5), pp. 593-602. doi:10.1016/s0092-8674(00)81902-9.

Sharpless, N. E., Ramsey, M. R., Balasubramanian, P., Castrillon, D. H. y DePinho, R. A. (2004) "The differential impact of p16INK4a or p19ARF deficiency on cell growth and tumorigenesis", *Oncogene*, 23(2), pp. 379-385. doi:10.1038/sj.onc.1207074.

Sharpless, N. E. y Sherr, C. J. (2015) "Forging a signature of in vivo senescence", *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 15(7), pp. 397-408. doi:10.1038/nrc3960.

Shay, J. W. y Bacchetti, S. (1997) "A survey of telomerase activity in human cancer", *Eur J Cancer*, 33(5), pp. 787-791. doi:10.1016/S0959-8049(97)00062-2.

Da Silva-Álvarez, S., Guerra-Varela, J., Sobrido-Cameán, D., Quelle, A., Barreiro-Iglesias, A., Sánchez, L. y Collado, M. (2020) "Cell senescence contributes to tissue regeneration in zebrafish", *Aging Cell*. Blackwell Publishing Ltd, 19(1), p. e13052. doi:10.1111/accel.13052.

Da Silva-Álvarez, S., Picallos-Rabina, P., Antelo-Iglesias, L., Triana-Martínez, F., Barreiro-Iglesias, A., Sánchez, L. y Collado, M. (2019) "The development of cell senescence", *Experimental Gerontology*. Elsevier Inc., 128, p. 110742. doi:10.1016/j.exger.2019.110742.

Sone, H. y Kagawa, Y. (2005) "Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice", *Diabetologia*, 48(1), pp. 58-67. doi:10.1007/s00125-004-1605-2.

Song, Y., Baba, T. y Mukaida, N. (2016) "Gemcitabine induces cell senescence in human pancreatic cancer cell lines", *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier B.V., 477(3), pp. 515-519. doi:10.1016/j.bbrc.2016.06.063.

Sousa-Victor, P., Gutarra, S., García-Prat, L., Rodríguez-Ubreva, J., Ortet, L., Ruiz-Bonilla, V., Jardí, M., Ballestar, E., González, S., Serrano, A. L., Perdiguer, E. y Muñoz-Cánoves, P. (2014) "Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence", *Nature*, 506(7488), pp. 316-321. doi:10.1038/nature13013.

Sritharan, S. y Sivalingam, N. (2021) "A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin", *Life Sciences*. Elsevier Inc., 278, p. 119527. doi:10.1016/j.lfs.2021.119527.

Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M. C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J. y Keyes, W. M. (2013) "Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning", *Cell*. Elsevier B.V., 155(5), pp. 1119-1130. doi:10.1016/j.cell.2013.10.041.

Sturmlechner, I., Zhang, C., Sine, C. C., van Deursen, E. J., Jeganathan, K. B., Hamada, N., Grasic, J., Friedman, D., Stutchman, J. T., Can, I., Hamada, M., Lim, D. Y., Lee, J. H., Ordog, T., Laberge, R. M., Shapiro, V., Baker, D. J., Li, H. y van Deursen, J. M. (2021) "p21 produces a bioactive secretome that places stressed cells under immunosurveillance", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 374(6567), p. eabb3420. doi:10.1126/science.abb3420.

Su, D., Zhu, S., Han, X., Feng, Y., Huang, H., Ren, G., Pan, L., Zhang, Y., Lu, J. y Huang, B. (2009) "BMP4-Smad signaling pathway mediates adriamycin-induced premature senescence in lung cancer cells", *Journal of Biological Chemistry*, 284(18), pp. 12153-12164. doi:10.1074/jbc.M807930200.

Sun, X., Shi, B., Zheng, H., Min, L., Yang, J., Li, X., Liao, X., Huang, W., Zhang, M., Xu, S., Zhu, Z., Cui, H. y Liu, X. (2018) "Senescence-associated secretory factors induced by cisplatin in melanoma cells promote non-senescent melanoma cell growth through activation of the ERK1/2-RSK1 pathway article", *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group, 9(3), p. 260. doi:10.1038/s41419-018-0303-9.

Suzuki, K., Mori, I., Nakayama, Y., Miyakoda, M., Kodama, S. y Watanabe, M. (2001) "Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere

shortening", *Radiation Research*. Radiation Research Society, 155(1), pp. 248-253. doi:10.1667/0033-7587(2001)155[0248:RISLGA]2.0.CO;2.

Tao, Y. F., Wang, N. N., Xu, L. X., Li, Z. H., Li, X. L., Xu, Y. Y., Fang, F., Li, M., Qian, G. H., Li, Y. H., Li, Y. P., Wu, Y., Ren, J. L., Du, W. W., Lu, J., Feng, X., Wang, J., He, W. Q., Hu, S. Y. y Pan, J. (2017) "Molecular mechanism of G1 arrest and cellular senescence induced by LEE011, a novel CDK4/CDK6 inhibitor, in leukemia cells", *Cancer Cell International*. BioMed Central Ltd., 17(1), p. 35. doi:10.1186/s12935-017-0405-y.

Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E. y Altman, R. B. (2011) "Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects", *Pharmacogenetics and Genomics*. Lippincott Williams and Wilkins, 21(7), pp. 440-446. doi:10.1097/FPC.0b013e32833ffb56.

Torres-Guzmán, R., Calsina, B., Hermoso, A., Baquero, C., Alvarez, B., Amat, J., McNulty, A. M., Gong, X., Boehnke, K., Du, J., De Dios, A., Beckmann, R. P., Buchanan, S. y Lallena, M. J. (2017) "Preclinical characterization of abemaciclib in hormone receptor positive breast cancer", *Oncotarget*, 8(41), pp. 69493-69507. doi:10.18632/oncotarget.17778.

Tsuji, T., Aoshiba, K. y Nagai, A. (2010) "Alveolar cell senescence exacerbates pulmonary inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease", *Respiration*, 80(1), pp. 59-70. doi:10.1159/000268287.

Villiard, É., Denis, J. F., Hashemi, F. S., Igelmann, S., Ferbeyre, G. y Roy, S. (2017) "Senescence gives insights into the morphogenetic evolution of anamniotes", *Biology Open*. Company of Biologists Ltd, 6(6), pp. 891-896. doi:10.1242/bio.025809.

Wajapeyee, N., Serra, R. W., Zhu, X., Mahalingam, M. y Green, M. R. (2008) "Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7", *Cell*. Elsevier B.V., 132(3), pp. 363-374. doi:10.1016/j.cell.2007.12.032.

Wang, B., Kohli, J. y Demaria, M. (2020) "Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes?", *Trends in Cancer*. Cell Press, 6(10), pp. 838-857. doi:10.1016/j.trecan.2020.05.004.

Wang, C., Jurk, D., Maddick, M., Nelson, G., Martin-ruiz, C. y Von Zglinicki, T. (2009) "DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice", *Aging Cell*, 8(3), pp. 311-323. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00481.x.

Wang, Y., Zhu, S., Cloughesy, T. F., Liau, L. M. y Mischel, P. S. (2004) "p53 disruption profoundly alters the response of human glioblastoma cells to DNA topoisomerase I inhibition", *Oncogene*, 23(6), pp. 1283-1290. doi:10.1038/sj.onc.1207244.

Watson, R. A., De La Peña, H., Tsakok, M. T., Joseph, J., Stoneham, S., Shamash, J., Joffe, J., Mazhar, D., Traill, Z., Ho, L. P., Brand, S. y Protheroe, A. S. (2018) "Development of a best-practice clinical guideline for the use of bleomycin in the treatment of germ cell tumours in the UK", *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, 119(9), pp. 1044-1051. doi:10.1038/s41416-018-0300-x.

Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R. A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C. y Lowe, S. W. (2007) "Senescence and tumour clearance is triggered by p53

restoration in murine liver carcinomas", *Nature*. Nature Publishing Group, 445(7128), pp. 656-660. doi:10.1038/nature05529.

Yosef, R., Pilpel, N., Papismadov, N., Gal, H., Ovadya, Y., Vadai, E., Miller, S., Porat, Z., Ben-Dor, S. y Krizhanovsky, V. (2017) "p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling", *The EMBO Journal*. EMBO, 36(15), pp. 2280-2295. doi:10.15252/embj.201695553.

Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahr, E., Condiotti, R., Ben-Porath, I. y Krizhanovsky, V. (2016) "Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL", *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7, p. 11190. doi:10.1038/ncomms11190.

Yoshida, A. y Diehl, J. A. (2015) "CDK4/6 inhibitor: from quiescence to senescence", *Oncoscience*, 2(11). doi:10.18632/oncoscience.256.

Yoshimoto, S., Loo, T. M., Atarashi, K., Kanda, H., Sato, S., Oyadomari, S., Iwakura, Y., Oshima, K., Morita, H., Hattori, M., Honda, K., Ishikawa, Y., Hara, E. y Ohtani, N. (2013) "Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome", *Nature*, 499(7456), pp. 97-101. doi:10.1038/nature12347.

Yun, M. H., Davaapil, H. y Brookes, J. P. (2015) "Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure", *Elife*, 4, p. e05505. doi:10.7554/eLife.05505.001.

Zhu, Y., Tchkonja, T., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Dai, H. M., Ling, Y. Y., Stout, M. B., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Johnson, K. O., Giles, C. B., Wren, J. D., Niedernhofer, L. J., Robbins, P. D. y Kirkland, J. L. (2016) "Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors", *Aging Cell*. Blackwell Publishing Ltd, 15(3), pp. 428-435. doi:10.1111/accel.12445.

Zhu, Y., Tchkonja, T., Pirtskhalava, T., Gower, A. C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A. K., Ikeno, Y., Hubbard, G. B., Lenburg, M., O'hara, S. P., Larusso, N. F., Miller, J. D., Roos, C. M., Verzosa, G. C., Lebrasseur, N. K., Wren, J. D., Farr, J. N., Khosla, S., Stout, M. B., McGowan, S. J., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Gurkar, A. U., Zhao, J., Colangelo, D., Dorronsoro, A., Ling, Y. Y., Barghouthy, A. S., Navarro, D. C., Sano, T., Robbins, P. D., Niedernhofer, L. J. y Kirkland, J. L. (2015) "The achilles' heel of senescent cells: From transcriptome to senolytic drugs", *Aging Cell*. Blackwell Publishing Ltd, 14(4), pp. 644-658. doi:10.1111/accel.12344.

Zindy, F., Quelle, D., Roussel, M. y Sherr, C.J. (1997) "Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging", *Oncogene*, 15, pp. 203-211. doi:10.1038/sj.onc.1201178.

Para poder proliferar sin límites, las células de cáncer evitan entrar en senescencia celular, que es un estado de detención del ciclo celular estable en el tiempo. Pese a ello, la quimioterapia puede inducir senescencia en las células tumorales, impidiendo que continúen dividiéndose. En esta tesis se han estudiado los mecanismos moleculares implicados en este proceso, poniendo especial atención a las proteínas p53, p21WAF1/CIP1 y retinoblastoma. Si bien la reducción de la expresión de p53 o retinoblastoma no afectó a la inducción de senescencia, la ausencia de p21WAF1/CIP1 provocó la aparición de muerte y senescencia celular. Algunos de los quimioterápicos estudiados permitían que las células continuasen proliferando cuando la ausencia de p21WAF1/CIP1 se producía antes del tratamiento.