CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE INMORTALIZACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE CÉLULAS MADRE NEURALES DE EMBRIÓN DE RATÓN

Tamara González Mosquera

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICNA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO

2018

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE INMOTALIZACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE CÉLULAS MADRE NEURALES DE EMBRIÓN DE RATÓN

D./Dña. Tamara González Mosquera

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
4) *Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Cmpostela, 31 de Mayo de 2018.

Fdo: Tamara González Mosquera

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE INMORTALIZACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE CÉLULAS MADRE NEURALES DE EMBRIÓN DE RATÓN

D. Victor Manuel Arce Vázquez (director)

D. Jose Antonio Costoya Puente (tutor)

INFORMAN:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. ***Tamara González Mosquera****, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Santiago de Compostela, 31 de Mayo de 2018.

Fdo. D. Victor Manuel Arce Vázquez

Fdo. D. Jose Antonio Costoya Puente

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Declaración de conflicto de interés

La doctoranda, Doña Tamara González Mosquera, declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral “Estudio de los mecanismos de inmortalización de una línea celular derivada de células madre neurales de embrión de ratón”.

En Santiago de Compostela, a 8 de junio de 2018.

Fdo: Tamara González Mosquera

Quiero agradecer a mi jefe de tesis la oportunidad brindada para iniciarme en el mundo de la investigación. Me ha enseñado que nosotros mismos debemos ser los primeros pensantes en nuestro trabajo y que las ideas, tras estudio y reflexión pueden partir de nosotros mismos. A mis compañeros de laboratorio, incluídos todos, por su apoyo, ayuda y horas de trabajo compartidas.

A mis amigas del alma, todas ellas doctoras (no es por presumir), ya que, con su ejemplo me han dado fuerza y ánimo para alcanzar nuestro objetivo: culminar nuestras investigaciones en una tesis doctoral.

A continuación desearía hacer una reflexión para finalizar con un agradecimiento especial. Cuando comienzas a trabajar en un laboratorio y empiezas a bucear en los entresijos de diferentes problemas o preguntas, ignoras el largo camino que comienzas. Es largo y duro pero engancha. Es duro sobre todo cuando la situación de soporte no acompaña, cuando los medios escasean y cuando, más que nunca, se convierte en un seguir adelante a ciegas por voluntad y satisfacción personal. Han existido épocas en las que la tesis, por desgracia, o no, nunca se sabe, no ha sido mi única ocupación; todo ello hace que en determinados momentos veas alejarse tu objetivo y, porque no decirlo, momentos en los que no crees poder alcanzar las metas que te has propuesto. Además si, en un momento dado, decides que ha llegado el momento de ser madre y a ello acompaña que tu marido, también doctor, tenga que recorrer medio mundo para realizar su estancia postdoctoral, todo se

complica aún más. El momento resultó crítico y es aquí donde comienza mi más sincero agradecimiento a mi núcleo, a mi pequeño mundo conformado por personas que me quieren y valoran tanto que siempre hicieron todo lo posible y más porque este proyecto no quedará apartado para siempre. Mi marido, el padre de nuestra pequeña, mi gran apoyo. Gracias por creer en que esto saldría adelante pese a todas las complicaciones que hemos tenido que sobrellevar. Gracias por convencerme de que el fin merecía la pena por un futuro mejor para nuestra familia. Gracias a mi familia, gracias, gracias y gracias. En especial a mi madre y a mi suegra. No tengo nada más que decir que, sin vosotras, esto no hubiera sido posible. Agradezco tener a cada una de las personas que tengo a mi lado, soy muy afortunada por ello. Nunca el significado de proyecto común ha tenido mayor sentido para mi como ahora. Estáis en cada línea, en cada figura y en cada referencia. Esta tesis es vuestra.

Y por último, agradezco a mi hija la fuerza que ha sacado en mí. Seguir adelante y alcanzar mis metas han adquirido un nuevo significado desde que está con nosotros. Espero que esto le sirva el día de mañana para que sepa que puede lograr cualquier objetivo que se fije y que, como hicieron conmigo, creeré en ella hasta el final y haré todo lo que pueda y más porque lo consiga. Gracias Candela, eres, sin duda, nuestro mejor proyecto, nuestro mejor resultado.

Estudio de los mecanismos de inmortalización de una línea celular derivada de células madre neurales de embrión de ratón

RESUMO

As células nai neurales (NSC) utilizáronse amplamente como unha ferramenta para investigar os mecanismos responsables da reparación neural, e foron consideradas como a fonte dunha serie de terapias de substitución prometedoras en diversas enfermidades neurodegenerativas. Con todo, o seu uso está limitado pola súa relativa rareza e localización anatómica, e tamén porque os métodos para o illamento e a caracterización adoitan consumir moito tempo e teñen algunhas limitacións técnicas. Neste estudo describimos un procedemento que permite o illamento de células inmortalizadas con características NSC obtidas de embrións de cerebro de rato. Dado que estas células poden manterse indefinidamente en cultivo, poden constituír unha fonte permanente de NSC que poden usarse para estudos de investigación sobre desenvolvemento e rexeneración neural. Ademais, atopamos que, en desacordo con outros tipos de células como os fibroblastos, o proceso de inmortalización asóciase coa activación permanente dos puntos de control que inducen a senescencia celular. En xeral, estes achados suxiren que, dependendo do tipo celular, existen diferentes mecanismos poden regular o proceso de senescencia.

PALABRAS CHAVE

senescencia replicativa, células nai neurales, inmortalización celular

RESUMEN

Las células madre neurales (NSC) se han utilizado ampliamente como una herramienta para investigar los mecanismos responsables de la reparación neural, y han sido consideradas como la fuente de una serie de terapias de reemplazo prometedoras en diversas enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, su uso está limitado por su relativa rareza y localización anatómica, y también porque los métodos para el aislamiento y la caracterización suelen consumir mucho tiempo y tienen algunas limitaciones técnicas. En este estudio describimos un procedimiento que permite el aislamiento de células inmortalizadas con características NSC obtenidas de embriones de cerebro de ratón. Dado que estas células pueden mantenerse indefinidamente en cultivo, pueden constituir una fuente permanente de

NSC que pueden usarse para estudios de investigación sobre desarrollo y regeneración neural. Además, hemos encontrado que, en desacuerdo con otros tipos de células como los fibroblastos, el proceso de inmortalización se asocia con la activación permanente de los puntos de control que inducen la senescencia celular. En general, estos hallazgos sugieren que, dependiendo del tipo celular, existen diferentes mecanismos pueden regular el proceso de senescencia.

PALABRAS CLAVE

senescencia replicativa, células madre neurales, inmortalización celular

SUMMARY

Neural stem cells (NSC) have been extensively used as a tool to investigate the mechanisms responsible for neural repair, and they have been also considered as the source for a series of promising replacement therapies in various neurodegenerative diseases. However, their use is limited by their relative rarity and anatomical localization, and also because the methods for isolation and characterization are usually time consuming and have some technical limitations. In this study we describe a procedure that allows the isolation of immortalized cells with NSC characteristics obtained from mouse brain embryo. Since these cells can be maintained indefinitely in culture, they may constitute a permanent source of NSC that can be used for research studies on neural development and regeneration. In addition, we have found that, at odds with other cell types such as fibroblasts, the immortalization process is associated with permanent activation of checkpoints that are reported to induce cellular senescence. In all, these findings suggests that, depending on the cell type, different mechanisms may regulate the senescence process.

KEYWORDS

replicative senescence, neural stem cells, cell immortalization

1 INTRODUCCIÓN
1.1 La senescencia celular y el límite de hayflick 1
1.1.1 Cómo Hayflick encontró su “límite” 3
1.2 Los telómeros y la telomerasa 5
1.3 La célula senescente 7
1.3.1 El fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) 11
1.3.2 Mecanismos y regulación del SASP 12
1.3.3 El fenotipo senescente y patologías relacionadas con la edad 14
1.4 Senescencia y apoptosis 15
1.4.1 Factores que determinan la relación entre senescencia y apoptosis 16
1.4.1.1 Nivel de estrés 16
1.4.1.2 El eje p53-p21 16
1.4.1.3 La señalización de PTEN-AKT 18
1.4.1.4 Efectores e inhibidores de la apoptosis 19
1.4.2 Resistencia a la apoptosis o sensibilidad a la senescencia 21
1.5 Senescencia y Cáncer 24
1.5.1 La senescencia celular y la supresión tumoral 24
1.5.1.1 Supresión tumoral autónoma 25
1.5.1.2 Supresión tumoral no autónoma 25
1.5.2 La senescencia celular y la promoción y progresión tumoral 26
1.5.2.1 Proliferación de células tumorales 26
1.5.2.2 Inmunosenescencia e inmunoedición 27
1.5.3 La senescencia celular y la terapia contra el cáncer 28
1.5.3.1 Terapia de inducción a senescencia 28
1.5.3.2 Terapia anti-SASP 30
1.5.3.3 Terapia alternativa basada en la senescencia 30
1.5.3.4 Terapia de eliminación de la senescencia 31
1.6 Glía 31
1.6.1 Revisión histórica: pasos iniciales 31
1.6.2 Evolución del concepto de glía 32
1.6.3 Tipos celulares 35
1.6.4 Orígenes y diferenciación de la glía 37
1.6.5 Astroglía en la neurogénesis 38
1.6.6 Glía en enfermedades neurológicas 41

1.7 Células madre neurales y neurogénesis en el adulto 47
1.7.1 Revisión histórica 47
1.7.2 NSC en el cerebro del adulto de mamíferos 49
1.7.3 Funciones de la neurogénesis en el adulto 55
1.7.4. Estrategias para la generación y aislamiento de NSC 56
1.7.5 Papel de los factores en la proliferación y diferenciación de NSC 61
1.7.6 Las NSC y su transformación a glioblastoma 62

2 OBJETIVOS 66

3 MATERIALES Y MÉTODOS
3.1 Evaluación del estado senescente e inmortalización de la línea celular derivada de células madre neurales 71
3.1.1 Animales de experimentación 71
3.1.2 Extracción de embriones murinos 72
3.1.3 Homogenización de cerebros embrionarios 73
3.1.4 Cultivos primarios de células madre neurales 73
3.1.5 Cultivos primarios de fibroblastos embrionarios murinos 75
3.1.6 Cultivos de neuroesferas neonatales de ratón 75
3.1.7 Evaluación de la senescencia 76
3.1.7.1 Test de senescencia 77
3.1.7.2 Protocolo de visualización y recuento de células senescentes 77
3.1.8 Formación de neuroesferas embrionarias 78
3.1.8.1 Tipos de neuroesferas 79
3.1.8.2 Control de formación de neuroesferas tardías 80
3.1.8.3 Formación secundaria de neuroesferas 81
3.1.8.4 Cuantificación y medición de los diferentes grupos de neuroesferas 82

3.2 Caracterización de células madre neurales y neuroesferas 83
3.2.1 Inmunocitoquímica 83
3.2.1.1 Evaluación de la expresión de marcadores de linaje neural 83
3.2.1.2 Neuroesferas incluídas en parafina 85
3.2.2 Ensayos de proliferación celular 87
3.2.3 Citometría de flujo 87
3.2.4 Western Blot 89
3.2.5 Estudio del efecto del medio condicionado sobre neuroesferas neonatales 90
3.2.6 Análisis estadísticos 91

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN
4.1 Generación de cultivos inmortalizados a partir de cultivos primarios de MEA 97
4.2 Caracterización de las células inmortalizadas 105

5 CONCLUSIONES 123

6 BIBLIOGRAFÍA 127

7 ANEXO: Immortalizartion of a cell line with Neural Stem Cell (NSC) characteristics derived from mouse embryo brain. 147

Introducción

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La senescencia celular y el límite de Hayflick

Hace más de medio siglo, Leonard Hayflick descubrió que las células humanas en cultivo tienen una capacidad limitada para dividirse, después de lo cual se vuelven senescentes siguiendo un fenómeno que hoy se conoce como el "límite de Hayflick". Los hallazgos de Hayflick fueron controvertidos en ese momento, y siguen siendo cuestionados en algunos círculos, pero sus logros han permitido hacer progresos considerables hacia la comprensión y la manipulación de los mecanismos moleculares del envejecimiento.

Para poner los descubrimientos de Hayflick en contexto, tenemos que remontarnos a 1881 (figura 1), cuando el biólogo alemán August Weismann especuló que "la muerte se lleva a cabo debido a que un tejido envejecido o desgastado no puede renovares indefinidamente; la capacidad de renovación por división celular no es eterna sino finita". Este concepto fue posteriormente cuestionado por el cirujano y premio Nobel francés Alexis Carrel, quien sugirió que todas las células explantadas en cultivo eran inmortales, y que la falta de replicación celular continua se debía a problemas técnicos para establecer las condiciones óptimas del cultivo. Carrel se basaba en sus trabajos realizados junto a su colega Albert Ebeling en el Instituto Rockefeller en Nueva York, en los que afirmaban que los fibroblastos cardiacos de pollo crecieron continuamente durante 34 años. Esto condujo a la idea general de que todas las células de vertebrados podían dividirse indefinidamente en cultivo celular. Sin embargo, las observaciones originales de Carrel no podían ser reproducidas por otros científicos, por lo que se pensó que pudieron haber cometido un error experimental. Se supo que las células se alimentaron diariamente con extractos de tejido de embrión de pollo, lo que permitía la adición de células vivas frescas al cultivo en cada renovación de medio. Se ha sugerido que

Carrel era conocedor de este error, pero nunca lo admitió, e incluso si esa explicación era falsa, nadie ha confirmado hasta la fecha el trabajo de Carrel.

Aún así, los experimentos de Carrel fueron de gran importancia, ya que, de ser válidos, significaban que las células normales liberadas de los mecanismos de control *in vivo* podían sobrevivir de manera normal y, al parecer, para siempre. Sin embargo, los informes que mostraban las dificultades de los cultivos celulares a largo plazo comenzaron a emerger cuando Leonard Hayflick y Paul Moorhead entraron en el campo. Ellos demostraron la capacidad replicativa finita de fibroblastos humanos normales, interpretando el fenómeno del envejecimiento a nivel celular.

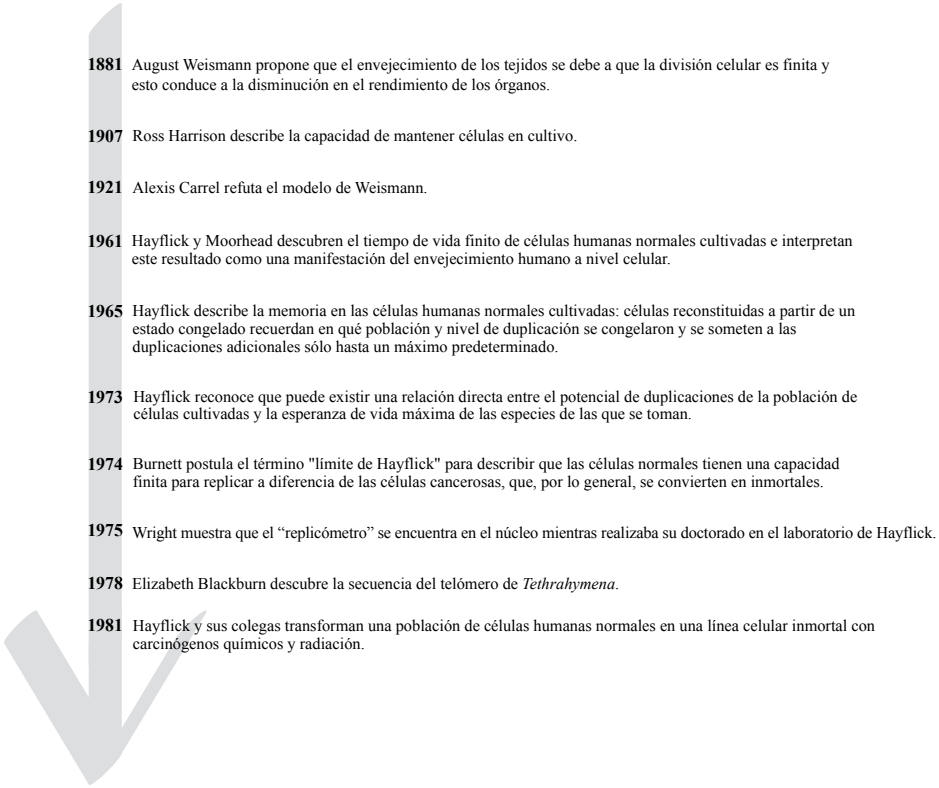

Figura 1. Cronograma de las investigaciones de Hayflick

1.1.1 Cómo Hayflick encontró su "límite"

Después de obtener su Ph.D. en 1956 por la Universidad de Pennsylvania, Hayflick pasó dos años con una de los expertos más destacados de la época en el cultivo de tejidos, Charles M. Pomerat. En 1958, Hayflick fue contratado para poner en marcha el laboratorio de cultivo celular del Instituto Wistar e iniciar una investigación sobre la posible etiología viral del cáncer. Tenía la intención de exponer las células embrionarias humanas normales a los extractos de células cancerosas con la esperanza de observar cambios similares al cáncer en las células normales. Cuando las células normales no crecieron, Hayflick pensó que podría haber cometido un error en la preparación del medio de cultivo o cualquier otro error de tipo técnico. Estaba asumiendo que lo postulado por Carrel era correcto, y que las células podrían propagarse indefinidamente si se les proporcionaban las condiciones adecuadas. Para Hayflick el hecho de que el número de divisiones celulares estuviera involucrado en el envejecimiento era una idea completamente nueva. Pero Hayflick era joven y ambicioso, y una serie de experimentos cuidadosamente realizados durante cerca de tres años le convenció de que el fracaso de sus células normales para replicar indefinidamente no se debió a errores técnicos.

En 1961, en colaboración con el citogenetista Paul Moorhead, Hayflick hizo una serie de experimentos que desafiaron las opiniones de Carrel. Hayflick y Moorhead mostraron que las poblaciones cultivadas de fibroblastos humanos normales se duplicaron un número finito de veces, después de lo cual las células dejaron de dividirse y entraron en lo que Hayflick denomina fenómeno de fase III (senescencia). Llamó a la fase de cultivo primario fase I; la fase de crecimiento exponencial, fase II; y el periodo en el que la replicación celular se reducía y finalmente se detenía, fase III (figura 2). Estos experimentos demostraron que la interpretación de que todas las células eran inmortales era incorrecto. El principio detrás de estos experimentos era simple: Hayflick y Moorhead mezclaron por igual fibroblastos humanos masculinos que se habían dividido muchas veces (cuadragésima duplicación) con fibroblastos femeninos que se habían dividido menos (décima duplicación de la población). Las poblaciones de células sin mezclar se mantuvieron como controles. Cuando el cultivo de

células masculinas detuvo su división, el cultivo mixto fue examinado y se encontraró sólo la presencia de células femeninas. Esto demostró que las células con más duplicaciones recordaban que eran “viejas”, incluso cuando se encontraban rodeadas de células “jóvenes”, y que los errores técnicos o virus contaminantes eran explicaciones inverosímiles de por qué sólo el componente de las células masculinas había muerto. Hayflick estaba convencido de que las células normales tenían una capacidad finita para replicar, y que su comportamiento difería profundamente del de las células cancerosas cultivadas (por ejemplo, HeLa), que son inmortales. Fue esta la idea de la que se originó el concepto de inmortalización de células normales.

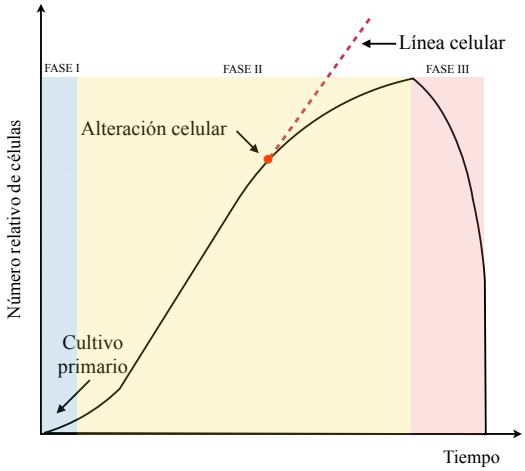

Figura 2. Representación esquemática de la evolución del cultivo y el fenómeno de alteración celular. Fase I: el cultivo primario termina con la formación de la primera capa confluente. Fase II: se caracteriza por un crecimiento exponencial que requiere muchos sub-cultivos. Se puede producir una alteración en cualquier momento, dando lugar a una línea celular, cuya vida potencial es infinita. Sin embargo, las cepas de células entran generalmente en la fase III y mueren después de un período de tiempo finito. (Adaptado de Hayflick, 1977)

La existencia de un mecanismo de recuento está implícito en dos de las observaciones de Hayflick: la primera, que las células fetales humanas

normales cultivadas sólo se someten a un número específico de duplicaciones de la población, y la segunda, que las células criopreservadas pueden "recordar" el número de veces que se han dividido en el momento de la congelación. Aunque este mecanismo ha sido referido como un reloj o temporizador, el límite replicativo de las células normales está relacionado con las rondas de replicación del ADN, y no con el paso del tiempo. Hayflick sugirió el término "*replicometer*" o replicómetro que se utiliza para designar el contador de eventos moleculares. En 1975, un estudiante de doctorado en el laboratorio de Hayflick, Woodring Wright, demostró que el replicómetro se encontraba en el núcleo de la célula.

1.2 Los telómeros y la telomerasa

En la década de 1970 se descubrió que una de las propiedades de la replicación del ADN era evitar que las células pudieran copiar los extremos de ADN lineal, llamados telómeros, en su totalidad. Debido a la naturaleza de la síntesis de la hebra retrasada, la ADN polimerasa no puede replicar completamente el extremo 3' del dúplex de ADN lineal. Esto se conoce como el problema de replicación terminal, postulado en 1972 por James Watson. Casi al mismo tiempo, Alexey Olovnikov, biólogo teórico ruso, conocedor del trabajo de Hayflick, entraba en una estación de metro de Moscú mientras se preguntaba cómo las células normales pueden tener una capacidad limitada para replicar, y, cuando el tren se detuvo, tuvo un destello de intuición. Olovnikov vio una analogía entre el tren en representación de la ADN polimerasa y las vías que representaban el ADN. Olovnikov se dio cuenta de que este acortamiento repetido de la molécula de ADN en cada ronda de replicación podría explicar la constatación de Hayflick de que las células normales pueden replicar sólo un número específico de veces. Aunque publicado en ruso y en inglés, las ideas de Olovnikov permanecieron ignoradas en la literatura.

La presencia de los telómeros en los extremos de los cromosomas había sido observada y estudiada por Hermann Muller en 1938 y en las investigaciones de Barbara McClintock. Sin embargo, la función de estas estructuras en la replicación celular no estaba clara. En ese momento no hubo evidencias de que los telómeros impidieran la fusión de los extremos

de los cromosomas entre sí y que permitieran al cromosoma adherirse a la envoltura nuclear en algunas especies.

En 1978, Elizabeth Blackburn, del grupo de Joseph Gall, encontró que los telómeros del protozoo ciliado, *Tetrahymena thermophila,* consistían en una simple secuencia de repeticiones hexaméricas de nucleótidos (TTGGGG). Los telómeros en las células humanas también se componen de miles de repeticiones, pero en los mamíferos la secuencia es TTAGGG. Una vez que esta secuencia fue conocida, la longitud de los telómeros humanos pudo ser medida. Los primeros indicios de que los telómeros se acortan en humanos aparecieron en 1986, cuando se demostró que las longitudes de los telómeros no son las mismas en todos los tejidos. Estos estudios culminaron en la demostración de que los telómeros se acortan en fibroblastos humanos normales que se dividen en cultivo. Estas observaciones iniciales y otras apoyaron el concepto de que el desgaste de los telómeros limita la proliferación celular normal en el cultivo.

Si unos telómeros acortados limitan la tasa de crecimiento celular, tenía que haber una solución al problema de los telómeros en los organismos inmortales, en las células de la línea germinal de organismos superiores y en las células cancerosas. Esa solución surgió de nuevo en los estudios con *Tetrahymena* por Carol Greider, un estudiante graduado en el laboratorio de Elizabeth Blackburn. Greider y Blackburn descubrieron la enzima telomerasa que sintetiza y alarga los telómeros. La telomerasa se encontró más tarde en extractos de líneas celulares humanas inmortales y en la mayoría de los tumores humanos. La telomerasa contiene una plantilla o molde de ARN sobre la que se hacen los nuevos telómeros. Este componente fue clonado unos años más tarde y, posteriormente, la parte catalítica de la enzima.

Sin embargo, la idea de que el acortamiento de los telómeros causa senescencia celular ha sido demostrado recientemente. Se basa en la introducción de la parte catalítica de la telomerasa en células humanas normales. Las células humanas normales transfectadas que expresan de manera estable la telomerasa pueden mantener la longitud de sus telómeros, y superar su vida útil máxima en más de cinco veces. Así que el mecanismo normal de la longevidad por determinación del acortamiento de los

telómeros en las células humanas puede ser evitado (pruebas del papel de acortamiento de los telómeros en la senescencia celular y de la expresión de la telomerasa en la inmortalidad celular).

Este descubrimiento tiene profundas implicaciones teóricas y prácticas que incluyen la inmortalización de las células humanas normales para la producción de proteínas comercialmente importantes. Como hay métodos sensibles para detectar la telomerasa en una sola célula, el ensayo de telomerasa es una herramienta de diagnóstico potencial para la detección de células cancerosas en muestras clínicas.

Hayflick propuso que el acortamiento de los telómeros puede ser el equivalente molecular de la determinación de la longevidad. Cientos de cambios fisiológicos, moleculares y de comportamiento en cultivos de células humanas normales anuncian la proximidad del límite de Hayflick. Estos cambios denotan un creciente desorden molecular, y ponen en peligro el medio interno, lo que lleva a la pérdida de la función celular. Hayflick sugirió que el número de duplicaciones que una célula normal podría ser la expresión *in vitro* de la longevidad máxima potencial. *In vitro*, marcarían la pérdida inminente de la capacidad replicativa e, *in vivo*, aumentarían la vulnerabilidad a la enfermedad y la muerte.

1.3 La célula senescente

Como hemos visto hasta ahora, el paradigma de Hayflick demuestra que las células normales, no transformadas, no se pueden duplicar indefinidamente en cultivo a menos que se conviertan en células malignas. A día de hoy se sabe que células cultivadas murinas pueden sufrir de manera ocasional una transformación espontánea, pasando de un estado normal con capacidad de división celular finita a un estado premaligno o maligno con divisiones celulares ilimitadas (Macieira-Coelho, 1988). Se ha demostrado que esta transición es atribuible, en parte, a la expresión de la telomerasa por la mayoría de la células malignas (Hayflick, 2001).

Según mostró Hayflick, después de una proliferación lenta inicial le siguió una fase de crecimiento casi lineal, que terminó en una disminución de la capacidad proliferativa durante la cual las células adquirían una morfología agrandada, vacuolización de su citoplasma e incapacidad para

continuar con el ciclo celular. Desde el principio se sugirió que las células pueden entrar en un estado senescente (metabólicamente activa pero sin capacidad de división) con el fin de evitar la transformación maligna, y por lo tanto el cáncer (Campisi, 2001 y 2005). Esta idea atrajo un gran interés como demuestra el gran número de publicaciones relevantes al respecto.

Se propuso que la entrada en el estado senescente estaba mediada por, al menos, dos vías diferentes, vinculadas a la activación de dos proteínas supresoras de tumores, la vía de p53/p21 y la vía de $p16^{INK4a}$/pRB (figura 3). Ambas vías son complejas, con varios reguladores aguas arriba y efectores aguas abajo, así como la modificación de las ramas laterales y la interacción entre las vías. Una diferencia importante entre ambas es que la vía de $p16^{INK4a}$/pRB conlleva un arresto o detención esencialmente irreversible de la proliferación celular, mientras que p53/p21 no se traduce necesariamente en una detención irreversible del crecimiento. p53 y pRB son reguladores maestros de la transcripción, p21 es un efector aguas abajo de p53 y $p16^{INK4a}$ es un regulador positivo aguas arriba de pRB. p21 y $p16^{INK4a}$ son inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina y, como tales, potentes inhibidores del ciclo celular.

Entre los estímulos que inducen una respuesta senescente están el daño genómico, incluyendo la disfunción de los telómetros, que activa la respuesta al daño al ADN (RDA) que, a su vez, activa la vía de p53/p21. La respuesta inicial al daño genómico es una RDA rápida y robusta, en cuestión de minutos u horas como máximo, y transitoria. Si el daño es lo suficientemente grave como para provocar una respuesta de la senescencia, la RDA, y por consiguiente, la activación de la vía p53/p21 pueden persistir (Levine y Oren, 2009). La RDA persistente lleva a la detención del crecimiento y senescencia, lo que podría activar otras vías de señalización como las controladas por las quinasas activadas por estrés p38MAPK y PKC. Las células senescentes también presentan niveles elevados de especies reactivas del oxígeno (ROS) que pueden desencadenar otras vías de señalización. Algunas de estas vías iniciadas por ROS estimularán $p16^{INK4a}$/pRB, vía responsable de la irreversibilidad de la detención del crecimiento (Beausejour et al., 2003).

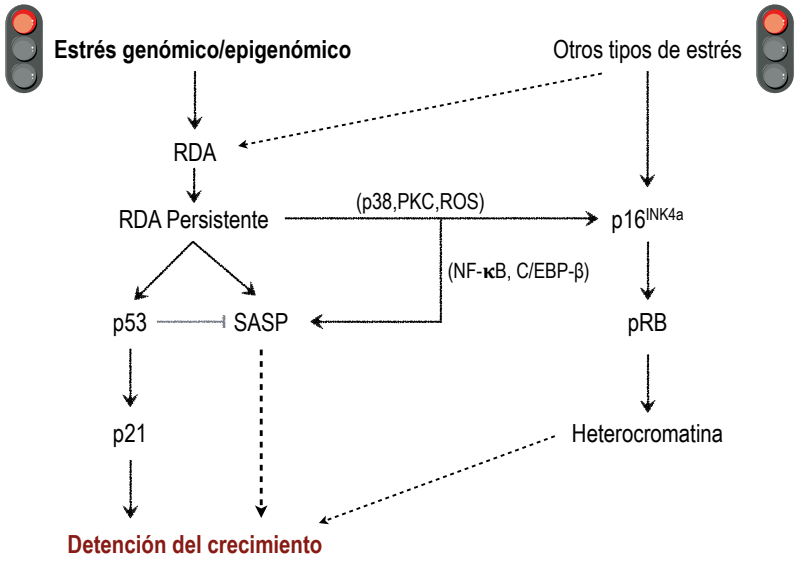

Figura 3. Regulación de la detención del crecimiento. La senescencia celular se inicia por daño genómico o epigenómico, que activa la Respuesta por Daño al ADN (RDA). La RDA en última instancia se convierte en persistente o crónica, lo que conduce a la activación de p38MAPK y la PKC, así como un aumento de las ROS y la expresión del supresor de tumores $p16^{INK4a}$. El estrés que no implique daño genómico o epigenómico directamente también puede inducir la expresión de $p16^{INK4a}$ y en algunos casos puede provocar indirectamente una RDA (línea discontinua). $p16^{INK4a}$ activa el supresor de tumores pBR, que silencia ciertos genes pro-proliferativos por heterocromatinización, estableciendo de este modo una detención de la proliferación celular. p53 también causa la detención del crecimiento, principalmente mediante la inducción de la expresión del inhibidor del ciclo celular p21. NF-κB denota el factor nuclear kappa B.

Las células senescentes se pueden caracterizar por, al menos, dos procedimientos. El primero y más utilizado consiste en una tinción específica para células que expresan β-galactosidasa a pH 6 (óptimo de células senescentes), denominado SA-βgal. Esta tinción es un marcador fiable de células senescentes y fue utilizado para demostrar *in vivo* que las células senescentes, en efecto, se acumulan con la edad en los tejidos (figura 4). Se pudo probar en fibroblastos de piel humana que las células SA-βgal-positivas se acumulan con el tiempo en cultivo a través de pases

secuenciales. El segundo de los métodos para la caracterización de estas células fue la reacción de Maillard de los productos finales de la glicación avanzada (*advanced glycation end-products*, AGEs), que se sabe que juega un papel importante en las modificaciones dependientes de la edad en tejidos; modificaciones que hacen aumentar la acumulación de SA-βgal.

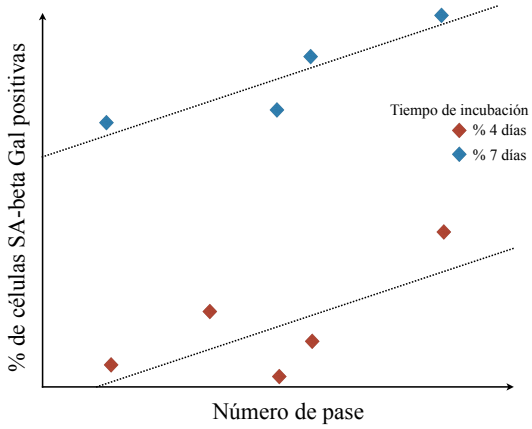

Figura 4. Incremento con el tiempo de cultivo (4 y 7 días) e incremento de pases (abscisa) de la expresión de SA-β-Gal. Los cultivos secuenciales se iniciaron después de 4 días en cultivo (rojo) o después de 7 días en cultivo (azul) (Adaptado de Hayflick, 1977).

Otro marcador utilizado para el rastreo de células que entran en senescencia es la expresión de $p16^{INK4a}$. Su expresión es baja o indefectible en la mayoría de las células normales no transformadas y tejidos, pero se ve incrementada después de la inducción de la senescencia por varios estímulos (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007). La mayoría de los inductores de la senescencia causan daño genómico tanto en los loci de daño al ADN como en las RDA. Estos loci son denominados loci inducidos por la disfunción telomérica o TIFs cuando se encuentran en regiones teloméricas o DNA-SCARS (segmentos de ADN con alteraciones de la cromatina que refuerzan

la senescencia). Estos loci presentan varios marcadores de daño al ADN como 53BP1. Las DNA-SCARS pueden colocalizarse con PML (proteína de leucemia promielocítica), cuerpos nucleares y pueden presentar activación de proteínas-RDA como fosfo-CHK2, directamente implicada en la respuesta del SASP (*Senescence Associated Secretory Phenotype*). Los loci de daño al ADN pueden ser persistentes en tejidos con estrés genotóxico así como en tejidos envejecidos de ratón y primate (Herbig *et al.*, 2006 y Wang *et al.*, 2009). El loci de heterocromatina asociado a senescencia (SAHC) se asocia con el silenciamiento de ciertos genes pro-proliferativos (Kosar *et al*., 2011). También se ha observado la regulación positiva de la proteína supresora de tumores DECI (*Deleted in Esophageal Cancer*) y DcR2 (*Decay Receptor 2*) (Collado *et al*., 2005), ambas dianas para la transactivación de p53. Las células senescentes también presentan una regulación negativa de la expresión de la proteínas de la lámina nuclear, lamin B1 (LMNB1) (Shimi *et al.*, 2001).

1.3.1 El fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP)

El fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, *Senescence Associated Secretory Phenotipe*) se encuentra implicado en el desarrollo de la senescencia del organismo, así como en las enfermedades relacionadas con la edad (figura 5). Su desarrollo implica a un gran número de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y proteasas. De acuerdo con la naturaleza de los factores que intervienen en la activación del fenotipo secretor, las células senescentes pueden participar en procesos tanto beneficiosos como perjudiciales. Algunos factores derivados del SASP pueden estimular la proliferación celular mediante la activación del GRO (oncogén regulador del crecimiento) (Coppé *et al*., 2010) y de la anfiregulina (factor de crecimiento que interviene en el desarrollo ductal de las glándulas mamarias). Otros factores producidos por el SASP pueden participar en la neovascularización por la activación de VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) (Coppé *et al*., 2006). El fenotipo secretor también es capaz de inducir la vía de señalización WNT, así como de activar la IL-6 e IL-8. Esta activación de IL-6 e IL-8 puede, a su vez estimular o inhibir la señalización WNT y la proliferación celular (Elzi *et al*., 2012). Los

factores SFRP1 e IL-6 pueden interferir en la proliferación de células madre y modificar sus nichos (Krtolica *et al*., 2011). Otro efecto importante de los factores derivados del SASP es la iniciación y/o potenciación del proceso inflamatorio, un rasgo relevante en el agravamiento de las enfermedades asociadas a la edad (Freund *et al*., 2010).

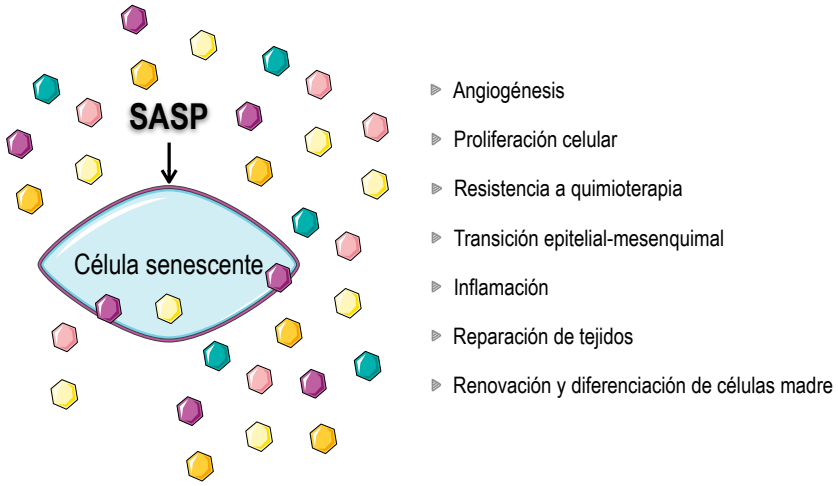

Figura 5. Actividades del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). Los numerosos factores que componen el SASP y que presentan varias actividades biológicas, son altamente dependientes del contexto fisiológico. Los hexágonos representan factores del SASP que actúan dentro y fuera de la célula senescente.

1.3.2 Mecanismos y regulación del SASP

El fenotipo secretor de las células senescentes es aparentemente el resultado del daño genómico o epigenómico. Las células que entran en senescencia por otros mecanismos, como por ejemplo, la activación de p21 o $p16^{INK4a}$, no exhiben el SASP. Este es, por tanto, el resultado de daños en el ADN, la disfunción de los telómeros, las señales epigenómicas o mitogénicas y el estrés oxidativo. Es importante hacer constar que el elevado número de señales que inducen el SASP pueden explicar la variedad en su presentación. Uno puede asumir que la activación del fenotipo

secretor podría servir para preparar los tejidos circundantes para su reparación y la restitución de células dañadas. Pero estas funciones requieren procesos de regulación subyacentes. Gran parte de los procesos que llevan al SASP están regulados positivamente por proteínas de RDA como ATM (serina/treonina quinas implicada en la regulación de los procesos de control de la división celular), NBS1 (síndrome de Nijmegen) y CHK2 (Pazzoli *et al*., 2012). El efecto estimulador de estas proteínas está condicionado por una RDA persistente anterior. Esta señalización persistente se desarrolla lentamente durante varios días en cultivo, después de la disminución de la señal inicial de la RDA.

Para el desarrollo del fenotipo secretor, las DNA-SCARS y los TIF son de particular importancia. La razón está en que estas proteínas nucleares activan proteínas de la RDA necesarias para la señalización permanente por RDA (Rodier *et al*., 2011). Otro mecanismo importante para el desarrollo del SASP es su activación directa por la acción de NF**κ**B (Acosta *et al*., 2008), así como por C/EBP-β (Kuliman *et al*., 2008). Estos últimos transactivadores actúan aguas abajo de las cascadas que controlan la expresión de genes de citoquinas pro-inflamatorias, especialmente en células inmunes. La respuesta temprana a la senescencia viene marcada por estímulos que inducen la activación de la expresión de genes que codifican IL-1α (Orjalo *et al*., 2009). Esta citoquina se une a su receptor (IL1R) situado en la membrana plasmática, que a su vez, inicia la activación de la cascada de señalización de NF**κ**B. Esto, a su vez, induce la transcripción de los genes que codifican IL-6 e IL-8, activos en la mediación de la inflamación. La detención del crecimiento inducida por oncogenes se refuerza y mantiene por estas citoquinas. En contraste con la regulación positiva de la RDA, p53 regula negativamente el desarrollo del SASP por inhibición (Coppé *et al*., 2008). La inactivación de p53, en ausencia de $p16^{INK4a}$ (inducción de la detención reversible del crecimiento), resultará en un reinicio de la proliferación celular pero sin inhibición del fenotipo secretor. Esto puede resultar en un evento peligroso para las células ya que podría inducir malignidad en las células vecinas.

1.3.3 El fenotipo senescente y patologías relacionadas con la edad

Los datos expuestos hasta ahora demuestran un papel importante de las células senescentes en el envejecimiento del organismo y en las patologías relacionadas con la edad. Los resultados proponen que ciertos SASP pueden resultar en la inducción de un fenotipo maligno (Campisi *et al*., 2011). Los fibroblastos senescentes en cultivo en 3D muestran interrupción del tejido normal y ramificación. Este efecto de los fibroblastos senescentes se atribuyó a la producción de MMPs (metaloproteinasas de matriz), conocido subproducto del SAPS (Coppé *et al.*, 2010). Este efecto se manifiesta en el envejecimiento de las estructuras de la mama, por ejemplo. En células musculares lisas de la arteria pulmonar se observa una estimulación de la migración y proliferación de las mismas por la secreción de IL-6 e IL-8 (Noureddine *et al*., 2011). Este proceso puede conducir a los síntomas característicos de la arterioesclerosis, como el engrosamiento de la íntima e hipertrofia de la media, lo que resulta en hipertensión pulmonar. Funciones perjudiciales similares se puede atribuir a las células senescentes en el envejecimiento de la piel (Velarde *et al*., 2012). Las células senescentes y algunos de los productos derivados del fenotipo secretor podrían contribuir al adelgazamiento de la piel acompañada de pérdida de colágeno con la edad. Otro ejemplo de la implicación de las células senescentes que exhiben SASP en las enfermedades relacionadas con la edad son el deterioro cognitivo observado en la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson (Salminen *et al*., 2011). Del mismo modo, los condrocitos senescentes están implicados en la osteoartritis y la degeneración del disco intervertebral (Shane Anderson y Loeser, 2010). El fenotipo senescente también se ha relacionado con la degeneración macular, la EPOC, enfisema y resistencia a la insulina (Campisi, 2011). Sin embargo, las relaciones causales y los mecanismos subyacentes aún no se ha dilucidado.

Se han desarrollado ratones transgénicos INK-ATTAC (Baker *et al*., 2011) para arrojar luz acerca de la relación entre las células senescentes y las patologías relacionadas con la edad. En estos ratones un elemento promotor impulsa la expresión de la caspasa 8 unida a la proteína de fusión FK-506. Cuando se administra el fármaco AP20187, la proteína se dimeriza activando la caspasa 8 e induciendo la apoptosis. Cuando los ratones INK-

ATTAC se cruzan con ratones progeroides que expresan constitutivamente una variedad hipomórfica de la proteína de control de ciclo BubR1 (BubR1H/H), se obtienen animales que presentan envejecimiento prematuro y altos niveles de mortalidad por insuficiencia cardiaca. Los ratones BubR1H/H-INK-ATTAC tratados con el fármaco presentaron protección para la mayoría de patologías relacionadas con la edad (cataratas, sarcopenia o pérdida de grasa cutánea) que exhibía la cepa original, aunque no se observaron incrementos significativos en su esperanza de vida.

1.4 Senescencia y apoptosis

Se desconoce como una célula individual en el embrión escoge entre la senescencia y la apoptosis como destinos alternativos. Se sabe que en ratones knock-out para p21 se sustituye la senescencia por una apoptosis compensatoria (Munoz-Espin *et al.*, 2013). Esta observación plantea la posibilidad de que las vías de la apoptosis y la senescencia participen simultáneamente en determinados procesos o respuestas al estrés. Y esta relación marcará en cada tipo celular qué ocurrirá primero, senescencia o apoptosis (figura 6). A continuación analizaremos los factores moleculares emergentes en la elección de un destino u otro.

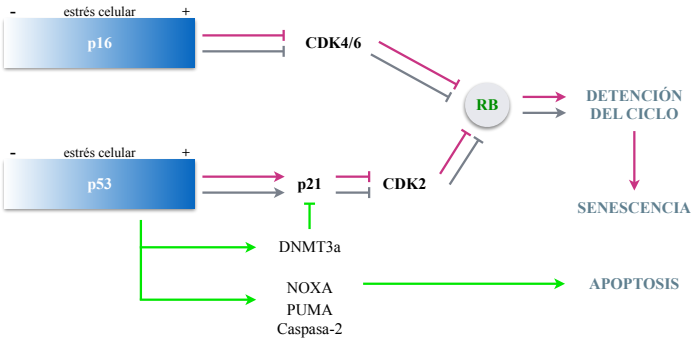

Figura 6. Vías de señalización que marcan la elección entre la detención del ciclo celular, la senescencia y la apoptosis. La vía que conduce al arresto en gris, la que lleva a la senescencia en morado, y la que conduce a la apoptosis en verde. La decisión para activar p16, p53, o ambas se determina por el nivel de estrés y el tipo celular. (Adaptado de Childs et al. 2014).

1.4.1 Factores que determinan la relación entre senescencia y apoptosis

1.4.1.1 Nivel de estrés

En algunas circunstancias, mientras que la apoptosis es una abrumadora respuesta al estrés, la senescencia es una consecuencia de un daño menos severo. Por ejemplo, la doxorrubicina (antibiótico usado como quimioterápico) en células de cáncer de mama conduce a apoptosis en dosis altas y a la senescencia en dosis bajas (Song *et al*., 2005). Una respuesta dependiente de dosis similar se observa en cardiomiocitos neonatales de rata (Altieri *et al*., 2012). Otro factor que conduce a senescencia a dosis bajas y apoptosis a altas es la exposición al etopósido o a la UVB en fibroblastos (Debacq *et al*., 2005). El daño oxidativo también induce un efecto de dosis-respuesta (altas dosis de H_2O_2 causan apoptosis, mientras que dosis más bajas inducen senescencia (Chen *et al.*, 2000)). Sin embargo, algunos agentes que producen daños severos en el ADN, como el busulfán (agente antineoplásico usado principalmente en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica) causan senescencia pero no apoptosis independientemente de la dosis (Probin *et al.*, 2006). Esto sugiere que la naturaleza del daño al ADN, además de su severidad, puede determinar la respuesta celular. Por último, el tipo celular también es un factor determinante. Los fibroblastos estromales humanos envejecen en respuesta a un máximo de 50 Gy de radiación ionizante, mientras que los linfocitos T sufren apoptosis en respuesta a 2 Gy de radiación. No está claro si estos diferentes resultados se deben a diferencias en la eficiencia de reparación del ADN o a "preferencias" aguas abajo de la apoptosis o la senescencia. Por lo tanto, los factores cruciales por los que una célula responde a los daños a través de la senescencia o la apoptosis son el tipo celular, la naturaleza del daño o estrés y la intensidad del mismo.

1.4.1.2 El eje p53-p21

Además de la naturaleza y el grado de estrés, el equilibrio entre las vías pro-senescentes y pro-apoptóticas también decide el destino celular. Una de estas vías está controlada por el supresor tumoral p53, que en un principio se demostró que desencadenaba la apoptosis en respuesta al estrés celular, pero que ahora se sabe que, dependiendo del tipo de célula y del tipo de

estrés, modula genes implicados en la homeostasis, la detención transitoria del ciclo celular y la senescencia (Murray-Zmijewski *et al*., 2008). Los niveles de p53, su cinética y su actividad transcripcional son los determinantes clave de cómo las células responden a diferentes factores de estrés (figura 6). Por ejemplo, el destino de los MEF que presentan la mutación R172P en p53 es la senescencia en lugar de la apoptosis en respuesta a la radiación UVB. Estos MEF no logran incrementar los niveles de los factores pro-apoptóticos PUMA y NOXA y expresan altos niveles de BCL-2 (pro-supervivencia) (Tavana *et al*., 2010). Por el contrario, en fibroblastos diploides humanos tratados con una dosis de H_2O_2 suficiente para inducir una mezcla de apoptosis y senescencia, presentan inducción de p53 en ambos casos, pero en células destinadas a la apoptosis los niveles se duplican (Chen *et al*., 2000). Curiosamente, en fibroblastos de pulmón sometidos a senescencia por IR existe una sobreexpresión de miembros de la familia de PKC. Estos miembros reducen los niveles de BCL-2, fosfo-BAD y fosfo-CREB, lo que conduce a una inducción de p53 y finalmente apoptosis. Esta apoptosis dependiente de p53 se basa en una combinación del nivel de expresión del propio p53 así como las modificaciones traduccionales que regulan su actividad y localización. La observación de que la expresión de p53 es necesaria, pero no suficiente para la senescencia inducida por oncogenes o daño al ADN sugiere que, del mismo modo, los cambios post-traduccionales de p53 son importantes para la senescencia (Marusyk *et al*., 2007).

La cinética de expresión es una forma adicional a través de la cual p53 es regulado para controlar el destino celular. Los bajos niveles de radiación γ inducen un aumento temporal de los niveles de p53 (Geva-Zatorsky *et al*., 2006), que conduce a una detección transitoria del ciclo celular seguida de una recuperación. Sin embargo, cuando se evita la degradación de p53 por la Nutlin-3a (inhibidor de la MDM2), se estabilizan los niveles altos de p53, lo que conduce a senescencia celular (Purvis *et al*., 2012).

La transactivación preferente mediada por p53 de genes diana de apoptosis o senescencia puede tomar su destino celular de manera directa (figura 6). Esta activación está regulada por modificaciones post-traduccionales y la cooperación entre los dominios de unión al ADN del

tetrámero de p53 (Knights *et al*., 2006). Mutantes de función muestran un solo sitio de acetilación en p53 que puede controlar la elección entre senescencia y apoptosis (Li *et al.*, 2012). En células provenientes de ratones mutados p53K117R/K117R (el aceptor lisina es reemplazado por una arginina) no se puede regular positivamente PUMA y NOXA para inducir apoptosis, pero si se puede producir un arresto del ciclo celular y senescencia a través de la regulación positiva de p21.

p21 es una de las dianas cruciales de p53. Este promueve la detención inicial del ciclo en células que, a continuación, presentarán apoptosis o senescencia. Se ha propuesto que la expresión de p21 regula negativamente la apoptosis dependiente de p53. Existe una relación inversa entre p21 y la sensibilidad esperada a la apoptosis ya que existen estudios sugieren la posibilidad de que p21 se suprima activamente en la apoptosis (Zang *et al*., 1999).

1.4.1.3 La señalización de PTEN-AKT

PTEN convierte al segundo mensajero lipídico PIP3 en PIP2, suprimiendo de esta manera la actividad PI3K y AKT, que son las quinasas que controlan las vías importantes para la progresión del ciclo celular, así como el tamaño y el metabolismo celular. El eje PTEN/PI3K/AKT también es importante para la elección entre apoptosis y senescencia como destino celular. La pérdida completa de PTEN induce senescencia en células humanas y murinas de manera independiente a la hiperproliferación post-daño al ADN, y la activación de la quinasa ATM (Alimonti *et al*., 2010). Esto se encuentra en marcado contraste con la senescencia causada por la sobreexpresión de Ras. Sin embargo, algunos tipos celulares proliferan en ausencia de PTEN, aunque la respuesta al estrés se manifieste de forma alterada. Por ejemplo, en respuesta a la radiación, las células *wild type* para PTEN de glioma acaban en apoptosis mientras que las células PTEN *nulas* se someten a senescencia dependiente de ROS/p53/p21 (Lee *et al*., 2011). Por el contrario, la deficiencia de AKT confiere resistencia a la senescencia replicativa y promueve la apoptosis en condiciones de estrés oxidativo (Nogueira *et al.*, 2008). Recientemente se ha demostrado que las funciones nucleares de PTEN, incluida la reparación del daño al ADN, dependen de la

sumoilación en K254 (Bassi *et al*., 2013). Alterar selectivamente las funciones nucleares de PTEN en la RDA en lugar de interrumpir su actividad fosfatasa citosólica supondría un área de investigación prometedora.

La senescencia celular por deficiencia de PTEN o por activación de AKT ocurre a través de la activación de mTORC1, que requiere la actividad de p53 y su unión a p21 (Astle *et al*., 2012) (Figura 7). La rapamicina (inmunosupresor que inhibe la respuesta a la IL-2) inhibe mTOR produciendo un retraso en la entrada en senescencia replicativa o senescencia inducida por progerina (Demidenko *et al*., 2009). Si mTOR es el centro de señalización relevante de la vía PTEN-PI3K/AKT para la decisión senescencia/apoptosis, la rapamicina debe promover la apoptosis en condiciones de estrés. De hecho, la rapamicina aumenta la apoptosis en células humanas y murinas tratadas con cisplatino.

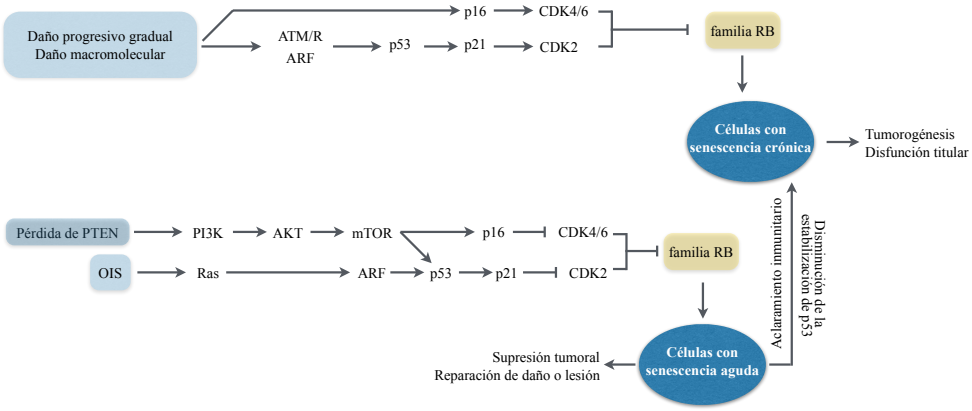

Figura 7. Representación esquemática de las vías p53-p21 y PTEN-AKT, en función del efecto de diferentes factores así como sus diferentes destinos (Adaptado de Childs et al., 2014).

1.4.1.4 Efectores e inhibidores de la apoptosis

El hecho de que las células dañadas presenten un bloqueo de su capacidad para ejecutar el programa apoptótico, puede marcar su destino

celular hacia la senescencia. Aunque la ruta apoptótica extrínseca tiene una parte que es caspasa-dependiente, la vía intrínseca se basa en caspasas en múltiples estados (Marino *et al*., 2014). Por ejemplo, el daño al ADN estabiliza p53 para activar la caspasa-2 como intermediario, que desencadena la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) (Vakifahmetoglu *et al*., 2006). MOMP permite la liberación del citocromo c mitocondrial, activando el apoptosoma. El apoptosoma a continuación hace funcionar las caspasas 3, 6 y 9, que degradan proteínas para desencadenar los cambios morfológicos característicos de la apoptosis y causar la muerte celular (Zou *et al.*, 1999). La inhibición de las caspasas, por tanto, bloquea la apoptosis intrínseca en muchas etapas de la ruta, dejando la senescencia como destino celular alternativo. El tratamiento de células de neuroblastoma con doxorubicina y un inhibido pan-caspasa previene la apoptosis y promueve la senescencia (Rebbaa *et al*., 2003). Del mismo modo, células hemotopoyéticas deficientes de FANC (proteínas asociadas a la anemia de Fanconi que están involucradas en la replicación del ADN y la respuesta a daño) acaban en apoptosis bajo estrés oxidativo, pero el bloqueo de la misma por inhibición de las caspasas permite que las células sobrevivan y se conviertan en senescentes (Zhang *et al*., 2005).

La manipulación de mediadores aguas arriba de la apoptosis, tales como las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, también pueden influir en la elección entre senescencia y apoptosis como destino celular. La sobreexpresión de Bcl-2 (que previene la liberación del citocromo c durante la MOMP) fuerza la senescencia en fibroblastos tratados con dosis letales de doxorubicina (Nelydova *et al.*, 2007). Esto también ocurre en células cancerosas, en las que la senescencia inducida por quimioterapia es un importante destino celular alternativo a la apoptosis. Uno de los primeros estudios sobre la función de p53 independiente de apoptosis en el cáncer, mostró que los linfomas murinos con sobreexpresión de Bcl-2 en respuesta a la ciclofosfamida, desencadenan senescencia dependiente de p53/p16 en lugar de apoptosis (Schmitt *et al.*, 2002).

1.4.2 Resistencia a la apoptosis o sensibilidad a la senescencia

Si la senescencia y la apoptosis son verdaderamente destinos celulares alternativos, una hipótesis sería que los cambios celulares pro-senescentes fueran activamente anti-apoptóticos y que las células senescentes fueran resistentes a la apoptosis. Seluanov y sus colegas demostraron que células WI-38 de pases bajos desencadenan en apoptosis dependiente de p53 en respuesta a la actinomicina D, bajas dosis de cisplatino o radiación UVB, mientras que la apoptosis independiente de p53 se produce a dosis altas de cisplatino y etopósido (Seluanov *et al*., 2001). Cuando las células senescentes se expusieron a estímulos apoptóticos dependientes de p53, se volvieron necróticas. La expresión exógena de p53 en estas células restauró su capacidad de someterse a la apoptosis dependiente de p53. La respuesta de las células senescentes a los agentes p53-independientes fue similar a la observada en las células de pases bajos, sugiriendo que la resistencia a la apoptosis de las células senescentes está mediada por cambios en la señalización de p53 (Figura 8).

El objetivo de la resistencia a la apoptosis también puede ser la supervivencia celular. La senescencia inducida por una leve exposición al H_2O_2 promueve la supervivencia en respuesta a estímulos como la radiación UVB, en parte, por la regulación positiva de BCL-2 (a pesar de los cambios epigenéticos represivos globales) (Sanders *et al.*, 2013). Al igual que los rayos UVB, altas dosis de H_2O_2 aumentan la expresión de p53, lo que conduce a la apoptosis dependiente de p53. Los fibroblastos humanos senescentes resisten la apoptosis en respuesta a la serodeprivación mediante el mantenimiento de altos niveles de BCL-2 (Wang, 1995). Esta regulación positiva de proteínas anti-apoptóticas en células senescentes podría explicar la resistencia a la estaurosporina (indolocarbazol inhibidor de la PKC que aumenta las respuestas mediadas por AMPc en células de neuroblastoma humano). Esta, desencadena apoptosis de manera p53-independiente, lo que indica que alteraciones en p53 durante la senescencia no pueden ser directamente responsables de esta resistencia (Wang *et al*. 2007). Sin embargo, en MEF y células cancerosas de colon, la estaurosporina requiere PUMA para ejecutar la apoptosis. La sobreexpresión de BCL-2 interactúa

con PUMA y NOXA en estas células, de un modo similar a lo que ocurre durante la senescencia.

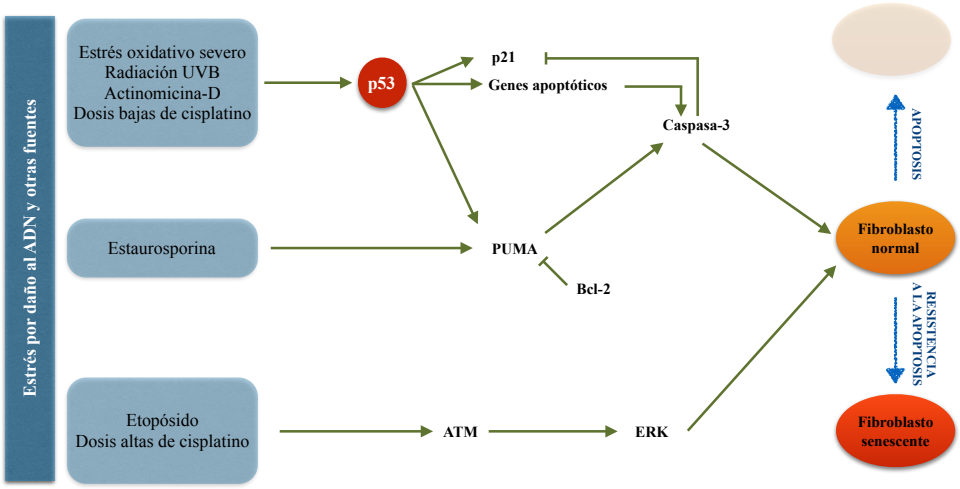

Figura 8. Representación de las vías que conducen a la apoptosis, a la resistencia a la apoptosis y las que marcan la sensibilidad de las células endoteliales a la apoptosis. Los fibroblastos senescentes son resistentes a estímulos de apoptosis mediados por p53, tales como la actinomicina D, el cisplatino a dosis bajas y la estaurosporina. Esta resistencia puede ser explicada por los niveles bajos de p53 debido a su disminución estabilizada en células senescentes, así como la existencia de modificaciones post-traduccionales de p53 específicas de senescencia.

No sólo los fibroblastos pueden escapar de una muerte apoptótica. Los queranocitos primarios senescentes regulan el incremento de NF-JB para resistir a la apoptosis inducida por UVB. Cuando estas células entran en G0 después de alcanzar la confluencia es cuando se convierten en UVB resistentes. Se ha demostrado también que la salida del ciclo celular en líneas celulares de cáncer de colon conduce a senescencia. De manera similar a la confluencia, la extensión del ciclo celular puede promover la resistencia a la apoptosis, al permitir un tiempo adicional para reparar el

daño. Dentro de este marco, pases tardíos de fibroblastos humanos no senescentes (con un ciclo celular extendido) regulan positivamente BCL-XL y resisten a la apoptosis inducida por UVB (Rochette y Brash, 2008). La modulación del ciclo celular, ya sea por su extensión o por su salida a G0, es un elemento de confusión en los estudios acerca de la resistencia a la apoptosis de las células senescentes.

En contraste a los fibroblastos y queranocitos, las células endoteliales senescentes son más susceptibles a la apoptosis que sus vecinas no senescentes. Por ejemplo, las células endoteliales de la arteria pulmonar porcina experimentan apoptosis espontánea a pases en los que deberían comenzar a presentar signos de senescencia replicativa. Estos cambios van seguidos de una disminución de la expresión de BCL-2 y un aumento de la de BAX (Zhang et al., 2002). Del mismo modo, células endoteliales senescentes humanas de la vena umbilical (HUVEC) se someten a un aumento de muerte apoptótica en respuesta a la cerámida C2 exógena (Hampel et al., 2004). Se ha demostrado que esta apoptosis inducida por ceramida es dependiente de p53, aunque en casos de apoptosis inducida por radiación, la producción de ceramida es p53 independiente (Pruschy *et al*., 1999).

Los fibroblastos muestran una reducción de la sensibilidad a la apoptosis con el aumento de pases celulares mientras que las HUVEC son cada vez más susceptibles a lo largo de los pases (muestran menor actividad de la sintasa anti-apoptótica endotelial -eNOS-) (Matsushita *et al*., 2001). Hoffman y sus colegas atribuyen la pérdida de producción de NO a la reducción de AKT, que fosforila y activa la eNOS (Fulton *et al*., 1999). Otros mecanismos que también pueden estar implicados en la senescencia de las células endoteliales son el aumento de los niveles de caveolina-1 (regulador negativo de eNOS). La activación de la vía PTEN/PI3K/AKT se reduce durante la senescencia de las células endoteliales radiadas y en HUVEC expuestas a altos niveles de glucosa (Yentrapalla *et al*., 2013). Sin embargo, la actividad de AKT se eleva durante la senescencia replicativa de las células endoteliales. Por tanto, las variaciones en la sensibilidad a la apoptosis entre células endoteliales y fibroblastos senescentes pueden

reflejar diferencias en la forma en que estas modulan factores pro-supervivencia, como la eNOS, o la alteración de la vía PTEN/PI3K/AKT.

1.5 SENESCENCIA Y CÁNCER

El cáncer aumenta exponencialmente con la edad y se origina a partir de células que proliferan de manera no regulada, un fenómeno que es contrarrestado por la senescencia celular. La senescencia es un potente proceso de supresión de tumores que detiene la proliferación, esencialmente de forma irreversible, de las células en riesgo de transformación maligna. Hoy en día existen una serie de fármacos que inducen a las células tumorales a someterse a la senescencia celular. Sin embargo, a pesar de que la respuesta a la senescencia puede detener la proliferación de las células cancerosas, la presencia de células senescentes en los tejidos se ha asociado con enfermedades relacionadas con la edad, incluyendo el cáncer. Por lo tanto, las terapias contra el cáncer que pueden inducir la senescencia también pueden conducir a fenotipos de envejecimiento y a patologías relacionadas con la edad. Los efectos perjudiciales de las células senescentes derivan de su fenotipo secretor o SASP (visto anteriormente). El SASP implica la secreción de numerosas citocinas inflamatorias, factores de crecimiento y proteasas que pueden hacer del microambiente del tejido un lugar favorable para el crecimiento tumoral.

1.5.1 La senescencia celular y la supresión tumoral

La senescencia celular se reconoce como un potente mecanismo de supresión celular. La inducción de la senescencia previene la proliferación de células potencialmente tumorales (células en riesgo de transformación maligna) por mecanismos tanto autónomos como no autónomos (próximos apartados). La presencia de células senescentes en lesiones premalignas en varios modelos tumorales de ratón y pacientes humanos concuerda con la actuación de la senescencia celular como un freno para el desarrollo del cáncer. De hecho, las células tumorales deben pasar por alto los mecanismos de la respuesta a la senescencia con el fin de proliferar.

1.5.1.1 Supresión tumoral autónoma

La inducción y el mantenimiento de la detención del crecimiento por senescencia dependen de las funciones de las vías p53/p21 y p16/pRb (visto anteriormente). La regulación positiva de una o ambas vías provoca una detención del crecimiento y estado senescente esencialmente permanente. Estas vías inhiben la expresión y/o función de genes que promueven la progresión del ciclo celular. La mutación o el silenciamiento epigenético de, al menos, un regulador crucial de estas vías permitirá a las células cancerosas pasar por alto el punto de control de la senescencia y avanzarán hacia la tumorogénesis (Serrano *et al*., 1997).

1.5.1.2 Supresión tumoral no autónoma

Además de la detención permanente del ciclo celular, las células senescentes muestran cambios en su expresión génica, incluyendo la expresión de microRNAs, y en la composición de su matriz extracelular (Collado y Serrano, 2010). Estos cambios son diferentes de los que normalmente se producen durante la quiescencia o la diferenciación. La senescencia celular implica un gran aumento en la expresión y secreción de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y proteasas que ya anteriormente hemos denominado como fenotipo secretor asociado a senescencia o SASP. Los componentes del SASP pueden atraer y activar las células inmunes, que eliminarán las inmediaciones senescentes dañadas así como las células potencialmente oncogénicas (Krizhanovsky *et al*., 2008). Las células senescentes pueden reclutar a las NK y células T para el microambiente del tejido, iniciando respuestas citolíticas en las propias células senescentes y en células tumorales vecinas. Estas respuestas son importantes *in vivo*, como muestran estudios recientes en los que se logró la inactivación de las células NK por anticuerpos capaces de bloquear la regresión tumoral mediada por senescencia. Por otra parte, la secreción de citocinas y quimiocinas por parte de las células senescentes en lesiones premalignas puede activar un aclaramiento inmunitario denominado "*senescence surveillance*" por una respuesta adaptativa mediada por las células T $CD4^+$ (Xue *et al*., 2007).

Se ha demostrado que otros factores del fenotipo secretor son capaces de reforzar la detención del crecimiento de manera autocrina. Estos factores incluyen el receptor 2 de IL-8, el inhibidor de plaminógeno 1 (PAI-1) y la proteína de unión-7 (IGFBP-7) (Acosta *et al*., 2008; Kortlever *et al.*, 2006; Wajapeyee *et al*., 2008).

1.5.2 La senescencia celular y la promoción y progresión tumoral

Los microambientes tisulares pueden proporcionar un medio permisivo para la tumorogénesis maligna. Tales ambientes se caracterizan generalmente por un suministro sostenible de factores de crecimiento así como por mecanismos para escapar del sistema inmune y favorecer la persistencia y el crecimiento de las células cancerosas. Curiosamente, las células senescentes con SASP, pueden mejorar la proliferación de células epiteliales neoplásicas (Bavik *et al*., 2006). El SASP también puede promover una transición epitelio-mesénquima, paso crítico en el desarrollo del cáncer metastático (Laberge *et al*, 2012). Además, se ha demostrado que factores del SAPS promueven fenotipos malignos en cultivo y crecimiento tumoral *in vivo* (Krtolica *et al*., 2001). En modelos de ratón con xenoinjertos, las células senescentes pueden estimular el crecimiento y la invasividad de las células premalignas cercanas al injerto. Esto es debido, en parte, a la secreción de metaloproteinasas de la matriz por parte de las células senescentes (Liu y Hornsby, 2007). Por lo tanto, en contraste con su acción supresora de tumores, los factores del SASP también pueden actuar como potentes promotores tumorales y, de este modo, alimentar la tumorogénesis maligna.

1.5.2.1 Proliferación de células tumorales

Factores del SASP como GRO, IL-6 y Wnts pueden ser potentes estimuladores de la proliferación celular (vistos con anterioridad). La secreción de estos factores de crecimiento por las células senescentes puede estimular y mantener la proliferación en las inmediaciones de las células malignas y premalignas. El crecimiento sostenido del tumor puede, con el tiempo, superar la capacidad del huésped para eliminar las células cancerosas, lo que inclinará la balanza a favor de la progresión

tumorogénica. En estos casos, la acumulación de células senescentes con la edad podría servir como una fuente importante de factores para las células tumorales. Por tanto, el aumento del riesgo de padecer cáncer con la edad podría, en parte, ser una consecuencia del aumento en el número de células senescentes que presentan SASP durante el envejecimiento. Sin embargo, aún no se ha demostrado que el impacto de las células senescentes que se acumulan de forma natural con la edad, sea lo que promueva la progresión del cáncer a edades avanzadas *in vivo*.

1.5.2.2 Inmunosenescencia e inmunoedición

Se ha demostrado que un sistema inmune deficiente desempeña un papel importante en la promoción del cáncer (Fulop *et al*., 2010). Mientras los mecanismos inmunológicos de vigilancia eliminan las células dañadas y tumorales, la disminución en la producción de células inmunes durante el envejecimiento (inmunosenescencia) puede reducir la capacidad del organismo para eliminar las células tumorogénicas, promoviendo así el desarrollo de tumores malignos. Además de la inmunosenescencia, la capacidad de las células tumorales para adaptarse a escapar de los mecanismos de vigilancia puede favorecer aún más la persistencia de las células cancerosas. Este proceso, denominado inmunoedición, se observa en células tumorales expuestas de manera continuada a las células inmunes (Chow *et al*., 2012). Células tumorales aisladas de ratones inmunocompetentes (de tipo salvaje) fueron capaces de desarrollar tumores cuando fueron transplantadas en ratones inmunocompetentes. No ocurrió lo mismo cuando se trataba de células tumorales aisladas de ratones inmunodeficientes (RAG2 -/-, por ejemplo) (Shankaran *et al*., 2001). Este resultado sugiere que los tumores formados en ausencia de un sistema inmune intacto son más inmunogénicos que los tumores que surgen en huéspedes inmunocompetentes. En el caso de tumores que se desarrollan en entornos inmunodeficientes, las células ya no son reconocidas por el sistema inmunitario como extrañas. La presencia de células senescentes con expresión de SASP alrededor de los tumores puede exacerbar la inmunoedición y, eventualmente, permitir el crecimiento de células cancerosas inmunorresistentes.

1.5.3 La senescencia celular y la terapia contra el cáncer

Las terapias para pacientes con cáncer avanzado incluyen generalmente la resección quirúrgica del tumor, la quimioterapia intensiva multimodal, terapia de radiación o una combinación de estos. Debido a que la detención del crecimiento por supresión tumoral mediada por la senescencia es tan potente y esencialmente irreversible, se ha propuesto inducir la senescencia a células tumorales como posible terapia contra el cáncer (Nardella *et al*., 2011). Este enfoque de la terapia pro-senescencia se ha desarrollado en los últimos años, de modo que en la actualidad existen una serie de compuestos en fase de ensayo clínico que inducen la senescencia. Sin embargo, esta estrategia de terapia presenta complicaciones por las posibles propiedades pro-tumorogénicas de las células senescentes y el SASP. Por lo tanto, se debe aprovechar la capacidad anti-tumoral de la senescencia y equilibrarla con la potencial promoción de tumores del SASP.

1.5.3.1 Terapia de inducción a senescencia

Varios de los tratamientos usados como agentes quimioterápicos pueden promover la senescencia celular tanto en cultivo como *in vivo*. Además de sus acciones citotóxicas en células tumorales, ciertas terapias como la radiación ionizante pueden desencadenar la senescencia mediante la inducción de graves daños en el ADN (Shay y Wright, 2011). La capacidad de estos agentes para promover la senescencia celular podría desempeñar un papel crucial en la inhibición del crecimiento del tumor. Aunque muchas células tumorales adquieren mutaciones que les permiten pasar por alto la senescencia, existen factores que pueden reactivar las vías, reprimiendo así el crecimiento de las células cancerosas. Tales factores, ya sean moléculas biológicas o químicas resultan prometedoras como terapia.

El mediador de la vía AKT/PKB, PTEN, es uno de los genes supresores de tumores que más frecuentemente se pierde o inactiva en tumores humanos, sobre todo en los de próstata. La pérdida de una de las copias del gen predispone fuertemente al desarrollo del cáncer, mientras que la pérdida completa de PTEN puede conducir a una respuesta de senescencia celular dependiente de p53. Las intervenciones terapéuticas que comprometen gravemente la actividad de PTEN o la vía AKT/PKB pueden ser una

estrategía eficaz para inducir la senescencia *in vivo*. Es importante destacar que la senescencia inducida por PTEN no lleva a una RDA o a un estado hiperproliferativo (Alimonti *et al*., 2010) que típicamente están inducidos por la activación de muchos oncogenes, lo que evita una acumulación de células dañadas que favorezcan la progresión del cáncer.

Se han iniciado ensayos preclínicos con agentes farmacológicos que activan la vía p53-p21. La LY83583 es un inductor farmacológico de p21 y, por tanto, puede promover la senescencia celular e inhibir la proliferación de células tumorales en cultivo en casos de cáncer colorrectal (Lodygin *et al.*, 2002). Las moléculas PRIMA-I y MIRA-I pueden restaurar la función del p53 mutado, promoviendo la regresión del tumor (Wiman, 2010). PRIMA-I se encuentra actualmente en la fase II de ensayos clínicos para el tratamiento de neoplasias hematológicas y el cáncer de próstata. Otra terapia en estudio es la que consiste en mejorar la estabilidad y/o actividad de p53 de tipo salvaje por la interrupción de la interacción p53/Mdm2 (Nardella *et al*., 2011). Sedermetan (JNJ-26854165), un inhibidor de Mdm2, se encuentra actualmente en fase I de ensayos clínicos (Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development) para el tratamiento de tumores sólidos en fase avanzada. RO 5045337, otro inhibidor de Mdm2, también está en fase I (Hoffmann-La Roche) para el tratamiento de neoplasias hematológicas. En China, desde 2003, se utiliza la terapia génica para la reintroducción de p53. La Gendicina TM (Shenzhen SiBiono Genetech) es un vector adenovírico para la expresión de p53 recombinante humana y se utiliza como tratamiento para el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Se cree que las células tumorales son dependientes de uno o más oncogenes específicos a fin de mantener sus fenotipos malignos (Felsher, 2008). La inactivación de una sóla oncoproteína (por ejemplo, Myc) en tumores de ratón puede inducir la senescencia de las células tumorales y la regresión eventual de los tumores (Wu *et al*., 2007). Las moléculas que regulan negativamente la expresión de Myc o la interacción entre Myc y sus socios obligados (como por ejemplo, Max) también están siendo investigadas como terapias contra el cáncer (Larsson *et al.*, 2010). Quarfloxin (CX-3453) que inhibe la expresión de Myc, se encuentra en fase

II de ensayo clínico (Cylene Pharmaceuticals) para tratar la reducción de carcinomas neuroendocrinos de grado intermedio.

1.5.3.2 Terapia anti-SASP

Mientras que la inducción de la senescencia de células tumorales puede detener el crecimiento del tumor, el SASP asociado puede promover la proliferación e invasión de células adyacentes. Estas células escaparían a la terapia y al sistema inmunológico, lo que resultaría en una recaída del cáncer. Es por esto que, en este tipo de abordaje se desarrollan estrategias dirigidas a la inhibición de los componentes que promueven el fenotipo secretor. Los fármacos que se dirigen específicamente al SASP aún no se han desarrollado, desde luego no para uso clínico, pero numerosas investigaciones se dirigen en la actualidad hacia este fin.

El SASP se produce como una respuesta tardía a los daños en el ADN (ya visto). Un evento de iniciación importante es el aumento de expresión de la IL-1α que activa la señalización a través de la membrana de su receptor (Orjalo *et al*., 2009). Por lo tanto, podría ser interesante desarrollar compuestos que interrumpan la señalización del receptor de IL-1.

El SASP también depende de la activación de otras vías de señalización intracelular, como la vía de p38MAPK/NF-**κ**B (Freund *et al.*, 2011). La inhibición de p38MAPK es un potente represor del SASP, lo que sugiere que moléculas inhibidoras del mismo podrían ser eficaces *in vivo*. Recientemente se ha demostrado que los glucocorticoides (corticosterona y cortisol) pueden inhibir la expresión y secreción de varios factores del SASP (Laberge *et al*., 2012). Los glucocorticoides (que ya se utilizan clínicamente para tratar enfermedades inflamatorias) por tanto, pueden ser interesantes para el bloqueo de los efectos del fenotipo secretor.

1.5.3.3 Terapia alternativa basada en la senescencia

Mientras que el SASP se observa en variedad de células senescentes en cultivo (fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, etc.), *in vivo* (en ratones y humanos) no todas las células senescentes expresan el fenotipo secretor (Coppe *et al.*, 2010). Sólo desarrollarán este fenotipo las células cuya senescencia sea una respuesta a la activación de oncogenes, al estrés

replicativo y a agentes que dañan el ADN. En contraste, las células que envejecen debido a la sobreexpresión de la $p16^{INK4a}$ o a inhibidores del ciclo celular como p21, no expresan el SASP. Una novedosa y prometedora estrategia anti-cáncer sería el desarrollo de pequeñas moléculas que regulasen de manera positiva y específicamente los niveles de p16 y p21 en células cancerosas para así, inducir una detención del crecimiento pero sin la presencia del SASP.

1.5.3.4 Terapia de eliminación de la senescencia

Mientras que las terapias vistas hasta ahora podrían ser una estrategia potencial para combatir el cáncer, la acumulación de células senescentes durante el envejecimiento todavía no presenta un abordaje claro. Por lo tanto, podría ser interesante el desarrollo de estrategias para eliminar las células senescentes, ya sea a través del sistema inmune o a través de intervenciones biológicas o químicas.

Se ha demostrado que las células senescentes, a través de su SASP, atraen y activan a las células inmunes para estimular su disponibilidad de espacio (Krizhanovsky *et al*., 2008). Como las células senescentes expresan ligandos para las células inmunes citotóxicas como las NK, pueden ser eliminadas específicamente por el sistema inmune. La acumulación de células senescentes con la edad eleva la posibilidad de que el medio sea permisivo para la retención de las mismas. Debido a que el sistema inmunológico disminuye durante el envejecimiento, su eficacia con las células senescentes también disminuirá (McElhaney y Effros, 2009). Por lo tanto, las terapias que estimulan el sistema inmune en pacientes mayores pueden ayudar a eliminar las células senescentes.

1.6 Glía

1.6.1 Revisión histórica: pasos iniciales

En 1858, hace casi 160 años, Rudolf Virchow promulgó el concepto de glía en una conferencia la Universidad de Berlín. Esta conferencia fue titulada “La médula espinal y el cerebro” y en ella Virchow publicó sus primeros pensamientos sobre el tejido conectivo del cerebro, el *nervenkitt* o

el cemento nervioso, al que llamó glía. Esta conferencia, junto con otras de sus colegas, fueron agrupadas y publicadas en el libro "Patología Celular" que es una de las publicaciones médicas más influyentes en el siglo XIX. A partir de ahí, el término glía y el concepto subyacente se extendieron por todo el mundo. Virchow comentó, a fin de diferenciar la glía de los elementos nerviosos, *"Al considerar el sistema nervioso, sólo he hablado de las partes realmente nerviosas del mismo. Pero si estudiáramos el sistema nervioso en sus relaciones reales en el cuerpo, es sumamente importante tener un conocimiento de esa sustancia que también se encuentra entre las partes nerviosas, las mantiene unidas y les da su forma en mayor o menor grado grado"*.

No obstante, los elementos gliales fueron reconocidos incluso antes de que aparecieran las ideas de Virchow cuando en 1838 Robert Remak describió una vaina alrededor de fibras nerviosas únicas y en 1851 Heinrich Müller descubrió fibras radiales en la retina (que más tarde se conocieron como células mucosas de Müller). La segunda parte del siglo XIX fue una edad de oro para la histología celular, y poco después de los hallazgos iniciales se describieron muchas formas diferentes de células gliales y se publicaron numerosas imágenes de las mismas. En 1893, Michael von Lenhossek propuso el término "astrocito" (célula astroglial), y, un poco más tarde, Kölliker y Andriezen dividieron los astrocitos en fibrosos y protoplasmáticos. Para los patólogos de la época era obvio que las células no neuronales eran bastante diversas en formas y que sufrían cambios en estados patológicos. No fue hasta la década de 1950 cuando la mielina (término también introducido por Virchow) fue reconocida como parte de la célula de Schwann.

1.6.2 Evolución del concepto de glía

"*¿Cuál es la función de las células gliales en los centros neuronales? La respuesta aún no se conoce, y puede permanecer sin resolver durante muchos años hasta que los fisiólogos encuentren métodos directos para atacarlo*". Con estas palabras Santiago Ramón y Cajal comenzó su tratado sobre la glía en *Histología del Sistema Nervioso*. La pregunta todavía no se

ha respondido del todo, aunque a día de hoy se atribuyen una variedad de funciones para las células gliales en la función cerebral.

La primera función de las células gliales fue representado por el concepto de llenado o relleno, originario de Virchow y elaborado por Karl Weigert. Ellos le dieron un papel a la glía enteramente pasivo como elemento que llena el "*espacio no ocupado por las neuronas*". Con respecto a la segunda de las ideas de Virchow (que la glía sostiene elementos nerviosos juntos y les da toda su forma) sabemos que, la arquitectura de la materia gris viene definida por los astrocitos. Cada astrocito protoplasmático ocupa su propio territorio y marca los límites de la materia gris, cubriendo todos los elementos neuronales dentro de su dominio (Nedergaard *et al*., 2003). La pérdida de esta organización específica podría estar involucrada en diversas formas de patología cerebral. El dominio astroglial también está vinculado a los vasos sanguíneos, un fenómeno inicialmente observado por Golgi, quien fue el primero en proponer el papel nutricional de las células gliales. Hoy en día, hemos llegado al concepto de que el astrocito es una parte esencial de una unidad neuronal-glial-vascular, y nuevos estudios muestran que los astrocitos controlan el flujo sanguíneo local y suministran a las neuronas sustratos energéticos (Mulligan y MacVicar, 2004).

De hecho, la célula astroglial surge como un importante elemento celular homeostático en el cerebro porque los astrocitos controlan el ambiente cerebral regulando el volumen y la composición del espacio extracelular y controlando la barrera que separa el sistema nervioso central del resto del cuerpo. Evolutivamente, la separación inicial, que posteriormente se convirtió en la barrera hematoencefálica, estaría compuesta enteramente por elementos gliales. La barrera hematoencefálica más avanzada está formada por células endoteliales, que sin embargo parecen estar controladas por factores secretados por astrocitos (Bundgaard y Abbott, 2008). En lo que se refiere al espacio extracelular, los astrocitos controlan el ambiente iónico (en particular el K^+), los movimientos de agua y la captación de muchos transmisores (sobre todo el glutamato). La célula astroglial también actúa como una fuente principal de captadores de

especies reactivas del oxígeno (por ejemplo, glutatión) (Giaume *et al*., 2007).

La astroglía también está involucrada en la conformación sináptica controlando la génesis y el mantenimiento de las sinapsis (proporcionando así homeostasis morfológica en la conectividad sináptica) teniendo efecto así sobre la fuerza sináptica y la plasticidad. Inicialmente, el concepto de glía que regula las comunicaciones neuronales fue sugerido por Carl Ludwig Schleich en su libro de referencia sobre la anestesia local en 1898. Creía que las células gliales podían moverse entre las células nerviosas y así bloquear la transmisión. En el caso extremo (anestesia general) todos los elementos neuronales serían aislados por las células gliales y la actividad del cerebro cesaría. Ahora sabemos que no es tan simple como Schleich creyó, pero podría haber una parte de verdad en su propuesta. En particular, las células microgliales y también los astrocitos pueden mover o extender rápidamente sus procesos de manera temporal hacia dominios fisiológicamente relevantes (Nimmerjam *et al.*, 2005). Si esta forma de plasticidad puede afectar a la conectividad sináptica de forma efectiva sigue siendo, sin embargo, una incógnita. Sin embargo, los astrocitos son socios legítimos en la transmisión sináptica (la sinapsis tripartita) porque sus procesos perisinápticos contienen una batería de receptores de neurotransmisores, lo que permite una rápida percepción de los eventos de la transmisión sináptica: La astroglia retroalimenta a las neuronas, por lo tanto, modifican la transmisión sináptica. Esta retroalimentación se realiza de muchas maneras, incluyendo la liberación de gliotransmisores (por exocitosis, transportadores o canales de membrana) y la absorción de neurotransmisores en la hendidura sináptica (Tzingounis y Wadiche, 2007).

También sabemos que las células gliales tienen sistemas de señalización intrínsecos. La actividad entre astrocitos se puede propagar en forma de ondas de Ca^{2+} y pueden generar incrementos espontáneos de este ión que se correlacionan con la liberación de glutamato (Volterra y Meldolesi, 2005). La red de astrocitos y oligodendrocitos está interconectada de manera compleja por las uniones gap (Giaume y McCarthy, 1996). Este sincitio es altamente dinámico con respecto al espacio y el tiempo. Puede servir para el intercambio de moléculas para la señalización y la actividad metabólica, así

como la difusión de largo alcance de segundos mensajeros (por ejemplo, IP3) o sustratos metabólicos (por ejemplo, la glucosa y ATP). Esta red es distinta de la señalización binaria de las redes neuronales, ya que ofrece una nueva (y todavía desconocida) posibilidad de procesamiento de información analógica en el cerebro.

1.6.3 Tipos celulares

Las células de la glía no participan directamente en las interacciones sinápticas y en la señalización eléctrica, aunque sus funciones de apoyo ayudan a definir los contactos sinápticos y a mantener la capacidad de señalización de las neuronas. Estas células son más numerosas que las células nerviosas en el cerebro, superando en número a estas últimas en una proporción de 10-50 a 1 en el hombre. Las células gliales generalmente son más pequeñas que las neuronas y carecen de axones y dendritas. Como ya hemos visto, las funciones de la glía incluyen el mantenimiento del medio iónico de las células nerviosas, la modulación de la velocidad de propagación de la señal nerviosa, la modulación de la acción sináptica mediante el control de la captación de neurotransmisores, el suministro de un andamio o soporte en algunos aspectos del desarrollo neuronal y la ayuda (y prevención en algunos casos) en la recuperación de la lesión neural.

Existen tres tipos de células gliales en el sistema nervioso central del adulto: astrocitos, oligodendrocitos y microglía. Los astrocitos, que están restringidos al cerebro y a la médula espinal, tienen una compleja morfología que dan a estas células una apariencia estelar (de ahí el prefijo "astro"). Se trata de células de linaje neuroectodérmico y son las principales y más numerosas células gliales. Derivan de las células encargadas de dirigir la migración de precursores durante el desarrollo (glia radial) y se originan en las primeras etapas del desarrollo. La principal función de los astrocitos es mantener un entorno químico apropiado para la señalización neuronal. Se intercalan alrededor de la neurona para formar una red de sostén, actuando así como una barrera filtradora entre la sangre y la neurona. En diferentes regiones cerebrales tienen propiedades fisiológicas distintas y expresan varios conjuntos de receptores y transportadores; lo más probable es que se adapten a su entorno inmediato. Esta heterogeneidad funcional de la

astroglía puede ser aún más prominente en el cerebro humano porque la evolución de los mamíferos a los primates superiores dio lugar a un notable aumento en la densidad y la complejidad morfológica de los astrocitos. La relación glía:neurona en la corteza frontal ha aumentado de 0.3 en roedores a aproximadamente 1.65 en los seres humanos, mientras que la dimensión de los astrocitos protoplasmáticos y el volumen de sus dominios aumentó aproximadamente de 3 a 30 veces, respectivamente. Como resultado, cada astrocito humano contacta y envuelve alrededor de 2 millones de sinapsis en comparación con las sólo 100.000 sinapsis cubiertas por los astrocitos de roedores (Oberheim *et al*., 2006). Además, en la corteza de primates se han descrito tipos específicos de células astrogliales: los astrocitos interlaminares y polarizados.

Los oligodendrocitos, que también están restringidos al sistema nervioso central, establecen un envoltorio laminado rico en lípidos llamado mielina alrededor de algunos axones, pero no en todos (la mielina tiene efectos importantes sobre la velocidad de conducción del potencial de acción). En el sistema nervioso periférico, las células que elaboran mielina se llaman células de Schwann. Son el equivalente periférico de los oligodendrocitos del Sistema Nervioso Central.

Como su nombre indica, las células microgliales son células más pequeñas derivadas de células madre hematopoyéticas (aunque algunas pueden derivar directamente de células madre neurales). Son células de origen mesodérmico que penetran en el sistema nervioso en el periodo neonatal. Comparten muchas propiedades con los macrófagos tisulares, y son principalmente células limpiadoras que eliminan los desechos celulares de los lugares de lesión. Después del daño cerebral, el número de microglía aumenta drásticamente en el lugar de la lesión. Algunas de estas células proliferan de microglía residente en el cerebro, mientras que otras provienen de los macrófagos que emigran a la zona lesionada a través de la circulación (Purves *et al.*, 2001).

A la división inicial de la glía se añadió recientemente una clase nueva de células gliales, la glía NG2 (así llamada debido a la expresión del marcador específico NG2, del inglés *neural/glial antigen 2*). Estas células (también denominadas sinantocitos, del griego *synanto*, que significa

contacto o polidendrocitos debido a su potencial multitud de funciones) tienen algunas características fisiológicas neuronales y reciben contactos sinápticos (Paukert y Bergles, 2006). Son altamente reactivas y pueden participar en la gliogénesis, mielinización y formas aún desconocidas de regulación sináptica y la plasticidad.

1.6.4 Orígenes y diferenciación de la glía

La macroglía (astrocitos y linaje oligodendrocítico) surge de células progenitoras neuroepiteliales (NPC, del inglés *neuroepithelial progenitor cells*) en el tubo neural embrionario y el prosencéfalo (Rowitch y Kriegstein, 2010). En ratones, alrededor del noveno día embrionario, las NPC se transforman en glía radial, que son las células progenitoras primarias tanto para neuronas como para macroglía durante la embriogénesis. Después de que las células gliales radiales generen neuronas, se produce un "interruptor gliogénico" y comienzan a diferenciarse en astrocitos o células precursoras de oligodendrocitos (OPC, del inglés *oligodendrocyte precursor cells*). Durante este tiempo, numerosas señales como Sonic hedgehog (Shh), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), Wnts, Notch/Delta, proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y citoquinas actúan conjuntamente para controlar el destino celular de manera espacial y temporal, presentando dominios específicos que generarán selectivamente astrocitos u OPC (Zuchero y Barres, 2013). Los principales factores de transcripción involucrados en este momento incluyen Sox9, el factor I nuclear, el factor de respuesta sérica para la gliogénesis general, y Olig1/ Olig2 para la producción de OPC. Aunque se producen múltiples series o tandas de producción de OPC durante el desarrollo de diferentes regiones, queda por determinar si estas diferentes poblaciones también tienen funciones distintas. Se desconoce en gran medida cómo se especifican los astrocitos por separado de los OPC y si hay etapas discretas transcripcionalmente distintas durante la maduración de los astrocitos (similar a las diferencias entre OPC y oligodendrocitos mielinizantes).

En contraste con los astrocitos y los oligodendrocitos, la microglía es de origen mesodérmico y se genera en el saco vitelino durante la embriogénesis, a día embrionario 7.5 en el ratón (Ginhoux y Prinz, 2015).

En primer lugar, las células madre hematopoyéticas en el saco vitelino se convierten en macrófagos primitivos, y luego estos macrófagos migran al Sistema Nervioso Central en desarrollo y se convierten en microglía.

Todas las células gliales dentro del Sistema Nervioso Periférico (SNP), por el contrario, se originan a partir de células de cresta neural, con gliogénesis a partir del día embrionario 11 en ratón. Análogamente a la especificación por etapas de las neuronas del SNC y la glía de los NPC, las células de la cresta neural generan primero neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal antes de generar glía. Las células de cresta neural dan lugar directamente a dos poblaciones de glía: precursores de células de Schwann y glía satélite. La glía satélite permanece en los ganglios del SNP y puede apoyar metabólicamente a las neuronas o incluso contribuir al procesamiento de la información (Huang *et al*., 2013). Por el contrario, los precursores de células de Schwann emigran de los ganglios hacia los nervios periféricos, donde se diferencian en células de Schwann mielinizantes o no mielinizantes (formando haces de Remak alrededor de axones de pequeño calibre). Además, los precursores de células de Schwann también pueden dar lugar a melanocitos, neuronas parasimpáticas, o células madre mesenquimales (Jacob, 2015). Las señales extrínsecas claves que promueven la generación de precursores de células de Schwann incluyen la neuregulina, Notch/Delta y FGFs.

1.6.5 Astroglía en la neurogénesis

En el cerebro adulto de mamífero, la neurogénesis (proceso de generación de nuevas neuronas) se encuentra, bajo condiciones normales, limitada a dos regiones: los ventrículos laterales y la zona subgranular del Giro Dentado (GD) del hipocampo. Las neuronas inmaduras recién formadas generadas continuamente en las paredes de los ventrículos laterales emigran a través de la corriente migratoria rostral hasta su destino final en los bulbos olfativos donde se diferencian en neuronas periglomerulares o neuronas granulosas. Las nuevas neuronas generadas en la zona subgranular del GD migran sólo a corta distancia de la capa celular granular donde se integran en los circuitos neurales existentes. Es importante destacar que la supervivencia de estas células depende de su

actividad e integración funcional. Las investigaciones sugieren que los astrocitos son actores importantes en el nicho neurogénico, comparten algunas propiedades con células madre neurales (Buffo *et al*., 2008) y crean un ambiente propicio para la neurogénesis (Song *et al*., 2005). Los astrocitos regulan la neurogénesis por la secreción de factores tales como Wnt3, IL-1β, IL-6 e IGF-6 (del inglés, *Insulin-like growth factor-binding protein*) (Barkho *et al*., 2006). Estas células gliales también controlan el nicho neurogénico a través de factores asociados a membrana, aunque la identidad de estos factores y los mecanismos involucrados es todavía desconocida.

Las proteínas de filamentos intermedios, GFAP y vimentina, se expresan en astrocitos y parecen afectar críticamente a los procesos mediante los cuales los astrocitos controlan la neurogénesis y otros aspectos de la plasticidad y regeneración neuronal. En ratones deficientes de GFAP y vimentina (GFAP-/- y Vim-/-) se crea un ambiente más permisivo a trasplantes de injertos neurales o células madre neurales (Widestrand *et al.*, 2007) y aumenta la regeneración axonal y sináptica (Cho *et al*., 2005). Aunque la alteración de la distribución celular de Wnt3 en los astrócitos GFAP-/- Vim-/- puede estar asociada con cambios en la secreción de este factor pro-neurogénico, la señalización directa célula a célula desde los astrocitos hasta las células madre neurales o células progenitoras y su implicación en la neurogénesis constituye una respuesta factible. Parece que GFAP y vimentina son importantes para la inhibición de la diferenciación de células madre/progenitoras mediada por astrocitos y esta inhibición ocurre, al menos parcialmente, a través de la señalización de Notch desde astrocitos a células madre neurales/células progenitoras (Parpura *et al*., 2012).

Los astrocitos también son un componente esencial de la unidad neurovascular y regulan directamente las propiedades de la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, también pueden regular indirectamente el nicho neurogénico determinando la accesibilidad de los factores o moléculas derivadas de la sangre que modulan la neurogénesis (Liebner *et al*., 2011).

La integración en las redes neuronales existentes es esencial para la supervivencia de las neuronas recién formadas. Parece que los astrocitos regulan este paso liberando señales que inducen la formación de sinapsis así

como la eliminación de las sinapsis redundantes. Factores derivados de los astrocitos participan en el desarrollo sináptico al inducir la formación y maduración de las sinapsis (Nagler *et al*., 2001). Las trombospondinas 1 y 2 son miembros de una familia de glicoproteínas extracelulares con propiedades sinaptogénicas secretadas por astrocitos. Su deficiencia conduce a una reducción de la densidad sináptica durante el desarrollo (Christopherson *et al*., 2005). La expresión de las trombospondinas 1 y 2 aumenta después de un accidente cerebrovascular y ambas trombospondinas co-localizan principalmente con astrocitos. En comparación con ratones *wild type*, los ratones deficientes de trombospondina 1 y 2 presentaron déficit de densidad sináptica y regeneración axonal asociados con deterioro de la recuperación de la función motora después del accidente, a pesar de que no hubo diferencias en el volumen del infarto y la densidad de los vasos sanguíneos. Eroglu *et al*. (2009) identificaron el receptor α2δ-1 de gabapentina como un receptor neuronal de trombospondina que es responsable de la formación de sinapsis excitatorias en el sistema nervioso central. Los astrocitos también participan en el mantenimiento de los contactos sinápticos después de la lesión. Por lo tanto, ratones deficientes en GFAP y vimentina tienen una pérdida más pronunciada de sinapsis en el hipocampo en la fase aguda (4 días) después de la lesión de la corteza entorrinal. Sorprendentemente, a los 14 días tras la lesión, la recuperación sináptica de estos ratones aumentó, alcanzando los niveles del lado no lesionado (Wilhelmsson *et al*., 2004).

Existen datos que sugieren que los astrocitos también juegan un papel en la eliminación de las sinapsis redundantes durante el desarrollo. Los astrocitos inmaduros en el cerebro en desarrollo parecen ser la fuente de una señal que desencadena la expresión del factor del complemento C1q en neuronas en desarrollo (Stevens *et al*., 2007). C1q se localiza en las sinapsis que se etiquetan para su eliminación mediante la activación de la cascada del complemento y la deposición de C3b, derivada de la activación proteolítica del componente C3. De hecho, tanto ratones deficientes para C1q (C1q-/-) y ratones deficientes para C3 mostraron defectos significativos y sostenidos en la eliminación de sinapsis en el tálamo. Además, los ratones

C1q-/- mostraron mayor conectividad sináptica excitadora neocortical y actividad epileptiforme.

En resumen, los astrocitos controlan directa e indirectamente el nicho neurogénico y la integración y supervivencia de las neuronas recién formadas. Por lo tanto, los astrocitos constituyen un objetivo atractivo para la modulación terapéutica de la generación y supervivencia de las neuronas recién formadas en condiciones patológicas tales como accidente cerebrovascular y/o enfermedad neurodegenerativa.

1.6.6 Glía en enfermedades neurológicas

Como acabamos de mencionar, la función homeopática y de defensa de la glía cerebral está íntimamente implicada en la mayoría de las enfermedades neurológicas. Cada tipo de insulto cerebral desencadena reacciones en la glía que son esenciales para la progresión y el resultado del proceso patológico (Rossi y Volterra, 2009). Los astrocitos están implicados críticamente en el desarrollo de traumatismo cerebral y accidente cerebrovascular (Nedergaard y Dirnagl, 2005). La progresión de una isquemia focal es compleja e incluye un rápido desarrollo del núcleo isquémico, representado por la región de necrosis celular y una formación mucho más lenta de la penumbra isquémica que rodea la zona de infarto. La expansión de la zona de infarto a través de la penumbra dura días y el grado y velocidad de esta expansión está muy determinado por los astrocitos. La astroglía es, en general, resistente a la isquemia y la excitotoxicidad. Los astrocitos pueden sobrevivir en la penumbra donde continúan realizando sus funciones homeostáticas actuando como un neuroprotectores. La astroglÍa acumula glutamato extracelular contrarrestando así la excitotoxicidad (Danbolt, 2001), los astrocitos capturan especies reactivas de oxígeno y producen lactato (Magistretti, 2006), que puede sostener el metabolismo neuronal en este tipo de situaciones. En condiciones de graves insultos, sin embargo, los astrocitos pueden llegar a ser neurotóxicos y contribuir a la muerte celular. En particular, los astrocitos pueden convertirse en una fuente de glutamato que se puede liberar a través de varias vías (por ejemplo, de canales sensibles al volumen y receptores P2X7), a través de la exocitosis inducida por Ca^{2+} o a través de transportadores inversos de glutamato

(Malarkey y Parpura, 2008). Los astrocitos pueden incluso facilitar la propagación de señales de muerte, por ejemplo, propagando ondas de liberación de glutamato. De hecho, la extensión de la zona necrótica a través de la penumbra puede demarcar la extensión primaria del fallo o pérdida astroglial, que a su vez determina la progresión en el tiempo y la gravedad del déficit neurológico.

De manera similar, la oligodendroglía es clave en caso de daño isquémico de la sustancia blanca. La muerte de los oligodendrocitos conduce inevitablemente a la desintegración axonal y por lo tanto el insulto isquémico provoca interrupciones de las fibras nerviosas y causa graves discapacidades funcionales. Los oligodendrocitos y, en particular, los precursores oligodendrogliales son muy sensibles a la isquemia y a la excitotoxicidad del glutamato. Incluso períodos cortos de anoxia/isquemia resultan en una completa pérdida de la homeostasis del Ca^{2+} oligodendroglial, lo que causa un sobrecarga de toxicidad (Matute, 2010). Estas cargas tóxicas de Ca^{2+} están mediadas por la activación de los receptores ionotrópicos de glutamato AMPA/NMDA y posiblemente por la apertura del poro del receptor P2X7. La muerte de la célula oligodendroglial es responsable del daño sistémico de la sustancia blanca en la leucomalacia periventricular o en la enfermedad de Binswanger (Akiguchi *et al.*, 1997).

La glía también surge como un actor clave en las enfermedades neurológicas crónicas. Durante muchos años, se consideró que las enfermedades neurodegenerativas eran una patología específica de las neuronas. Sin embargo, los últimos años han desafiado estas opiniones y se ha demostrado el potencial patológico de la glía. Los cambios astrogliales en la progresión de las enfermedades neurodegenerativas son complejos. Se creía, de manera general, que la neurodegeneración desencadenaba la astrogliosis reactiva y los astrocitos reactivos a su vez contribuían a la neuroinflamación. Aunque la astrogliosis reactiva se utiliza ampliamente como una característica patológica de tejido del SNC, las definiciones de astrogliosis reactiva pueden variar considerablemente entre los autores y no hay categorías ampliamente aceptadas de intensidad o gravedad. Sobre la base de una gran cantidad de observaciones en animales de experimentación, recientemente se ha propuesto una definición de

astrogliosis reactiva que abarca cuatro características principales: (1) la astrogliosis reactiva es un espectro de posibles cambios moleculares, celulares y funcionales en los astrocitos que ocurren en respuesta a todas las formas y niveles de gravedad de la lesión o trauma del SNC y enfermedades, (2) los cambios experimentados por los astrocitos reactivos varían en función a la gravedad de la lesión a lo largo de un gradiente continuo de alteraciones progresivas en la expresión molecular, hipertrofia celular progresiva, y en casos severos, proliferación y formación de la cicatriz glial, (3) los cambios de la astrogliosis reactiva se regulan de manera específica en el contexto de moléculas de señalización inter e intracelulares, (4) los cambios sufridos durante la astrogliosis reactiva tienen el potencial de alterar las actividades de los astrocitos a través de la ganancia y la pérdida de funciones que pueden afectar tanto beneficiosa como perjudicialmente en los alrededores de las células neuronales y no neuronales (Sofroniew, 2009). Según estos datos, la astrogliosis reactiva no es una respuesta de todo o nada, no es un proceso único e uniforme, ni es sinónimo de la formación de cicatrices. En lugar de ello, la astrogliosis reactiva es un proceso continuo de cambios progresivos en la expresión génica y cambios celulares finamente regulado.

Estudios recientes con modelos animales de enfermedades neurodegenerativas han revelado otra reacción generalizada de la astroglía: su atrofia (Olabarria *et al*., 2010). Además, parece que los cambios atróficos en la astroglía se producen en las primeras etapas del proceso neurodegenerativo, y resulta en la pérdida del soporte astroglial que puede afectar a la transmisión sináptica así como estar vinculado a déficits cognitivos tempranos. A continuación, veremos los datos recientes sobre las reacciones astrogliales en diversas formas de enfermedades neurodegenerativas.

Demencia asociada al VIH-1. El VIH-1 infecta de manera exclusiva las células microgliales, que liberarán factores neurotóxicos causando la muerte neuronal (Kaul *et al*., 2001). Los astrocitos sufren cambios patológicos como la astrogliosis (significativa en la corteza entorrinal y en el hipocampo) y la astrodegeneración. La progresión de este tipo de demencia se asocia con una significativa pérdida de células astrogliales a

través de la apoptosis en los ganglios basales. Esta muerte astroglial es particularmente pronunciada en sujetos con déficits cognitivos. Los astrocitos contribuyen a la toxicidad neuronal a través de la liberación masiva de glutamato después de la activación de los receptores de quimioquinas CXCR4 por el TNF-α liberado por la microglía activada.

Demencia no asociada a VIH. Tanto en este tipo de demencia así como en la enfermedad de Pick y en la degeneración frontotemporal, se ha observado muerte apoptótica temprana y distrofia en astrocitos. También se encontró una correlación entre el grado de atrofia glial y la gravedad de la demencia. De forma similar, se observó astrogliosis pronunciada en casos de demencia talámica, donde los cambios patológicos en astrocitos fue el principal evento observado (Broe *et al.*, 2004).

Encefalopatía de Wernicke. Investigaciones que han utilizado modelos animales deficientes de tiamina han demostrado cambios distróficos en la astroglía en este tipo de encefalopatía. Estos cambios incluyeron la disminución de la expresión de GFAP, glutamina sintetasa astrocítica y el transportador GAT-3 GABA astrocítico. La pérdida neuronal profunda observada en la encefalopatía de Wernicke se asocia principalmente con el fracaso astroglial para contener los niveles de glutamato extracelular. La clave del mecanismo patogénico se encuentra en la regulación de los transportadores de gutamato EAAT1 y EAAT2 presentes en estos astrocitos distróficos (Hazzel *et al*., 2009).

Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Gracias a los estudios con modelos animales podemos establecer que existen procesos tempranos de atrofia en la astroglía antes de que se produzca la muerte neuronal y la aparición de síntomas clínicos. La progresión de la ELA desencadena la astrogliosis reactiva, así como la atrofia astrocítica, incluso en las etapas avanzadas de la enfermedad (Rossi *et al*., 2008).

Enfermedad de Parkinson. La contribución de la astroglía a la patogénesis de la enfermedad de Parkinson sigue siendo desconocida en gran medida. Conocemos el hecho de que la densidad de astrocitos en la sustancia negra en estos casos es significativamente baja. Además, está demostrado que los astrocitos protegen las neuronas dopaminérgicas en co-cultivos neuronal-gliales (Mena y García de Yebenes, 2008). Así, los

astrocitos previenen la neurotoxicidad directa de la L-DOPA y la convierten en un agente trófico. Además, sabemos que las células astrogliales pueden contribuir a la diferenciación de las células madre en neuronas dopaminérgicas y promover su incorporación en el circuito neuronal.

Enfermedad de Alzheimer (EA). La EA se asocia con una gliosis reactiva y, de hecho, los estudios de los tejidos post mortem demostraron astrogliosis reactiva prominente, la inclusión de astrocitos en placas seniles y la activación de la microglía (Heneka *et al*. 2010). La astrogliosis reactiva en la EA puede desencadenarse por la acumulación extracelular de β-amiloide (Aβ). La exposición de astrocitos cultivados a Aβ desencadena oscilaciones en el Ca^{2+} astroglial, vinculadas a la neurotoxidad en cocultivos neuronales-astrogliales (Abramov *et al.*, 2003). También se observaron oscilaciones anormales de Ca^{2+} astroglial *in vivo* en ratones que expresan la proteína precursora Aβ mutada. En este modelo, caracterizado por la aparición temprana de las deposiciones amiloides, los astrocitos asociados con las placas mostraron ondas de propagación a larga distancia de Ca^{2+} de manera espontánea (Kuchibhotla *et al*., 2009).

Al mismo tiempo, los estudios morfológicos longitudinales realizados en ratones triple transgénicos para la EA demostraron que los astrocitos sufren complejos cambios morfológicos dependientes de la edad (Oddo *et al*., 2003). En las primeras fases de la EA, los astrocitos del hipocampo y la corteza entorrinal presentan signos de atrofia. Estos cambios atróficos se manifiestan por la reducción de la expresión de GFAP (superficie y volumen de cobertura), la disminución del volumen de cuerpo celular y la disminución del número y el grado de ramificación de los cuerpos celulares. En las fases o estadíos avanzados, cuando el parénquima cerebral está infestado con placas seniles, se evidencian claros signos de astrogliosis reactiva. Numerosos astrócitos hipertróficos se asocian específicamente con placas seniles y vasos sanguíneos que presentan β-amiloide (Olabarria *et al.*, 2010).

La atrofia temprana de las células astrogliales puede tener importantes consecuencias patológicas. La disminución de los dominios astrogliales puede reducir la cobertura sináptica, alterar el soporte metabólico neuronal y el rendimiento funcional de las unidades neurovasculares así como aumentar

la vulnerabilidad neuronal al ataque neurotóxico. Esta atrofia astroglial temprana puede conducir a un mal funcionamiento sináptico, a una disminución de la fuerza sináptica y a una plasticidad sináptica alterada con obvias consecuencias cognitivas (Rodriguez y Verkhratsky, 2011).

Las células neurogliales son fundamentales en la progresión del proceso neurodegenerativo. En las primeras etapas de varios tipos de enfermedades neurodegenerativas las células astrogliales sufren cambios atróficos. Estos cambios afectan a la conectividad sináptica, siendo responsables de los déficits cognitivos tempranos y de reducir el potencial neuroprotector, aumentando así la vulnerabilidad de las neuronas a diferentes tipos de eventos neurotóxicos. En las fases posteriores, el proceso neurodegenerativo desencadena la astrogliosis y la activación de la microglía, que contribuyen al componente neuroinflamatorio de este tipo de enfermedades.

Más de un siglo y medio de investigación glial ha presentado altos y bajos. Una primera explosión de investigación sobre las células gliales, realizada principalmente por anatomistas y patólogos, disminuyó a niveles muy bajos después de que los fisiólogos descubrieran que la actividad cerebral estaba codificada como potenciales de acción en las neuronas. Los científicos se centraron en las comunicaciones neuronales (identificando así las sinapsis y los neurotransmisores), en cómo las redes de neuronas procesaban la información y cómo los circuitos neuronales definían las áreas cerebrales. Las razones para este avance fueron las nuevas tecnologías desarrolladas para registrar esta actividad neuronal, primero indirectamente en el espacio extracelular y más tarde de manera directa por electrodos intracelulares.

Cuando los fisiólogos se encontraron con una célula glial y la registraron con las técnicas contemporáneas, las células permanecieron en silencio y obviamente no se integraron en la red de neuronas. No es sorprendente que el investigador retirara su electrodo y siguiera buscando las células nerviosas. La célula glial mantuvo su estigma como el elemento pasivo que sirve para llenar las lagunas.

Las últimas décadas han visto un ascenso en la investigación glial debido al descubrimiento de que las células gliales pueden ser excitadas, pero de una manera fundamentalmente distinta de las neuronas. La forma

glial de la excitabilidad está codificada por cambios en el Ca^{2+} intracelular que pueden ocurrir espontáneamente, o ser activados por la actividad neuronal, así como propagarse en forma de ondas. La comprensión actual de la red glial es todavía incipiente porque la mayor parte de los experimentos se realizaron en cultivo celular o en cortes o secciones de tejido cerebral.

Existe una diferencia fundamental entre la señalización mediada por potenciales de acción en neuronas y la señalización basada en la difusión en astrocitos. La respuesta neuronal en forma de potenciales de acción es binaria y en una escala de tiempo de milisegundos, mientras que la respuesta del Ca^{2+} de las células gliales puede ser gradual y en una escala de tiempo más lenta, desarrollándose en segundos o incluso minutos. Un aumento en el número y la complejidad de los astrocitos se correlaciona con el aumento de la capacidad cognitiva del cerebro. Esta correlación parece representar una herramienta evolutiva para integrar el intercambio rápido de información proporcionado por las redes neuronales con un procesamiento de información relativamente lento pero más duradero proporcionado por las células gliales.

1.7 Células madre neurales y neurogénesis en el adulto

1.7.1 Revisión histórica

"*En los cerebros adultos, las vías nerviosas son algo fijo, terminado e inmutable. Todo puede morir, nada puede regenerarse…*" escribió Santiago Ramón y Cajal en 1913. En 1906 obtuvo el premio Nobel de medicina por su extraordinaria y documentada *teoría neuronal* de la organización anatómica del Sistema Nervioso. Cajal inició la era moderna de la neurociencia, definió claramente el concepto de neurotrofismo e incluso sospechó de la existencia de células germinales neurales más allá del periodo fetal (Ramón y Cajal, 1928). Sus descripciones e interpretaciones precisas del desarrollo embrionario del Sistema Nervioso tienen hoy total vigencia. Sin embargo, la idea del fijismo y la inmutabilidad de las vías nerviosas, que durante mucho tiempo ha sido dogma central de la neurociencia, hoy se sabe que no es cierto.

Se ha tardado más de 50 años en abrir el camino que nos permitirá abordar la neurorreparación eficaz del SN dañado por patologías

neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, o una lesión de médula espinal.

El descubrimiento de células madre neurales y la neurogénesis adulta se produjo en la década de 1960. Las observaciones de la división celular y la diferenciación en el cerebro adulto surgieron de los estudios sobre el desarrollo del cerebro y se avanzó en gran medida por la aplicación de la timidina tritiada, que se incorpora en el ADN de las células en división y puede ser detectada por autoradiografía. Usando esta técnica de marcaje, Leblond y sus colegas concluyeron que las células gliales se dividen en todo el parénquima (Smart y Leblond, 1961). A raíz de estos estudios pioneros, Altman y colaboradores, utilizando las mismas técnicas, observaron células en división en la zona subventricular (SVZ) y especularon que la neurogénesis en rata adulta se producía en el Giro Dentado (DG) (Altman, 1962). Fue en 1965 cuando Altman y Das proporcionaron la primera evidencia sólida para esclarecer la neurogénesis en el adulto: Demostraron la migración de células nuevas y su maduración a neuronas desde la SVZ hasta el bulbo olfatorio (Altman y Das, 1965). En 1969, Altman describió por primera vez la corriente migratoria rostral entre el bulbo olfatorio y la SVZ (Altman, 1969).

En 1992 se cultivaron por primera vez progenitores/precursores neurales como neuroesferas (Reynolds y Weiss, 1992). En 2001 se adjudicó una patente a *NeuralStem*® (Gaithesburg, Maryland, EEUU) para un método para aislar, programar y diferenciar eficientemente en cultivo, células madre neurales (NSC, *Neural Stem Cells*) de mamíferos, incluidos humanos, para generar grandes cantidades de neuronas. Afirmaban ser capaces de producir distintos tipos neuronales con el objeto de ser usados en terapia celular, terapia génica, cribado de factores de crecimiento y cribado de fármacos para enfermedades del Sistema Nervioso. En el año 2008 se comprobó que era más fácil producir células pluripotentes inducidas si en vez de partir de células somáticas, se partía de NSC (Kim et al., 2008).

1.7.2 NSC en el cerebro del adulto de mamíferos

A día de hoy, en la bibliografía encontramos cierta ambigüedad en el uso de algunos términos. Se establecen las siguientes definiciones siguiendo la directrices de Seaberg y van der Kooy (2003):

Células madre neurales (NSC): células con capacidad de autorrenovación indefinida (aunque en sentido absoluto no pueda ser probado) y multipotentes, con el potencial de diferenciarse a fenotipos celulares maduros, neuronas y dos tipos de células gliales (astrocitos y oligodendrocitos).

Pourabdolhossein y colaboradores definen actualmente a las NSC como células madre unipotentes que se encuentran en la zona subventricular (SVZ) del ventrículo lateral. Esta parte del SNC se usa de forma rutinaria para el aislamiento de NSC. La potencialidad y las propiedades migratorias de las NSC ayudan a repoblar las células neuronales después de un proceso inflamatorio.

Precursores neurales: Este término se utiliza de manera equivalente con el de progenitores; son células neurales con capacidad más limitada de autorrenovación y expansión que las NCS, y con potencialidad para diferenciarse a pocos tipos neurales, a veces unipotentes. Serían progenitores neuronales y progenitores gliales las células comprometidas a diferenciarse sólo a neuronas o a glía, respectivamente. Los progenitores neuronales determinados a un tipo de neurona en concreto, serían la herramienta de sustitución ideal para tratar el SNC lesionado.

Neuroesferas: grupo o colonia de células formado en cultivo en suspensión, altamente proliferativas en presencia de factores mitogénicos (principalemente EGF y FGF), que contienen proporciones variables de NSC y precursores bi o unipotentes.

Neurogénesis: proceso de diferenciación celular que, a partir de células neuroepiteliales, genera neuronas de manera muy activa durante el desarrollo embrionario, y de forma restringida durante la vida adulta. En cultivo, la neurogénesis y la gliogénesis se pueden estudiar a partir de neuroesferas o de secciones de tejido nervioso fetal cultivables a largo y corto plazo, respectivamente.

El estado que permite a las NSC en los tejidos adultos mantener el potencial de autorrenovarse constantemente, aunque no sean células proliferativas *in vivo*, es, en cierto modo, un estado de "resistencia" a progresar a células diferenciadas. Además de por sus características intrínsecas, serían las características del nicho en el que residen, las que hacen a las células madre mantener accesibilidad transcripcional a una batería de genes; ello permite a las NSC retener su potencialidad de generar progenie con características diferenciadas. En el proceso de diferenciación progresiva hay una reprogramación de múltiples genes que se reprimen, mientras que otros muchos se activan.

Dentro del cerebro de un mamífero adulto, las NSC se localizan en la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales, en la zona subgranular del hipocampo (SGZ) (figura 9) y en el canal central (CC) de la médula espinal donde se dividen y dan lugar a nuevas neuronas en un proceso denominado neurogénesis adulta. Se han identificado otras regiones germinales en el tercer ventrículo, el hipotálamo, la capa subpial del cerebelo y las meninges. Se ha demostrado que las NSC se encuentran ubicadas en microambientes muy específicos, llamados nichos neurogénicos, y su composición celular consiste en una variedad de células que incluyen NSC así como su progenie inmadura acompañada de células endoteliales, astrogliales y ependimales. Reciben señales estructurales y tróficas de contacto célula a célula y celula a matriz extracelular. Esta comunicación proporciona información espacial y temporal crítica, que a su vez permite que las células madre actúen en respuesta a estímulos tanto fisiológicos como patológicos.

SVZ DE VENTRÍCULOS LATERALES: La SVZ es el nicho neurogénico más grande en el SNC adulto capaz de mantener la neurogénesis durante toda la vida. La SVZ adulta muestra un alto grado de organización con células madre y otros tipos de células como células ependimales no adherentes (E1) con una superficie apical grande y múltiples cilios largos, células B de tipo astrocítico (B1) (división lenta) que dan lugar a células tipo C (rápida división), que a su vez se diferencian en neuroblastos (tipo A) y migran al bulbo olfatorio proporcionando nuevas interneuronas. La vista frontal del ventrículo lateral reveló que el cilio apical

de una o más células B1 estaba rodeado por células E1 en una arquitectura de molinete que es específica del área neurogénica. Las células B1 entran en contacto con el ventrículo (a través de su cilio apical) y con los vasos sanguíneos. Están en reposo y proliferan lentamente en condiciones normales, pero pueden activarse en diferentes patologías.

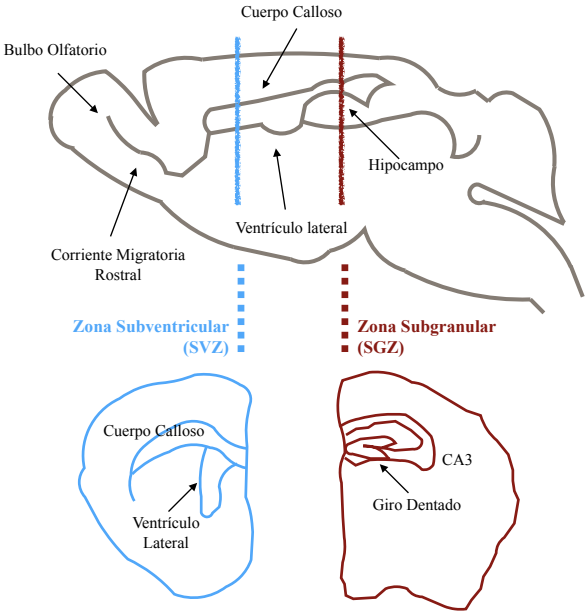

Figura 9. Esquema del corte sagital del cerebro adulto de roedor, donde se detallan los dos nichos principales donde residen las NSC: la zona subventricular (SVZ) y la zona subgranular (SGZ). La SVZ se encuentra a lo largo del ventrículo lateral en el cerebro anterior y la SGZ se encuentra en el hipocampo a lo largo de la capa de células granulares dentadas (Adaptado de Takagi, 2016, con licencia de creative commons).

La investigación de las últimas décadas en modelos animales y muestras de tejido de pacientes con Esclerosis Múltiple ha demostrado que el nicho de la SVZ en adultos se reactiva en respuesta a diversos tipos de lesiones proximales produciendo nuevos progenitores que migran hacia el sitio de la lesión y diferenciandose en oligodendrocitos. Además, se ha demostrado que todas las células tipo B, C y A son fuentes de

oligodendrocitos generados en condiciones tanto fisiológicas como patológicas.

SGZ DEL HIPOCAMPO: La segunda región principal que sostiene la neurogénesis en el cerebro adulto a lo largo de la vida es la SGZ del hipocampo, que se encuentra en el límite de la capa de células granulares (GCL) y el giro dentado. La neurogénesis en el hipocampo adulto ocurre a lo largo de la vida y engloba procesos involucrados en el aprendizaje y la memoria. Las células similares a la glía radial (RGL) en el DG representan una población inactiva que puede ser provocada para generar los precursores proliferativos llamados progenitores intermedios como las células IPC1 e IPC2. Estas células producen nuevas neuronas granulares inmaduras, que migran hacia el interior del GCL y se diferencian en células granulares del DG. Extienden sus dendritas y axones hacia la región CA3 y se integran funcionalmente.

Aunque se desconocen los mecanismos moleculares que controlan la proliferación y diferenciación de las NSC del hipocampo en condiciones patológicas, los resultados recientes revelan que una desmielinización inflamatoria aguda podría provocar el nicho de células madre del hipocampo y potenciar la proliferación de NPC en la SGZ. Por lo tanto, los factores inflamatorios como las citocinas y las quimiocinas pueden afectar a la capacidad proliferativa de las NSC y alterar la neurogénesis en la SGZ.

CANAL CENTRAL DE LA MÉDULA ESPINAL: La médula espinal es la parte caudal del SNC que consta de 33 segmentos nerviosos, desde la sección cervical hasta la sección coccígea. El canal central en el centro de la médula espinal contiene el líquido cefalorraquídeo (LCR). La capa ependimal de la médula espinal tiene un papel importante en el desarrollo embrionario y es conocida por su función como nicho neuroprogenitor. A finales de la década de 1990, se descubrieron células madre multipotentes en la médula espinal de mamíferos adultos. Las NSC aisladas del canal central de rata y de ratón pueden producir neuroesferas capaces de autorrenovarse, proliferar y diferenciarse en los tres tipos principales de células del SNC. Además, se ha demostrado que, en caso de lesión, las NSC que residen en el canal central, son capaces de autorrenovarse y generar oligodendrocitos maduros. Las células madre adultas del canal central están

inactivas en condiciones fisiológicas; sin embargo, se ha observado cierta proliferación en el extremo dorsal y ventral del CC. Las células ependimales dorsales muestran morfología glial radial y expresan GFAP, nestina, CD15 y/o proteína de unión a lípidos cerebrales (BLBP). Actualmente se ha demostrado que estas células ependimales son capaces de generar una progenie de destinos múltiples en condiciones fisiológicas y patológicas.

OTRAS ÁREAS GERMINALES DEL SNC: Más allá de los nichos clásicos de NSC mencionados anteriormente, se han identificado otros nichos germinales. Estas regiones incluyen el hipotálamo, el tercer ventrículo, las meninges y la capa subpial del cerebelo. Estos nichos neurogénicos se componen de una población heterogénea de NSC que puede autorrenovarse y dar lugar a la mayoría de los precursores neuronales y gliales. Varios estudios mostraron que el tercer ventrículo y la zona neurogénica del hipotálamo contienen células multipotentes que pueden dar lugar a neuronas, oligodendrocitos y astrocitos *in vitro* e *in vivo*. Las células de la capa ependimal del tercer ventrículo son capaces de migrar a las regiones del parénquima hipotalámico y diferenciarse en neuronas funcionales en respuesta a la lesión.

Las células madre se caracterizan por dos propiedades fundamentales: la capacidad de autorrenovación y la capacidad para dar lugar a una progenie diferenciada (Figura 10). Durante mucho tiempo se ha postulado que la neurogénesis adulta se origina por NSC tripotentes con la capacidad de generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. En un primer momento, la existencia de autorrenovación de NSC adultas multipotentes se explicó por la expansión a largo plazo y diferenciación de neuroesferas (no adherentes y precursores derivados de clones), o por cultivos en monocapa que se diferenciaron en tres linajes neurales (Reynolds y Weiss, 1992). Sin embargo, el reciente mapeo genético y el rastreo del linaje clonal de las NSC en el hipocampo adulto *in vivo* han determinado la generación de neuronas y astrocitos pero no oligodendrocitos (Bonaguidi *et al.*, 2011). En la SVZ del adulto, los resultados de estudios de mapeo de población han sugerido la generación tanto de neuronas como de oligodendrocitos, pero recientes análisis *in vivo* han determinado solamente el linaje neuronal a partir de NSC individuales. Por otro lado, análisis *in vitro* de *time lapse* han

revelado la generación o bien de neuronas o bien de oligodendrocitos a partir de células precursoras, pero nunca ambos (Ortega *et al.*, 2013).

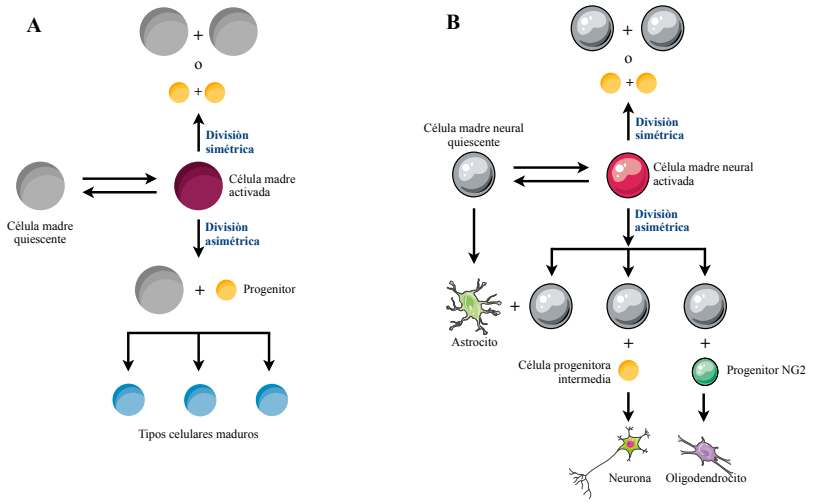

Figura 10. Comportamiento de las células madre neurales (NSC) dentro de los nichos de adultos. A: Diagrama esquemático que ilustra el comportamiento potencial de una célula madre adulta y B: más específicamente, de una NSC adulta durante su ciclo de vida. Las NSC adultas pueden realizar una transición entre el estado quiescente y el estado activo. Una vez activadas, eligen entre diferentes modos de división. Una división asimétrica conduce a auto-renovación y produciría una NSC y un progenitor, mientras que en una división simétrica se producirían o bien dos NSC (auto-renovación) o bien dos progenitores (no auto-renovación). Los progenitores pueden ser de destino restringido, lo que significa que sólo se diferenciarían en un tipo particular de célula, o pueden ser multipotentes y deben hacer una elección de destino antes de la diferenciación (Adaptado de Bond *et al.* 2015).

Los estudios que utilizan fármacos anti-mitóticos para eliminar los precursores en división mostraron que las NSC eran mayoritariamente quiescentes *in vivo* (Doetsch *et al.*, 1999). El estado quiescente ha sido considerado durante mucho tiempo como inactivo o pasivo y la quiescencia como estado para permitir que las células madre adultas soporten el estrés metabólico y preserven la integridad del genoma. Nuevos resultados

sugieren todo lo contrario. El análisis del transcriptoma de NSC quiescentes del SGZ muestra una expresión activa de varios receptores para señales de nicho y componentes de la señalización aguas abajo (la mayoría de los cuales se encuentran regulados negativamente una vez que las NSC se vuelven activas) (Shin *et al*., 2015). En la mayoría de los sistemas de células madre somáticas del adulto coexisten las poblaciones de células quiescentes y células activas. El ejemplo más obvio de la heterogeneidad entre las NSC adultas es la diferencia en su progenie entre los nichos: las NSC de la SVZ generan interneuronas del bulbo olfatorio y oligodendrocitos del cuerpo calloso, mientras que las NSC del SGZ generan neuronas dentadas granulares y astrocitos. Las NSC que derivan de ambos nichos generan los 3 linajes neurales una vez cultivadas con altas concentraciones de factores de crecimiento. Esto sugiere que *in vivo* el nicho limita el potencial de las NSC.

1.7.3 Funciones de la neurogénesis en el adulto

Una vez aceptadas las pruebas de la existencia de neurogénesis en el adulto, surgieron las preguntas acerca de su relevancia funcional. Una serie de estudios de correlación revelaron de manera clara que el incremento o la regulación positiva de la neurogénesis en el DG incrementaba el rendimiento de tareas relacionadas con el hipocampo, y a la inversa. Los experimentos diseñados para disminuir la neurogénesis por radiación, por manipulación de virus, agentes antibióticos o la ingeniería de animales transgénicos han permitido un mayor conocimiento de la regulación genética y farmacológica de la neurogénesis. Todos estos datos confirman el papel funcional de la neurogénesis del adulto en el DG (Deng *et al*., 2010).

Para una mayor comprensión de este papel funcional, es clave considerar la neurogénesis en el contexto del hipocampo y su función teórica como un todo. Cada una de las células granulares del DG reciben *inputs* de miles de neuronas del cortex, lo que sugiere que son capaces de representar de manera simultánea una compleja combinación de características espaciales y de objetos. Varios estudios han sugerido que la función de codificación del DG puede ser vista desde un punto de vista computacional, considerando al DG como punto crítico para la “separación

de patrones" (Morris *et al*., 2013). Esta separación de patrones se describe como la transformación de la información de entrada cortical en una representación ortogonal. Mediante la manipulación de la tasa de la neurogénesis, existen investigaciones que han usado técnicas de sobreexpresión de la neurogénesis adulta para reflejar las características computacionales de la separación de patrones. Con ello, han conseguido mostrar que las neuronas recién formadas son cruciales para establecer finas discriminaciones entre ubicaciones espaciales adyacentes o ambientes muy similares (Clelland *et al.*, 2009). Todo ello apoya el concepto de una red dominada o dirigida por el DG en individuos jóvenes que interpretaría *inputs* similares pero no idénticos, mientras que en adultos de más edad estas entradas similares quedarían registradas como equivalentes.

A pesar de que a día de hoy se acepta de manera generalizada la neurogénesis en el DG, se necesitan más estudios para determinar los mecanismos implicados en la contribución funcional de comportamientos mediados por el hipocampo. Se necesita también una mayor comprensión de cómo los circuitos del hipocampo median los comportamientos.

1.7.4. Estrategias para la generación y aislamiento de NSC

Hasta ahora, los tratamientos farmacológicos tradicionales están siendo utilizados para retrasar la progresión de la enfermedad pero no pueden restaurar la función perdida ni regenerar los tejidos. Investigaciones parecen indicar que el trasplante de NSC es una modalidad de tratamiento esperanzadora para enfermedades asociadas al sistema nervioso, regeneración de células neuronales y restauración del microambiente en el lugar de la lesión (figura 11). La fuente de células es el primer problema que hay que abordar porque la dosis de células requeridas para un trasplante adecuado es muy alta. Por los últimos avances técnicos, las NSC pueden derivarse de tres fuentes diferentes: la extracción directa de tejidos primarios, la diferenciación de células madre pluripotentes y la transdiferenciación de células somáticas.

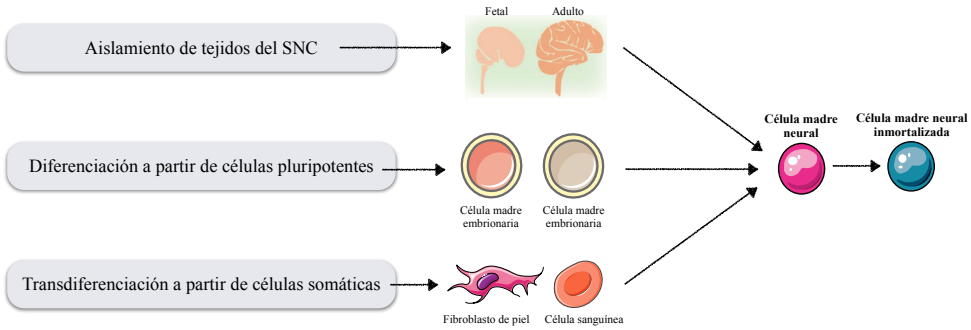

Figura 11. Fuentes de NSC. Las NSC se pueden obtener a través de tres métodos: extracción directa de los tejidos primarios del SNC, incluido el cerebro fetal, el cerebro adulto y el tejido de la médula espinal; diferenciación de células madre pluripotentes, tales como células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas; y transdiferenciación de células somáticas, como fibroblastos de la piel, células de la orina y células sanguíneas (Adaptado de Tang et al. 2017, con licencia creative commons).

Aislamiento y cultivo de NSC de tejidos primarios: Como ya vimos anteriormente, en 1992 Reynolds y Weiss aislaron NSC del estriado del cerebro adulto de ratón y demostraron la eficacia del uso del factor de crecimiento epidérmico (EGF) para inducir proliferación de las mismas *in vitro*. Basándose en estos resultados previos, Weiss demostró que no sólo el EGF sino que también el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) inducen de forma cooperativa la proliferación, autorenovación y expansión de las NSC aisladas de la médula espinal torácica en el ratón adulto (Weiss *et al*. 1996). Las NSC pueden crecer en suspensiones unicelulares obtenidas por digestión enzimática, formando grupos esféricos llamados neuroesferas, que son no adherentes y pueden volver a sembrarse en un medio de cultivo selectivo para obtener células de linaje neural (figura 12) (Ferrari *et al.* 2010 y Azari *et al*. 2010). Las neuroesferas se pueden subcultivar para expandir el conjunto de NSC con fines experimentales o terapéuticos.

Las NSC también pueden aislarse directamente por clasificación celular basándose en la expresión de marcadores de superficie de NSC. Aunque se han desarrollado protocolos optimizados para el aislamiento, cultivo y

expansión de NSC en mamíferos (Belenguer *et al*. 2016), todavía no se ha restablecido un protocolo estándar o canónico para obtener NSC derivadas de tejido humano (se sospecha que la metodología técnica tiene que se mayormente similar a la aplicada en animales).

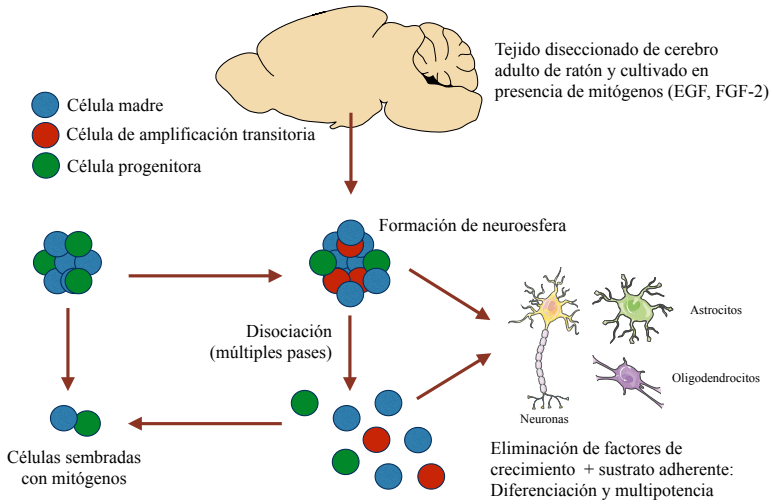

Figura 12. Ensayo de Neuroesferas. Representación esquemática del cultivo de neuroesferas *in vitro*. Las NSC son aisladas del SVZ de ratón, que es diseccionado para a continuación obtener una suspension de células individuales a través de disociación mecánica y enzimática. Finalmente, estas células se siembran en de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) (Adaptado de Gil-Perotín et al., 2013, con permiso de John Wiley & Sons, Inc).

Diferenciación de células madre pluripotentes en NSC: Las células madre pluripotentes, que incluyen células madre embrionarias (ESC del inglés, *Embrionic Stem Cells*) y células madre pluripontentes inducidas (iPSCs), pueden generar NSC a través de la diferenciación. Representan una alternativa interesante al aislamiento de células primarias. De manera general, los protocolos para la diferenciación neural de las células madre pluripotentes se pueden clasificar en dos tipos: la formación de cuerpos embrioides (EB, del inglés *Embryoid Bodies*) y cultivos en monocapa.

En el protocolo para la formación de EBs, las colonias de ESCs e iPSCs se separan y crecen en suspensión. Posteriormente los EBs se colocan en sustratos adhesivos con un medio definido libre de suero que promueve la generación de rosetas tipo tubo neural (*neural tube-like rosettes*) y la selección de células progenitoras neurales (Koch *et al.* 2009). En 2001 se describió por primera vez la diferenciación, el enriquecimiento y el trasplante de células precursoras neurales de EBs derivadas de ESCs humanas *in vitro* (Zhang *et al*. 2001). En 2013, Kozhich *et al.* desarrollaron un protocolo para la generación y diferenciación estandarizada de células precursoras neurales a partir de células madre pluripotentes de origen humano. Las células madre pluripotentes también pueden diferenciarse directamente en NSC en cultivo en monocapa. Para iniciar la diferenciación se utiliza un medio sin suero y pobre en nutrientes, y dependiendo de la línea celular, se pueden requerir factores de crecimiento o inhibidores adicionales (Banda y Grabel, 2016).

Transdiferenciación de células somáticas en NSC: El término transdiferenciación, también conocido como reprogramación del linaje, fue originalmente acuñado por Selman y Kafatos en 1974. Durante este proceso, un tipo de célula somática madura se transforma en otro tipo de célula somática madura sin experimentar un estado pluripotente intermedio (Graf y Enver, 2009). Este proceso es inducido principalmente por la expresión exógena de factores de transcripción específicos del linaje y por compuestos químicos.

Hace apenas cinco años se demostró por primera vez que se puede promover la formación de NSC inducidas (iNSCs), a partir de fibroblastos de ratón gracias a la expresión transitoria de factores de pluripotencia combinada con los *inputs* de señalización neural adecuados (Thier *et al*. 2012). Además de los factores de pluripotencia, los factores de transcripción (FT) específicos de NSC también pueden inducir la generación de células neurales con capacidad de auto-renovación y potencial de diferenciación tripotente (Han *et al*. 2012).

También se puede utilizar un solo FT, como Sox2 o ZFP521 para generar iNSCs a partir de fibroblastos de ratón y humanos (Shahbazzi *et al.* 2016) Dos equipos chinos han combinado por separado factores de

transcripción con cócteles químicos que permiten la generación de iNSCs expandibles a partir de fibroblastos tanto de primates como de humanos (Zhu *et al*. 2014), lo que sugiere que ciertos químicos de molécula pequeña pueden aumentar la eficiencia de la generación de iNSC. Además de los fibroblastos, muchos otros tipos de células somáticas están siendo consideradas como células iniciales adecuadas para la generación de NSC: células de Sertoli, células hepáticas adultas y linfocitos B, células epiteliales de orina y astrocitos (Corti *et al*. 2012).

En los últimos años, existen investigaciones que han explorado la reprogramación química como un nuevo método para manipular el destino celular, en comparación con la práctica convencional de importar genes virales exógenos para inducir la transdiferenciación celular. El uso de productos químicos de molécula pequeña para provocar la transdiferenciación celular tiene muchas ventajas obvias en términos de seguridad. Cheng *et al*. (2014) han sido los primeros en publicar la utilización de un cóctel químico que contiene ácido valproico (VPA), CHIR99021 y Repsox (que inhibe las histonas deacetilasas (HDAC)), la glucógeno sintasa quinasa (GSK)-3 y el factor de crecimiento transformante (TGF)-β, para generar NPCs inducidas químicamente (ciNPC) a partir de fibroblastos embrionarios de ratón en condiciones hipóxicas. Este trabajo demuestra que la conversión directa del linaje específico a NPCs puede lograrse sin la introducción de genes exógenos y que la hipoxia fisiológica es esencial para el proceso de transición inicial. En ausencia de condiciones hipóxicas, también se ha desarrollado un cóctel de ocho componentes de molécula pequeña, que puede transdiferenciar eficiente y específicamente fibroblastos de ratón en células de tipo NSC. Estas células se parecen a las NSC primarias en términos de sus capacidades de autorenovación y diferenciación tripotente a largo plazo (Zhang *et al*. 2016). A pesar de estos logros, los mecanismos que subyacen a la transdiferenciación inducida químicamente siguen siendo en gran parte desconocidos. Los perfiles globales de expresión génica determinados mediante análisis de microarrays han revelado que el método de cultivo basado en moléculas pequeñas afecta fuertemente a la identidad celular e induce específicamente la diferenciación neural y los genes relacionados con el desarrollo.

1.7.5 Papel de los factores en la proliferación y diferenciación de NSC

La señalización por factores de crecimiento es el principal mecanismo para regular la proliferación durante la neurogénesis, tanto *in vivo* como en los modelos de NSC estudiados en cultivo. Se ha demostrado el efecto de los FGF, EGF, neurregulinas, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario (PEDF) y algunos neurotransmisores como GABA (Zhao *et al*., 2008). Los nucleótidos purinas actuan como señales proliferativas para progenitores neurales y, por tanto, regulan negativamente la diferenciación neuronal terminal en la SVZ de rata. La familia de citoquinas neuropoyéticas, particularmente LIF y CNTF, promueven el mantenimiento de las NSC en el adulto, y pueden ser parte de las señales iniciadas en respuesta a lesiones neurales. El ratón deficiente de reelina, proteína de la matriz extracelular que se une a receptores VLDR y ApoER expresados por neuronas, tiene disminuidas las poblaciones de NSC del hipocampo y el bulbo olfatorio, pero la población de la SVZ es normal. Esto sugiere que la falta de reelina endógena altera la migración de las NSC que han proliferado en la SVZ. De hecho, las NSC humanas inyectadas en el ventrículo lateral, migran y se diferencian en un ratón silvestre pero no lo hacen en el deficiente en reelina (Kim *et al*., 2002). Muchos otros factores, neurotrofinas, neuropéptidos y neurotransmisores ayudan a las células madre a decidir su destino y a alcanzarlo. Este conocimiento es esencial para poder plantearse futuros usos terapéuticos.

Feng *et al.* en 2014 establecieron con éxito un protocolo de inducción de tres pasos que genera células tipo *neural stem cells* altamente purificadas a partir de células madre mesenquimales (MSC) derivadas de tejido adiposo humano, a través de la activación de SOX1 por medio condicional, EGF y FGF. Un año más tarde, se descubrió que el líquido cefalorraquídeo que contiene factores de crecimiento puede ser un mejor microambiente para una transición más rápida de MSC a NSC (Ge *et al*. 2015). Recientemente, Gao *et al*. (2017) publicaron un método para la generación de células precursoras neurales a partir de fibroblastos de ratón utilizando estrés físico y algunos factores de crecimiento, incluyendo EGF, bFGF, factor inhibidor

de la leucemia y heparina, que actúan conjuntamente para regular las vías de señalización aguas arriba y aguas abajo de Sox2. Durante este proceso de inducción directa, las células pasaban primero a través de un estado transitorio parcialmente reprogramado, y luego, lograban la transdiferenciación celular a través de un método seguro, no integrado y eficiente.

Dado que las células madre residen en nichos específicos *in vivo*, un sistema de cultivo *in vitro* tridimensional debe imitar su entorno físico y mejorar la autorrenovación y multipotencia de las NSC, en comparación con las condiciones de cultivo bidimensionales tradicionales. Estudios de 2013 demostraron que los fibroblastos de ratón pueden convertirse en esferas tridimensionales sobre sustratos no adherentes y posteriormente exhibir características similares a las progenitores neurales en términos de morfología celular, expresión de marcador específico y capacidad de autorrenovación (Su *et al.* 2013). Los experimentos inmunocitoquímicos han indicado que la expresión de Sox2 está significativamente regulada de maneran positiva en fibroblastos de ratón en cultivo tridimensional, lo que sugiere que otros andamios o soportes tridimensionales también podrían usarse durante la generación de iNSC.

1.7.6 Las NSC y su transformación a glioblastoma

Las NSC juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis cerebral a través de su capacidad de migrar desde la SVZ al lugar de la lesión, reemplazar las células madre endógenas afectadas y destruir las células tumorales (Vescovi *et al*., 2006). Esta capacidad para migrar a través del parénquima, así como su preferencia por tractos de la sustancia blanca y membranas basales de los capilares, son rasgos que también presentan los gliomas malignos. Esto sugiere que las NSC y las células tumorales comparten un comportamiento y patrón de movilidad común (Sanai *et al*., 2005).

Las NSC y las células de glioma comparten varios perfiles de expresión génica. La vía de señalización sonic hedgehog-Gli regula el mantenimiento de las NSC y su desregulación parece estar implicada en la formación del glioma (Dahmane *et al.*, 2001). El gen supresor de tumores PTEN, se encuentra normalmente mutado en casos de glioblastoma y también

participa en la proliferación y motilidad de las NSC. Notch, la telomerasa, Wnt y las vías de señalización de factor-β están involucrados en la regulación del comportamiento tanto del glioblastoma como de las NSC (Sundar *et al*., 2014). Aunque el proceso por el cual las NSC se convierten en células de glioma maligno no se ha establecido de manera concluyente, existen evidencias de que el paso intermedio implica la transformación de NSC en células madre tumorales.

Las células madre específicas de glioblastoma fueron descubiertas por primera vez en 2002 cuando Ignatova *et al*. aislaron neuroesferas (precursores gliales) a partir de biopsias de pacientes con glioblastoma. Estudios posteriores han determinado que las células madre tumorales están involucradas en el mantenimiento de la tumorogénesis y en los patrones de resistencia a la quimioterapia y a la radiación. A través de la liberación de mitógenos tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento de fibroblastos-2, se ha demostrado que las células de glioblastoma son capaces de manipular el microambiente local de la SVZ para reclutar NSC que se transformarán en células madre tumorales y perpetuarán la formación del glioma. Por lo tanto, los nichos de NSC dentro de la SVZ pueden servir de nido para la repoblación continuada del glioblastoma, que, en función de su distancia al tumor primario, podrían invalidar la efectividad de las terapias locales existentes.

Como conlusión a este apartado, establecemos que las NSC muestran una gran plasticidad en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso y pueden inducirse a diferenciación en células neurales maduras de diversos tipos, que incluyen neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Bajo condiciones definidas, las NSC tienen un amplio repertorio de diferenciación e incluso pueden dar lugar a células no ectodérmicas, incluyendo células hematopoyéticas y células miogénicas esqueléticas. Además, las NSC secretan factores neurotróficos que mejoran el microambiente de la lesión, generando así las condiciones apropiadas para la reparación patológica.

El efecto terapéutico del trasplante de NSC cabe mejorar con agentes farmacéuticos adyuvantes, modificación genética, injertos tridimensionales o células auxiliares.

Inicialmente, las NSC solo se podían obtener de cerebros embrionarios y, por lo tanto, la fuente limitada y los problemas técnicos bloquearon la progresión de la terapia celular basada en NSC. Actualmente, las tecnologías emergentes mejoran los métodos que pueden utilizarse para obtener NSC, especialmente lo que respecta a la identificación de ESC y el desarrollo de iPSC, permitiendo la obtención de un gran número de NSC. La diferenciación de las células madre pluripotentes en NSC de alta pureza generalmente requiere tiempos largos y está acompañada de problemas de seguridad, lo que complica la traducción de este procedimiento en una terapia clínica. La transdiferenciación de células somáticas (especialmente los métodos sin una estrategia viral o la integración de genes exógenos tales como la transdiferenciación celular inducida por químicos, factores de crecimiento, cultivo tridimensional o microARN (Yang *et al.* 2017)) evita las deficiencias previas y proporciona una estrategia interesante para la producción masiva de NSC con fines clínicos.

Aunque el tratamiento con NSC ha demostrado cierto éxito en una variedad de modelos de enfermedades animales, todavía siguen existiendo muchos problemas que solventar para poder conseguir una transición hacia las aplicaciones clínicas.

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es:

Generar una línea celular con características de células madre neurales

Materiales y Métodos

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Evaluación del estado senescente e inmortalización de la línea celular derivada de células madre neurales

3.1.1 Animales de experimentación

Las células para el cultivo se obtuvieron a partir de embriones de 13,5 días de ratones (*Mus musculus*) C57BL/6 (Harlan Laboratories, Inc, desde 2015 Envigo). La alimentación se realizó con dieta estándar (Dieta A03. SAFE de Panlab S.L.U) *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales con animales en esta tesis se realizaron según el RD 1201/2005, bajo la autorización 15005AE/11/FIS02/VMAV/1, de la que es investigador responsable el profesor Víctor Arce. Los procedimientos fueron realizados en el animalario del Departamento de Fisiología por mí, como persona capacitada para la realización de las funciones B y C.

Los animales fueron distribuídos para la formación de unidades de cría "tipo harén". Una vez formada la unidad de cría, al cabo de 12 y 24 horas se procedió a la observación del tapón vaginal en las hembras progenitoras. Estas unidades de cría se formaban a última hora de la tarde, próximos al momento del ciclo de oscuridad de los animales. De este modo, al observar el tapón por la mañana, establecíamos el tiempo 0,5 días de gestación. Observado el tapón (prueba de que ha habido cópula), esperábamos un total de 13,5 días de gestación para proceder al sacrificio de las madres y extracción de embriones.

Por otro lado se formaron unidades de cría para la obtención de neonatos de 9 días de edad, que eran utilizados para los cultivos de neuroesferas neonatales. En este caso no era necesario controlar el momento de cópula. Una vez que la madre gestante daba a luz hasta que las crías tenían 9 días de edad se mantenían a la madre y a las crías en la misma jaula.

Los animales eran sacrificados por inhalación de CO_2 (previa gasificación de la urna) e inmediatamente eran embebidos en alcohol. A continuación eran

llevados a la cámara de flujo laminar donde se realizaba la extracción de los embriones de las madres gestantes.

3.1.2 Extracción de embriones murinos

Para la extracción de embriones se realizaba una incisión a la altura de la línea alba en dirección caudo-craneal, comenzando a la altura de la vagina y terminando al comienzo de la caja torácica. Retirábamos la piel, el peritoneo y apartando ligeramente el intestino grueso buscábamos el comienzo del útero. La morfología del útero del ratón tiene forma de Y (útero bipartito), quedando situados los embriones a modo de cuentas de collar a lo largo de los astas uterinas (Figura 13).

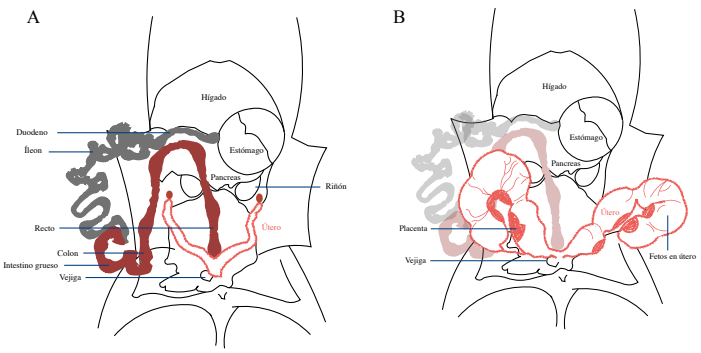

Figura 13. A: Representación que muestra las vísceras abdominales, exponiendo el sistema urogenital de una hembra. B: Representación del útero de una hembra gestante. Se observan los embriones dispuestos a lo largo de las astas uterinas. (Adaptado de: The Anatomy of the Laboratory Mouse. Margaret J. Cook, 1965, con permiso de Elsevier).

Para extraer lo embriones bastaba con sujetar con las pinzas la parte más caudal de las astas y tirar levemente. Realizábamos un corte a la altura de la vagina y las astas uterinas, con los embriones en su interior, se depositaban sobre una placa estéril. A continuación se procedía a la rotura de las paredes de las astas uterinas, con cuidado de no romper la placenta y se extraían uno por uno cada embrión. Los embriones de ratón de 13,5 días de edad miden aproximadamente un centímetro de longitud. Cada embrión se disponía junto a

su saco placentario, saco que debemos evitar romper hasta justo antes de la extracción de los cerebros.

Para extraer los cerebros embrionarios realizábamos una incisión horizontal a un par de milímetros sobre la línea de los ojos del embrión. El cráneo de un embrión de esta edad es muy fino y se rasga limpiamente con facilidad con la hoja de un bisturí. Una vez realizado el corte sólo era necesario introducir suavemente la punta del bisturí por él y empujando levemente hacia fuera extraer la masa cerebral completa.

3.1.3 Homogenización de cerebros embrionarios

Se realizó una primera homogeneización mecánica con bisturí para intentar disgregar el cerebro en fragmentos pequeños. A continuación, con la ayuda de una micropipeta seguimos homogeneizando el tejido con el propósito de obtener un procesado mayor. Cuando el tejido queda lo suficientemente homogeneizado como para ser succionado sin resistencia por la punta de la pipeta, se tamiza, junto al medio de cultivo, por filtros de 40 μm (Cell Strainer. 40 um Nylon. BD Falcon™). Por último, se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm, rechazando el sobrenadante y resuspendiendo el *pellet*. Una vez resuspendido, el volumen de suspensión obtenido se depositó en placas de cultivo y se completó, si era necesario, con más medio de cultivo hasta llegar a los 10 ml.

3.1.4 Cultivos primarios de células madre neurales

Las células se cultivaron a 37ºC y 5% CO_2 en placas de cultivo celular (Tissue Culture Dish. 100x20 mm. BD Falcon™) en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium. Sigma Aldrich) completado con un 10% de suero bovino fetal (FBS. Invitrogen). El medio se renovó a las 24 y 48 horas del cultivo y se comprobó que las células se hubieran adherido a la placa y que no existiera contaminación.

A partir de este momento, se comprobó diariamente la confluencia y morfología celular y se renovó el medio de cultivo cada 48-72 horas. Cuando las células llegaban a un 85-90% de confluencia se sometían a tripsinización en relación 1:3 siguiendo una modificación del protocolo 3T3 (originariamente descrito para la inmortalización de fibroblastos embrionarios de ratón. Todaro GJ y Green H, 1963). A este protocolo lo denominaremos CTC (*Confluence to*

confluence). La tripsinización consistía en aplicar el enzima tripsina + 0,05% EDTA (Invitrogen), para hacer que las células se desprendieran de la superficie de la placa de cultivo y para que se desprendieran también entre ellas. De este modo conseguíamos una suspensión homogénea de células que formaría el sustrato para el siguiente pase celular. Definimos pase como momento en el que, por la llegada de las células a confluencia, tripsinizamos y resembramos esas mismas células en un número mayor de placas para que prosigan su crecimiento y divisiones (se representa un esquema del proceso en la figura 14).

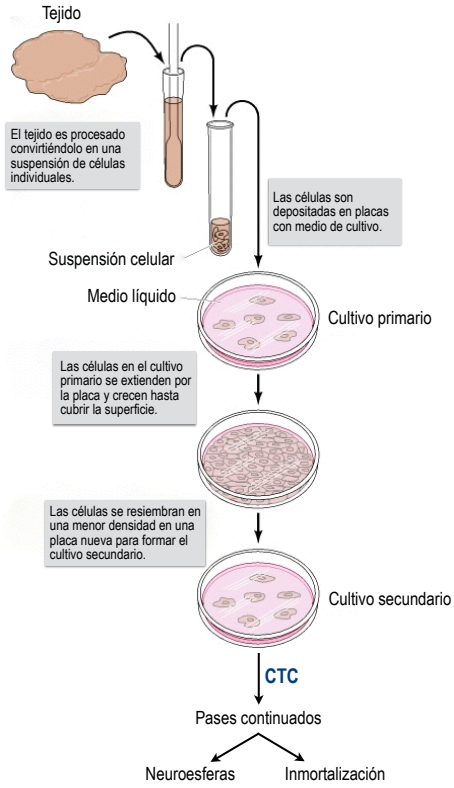

Figura 14. Esquema del protocolo general para la realización de un cultivo celular. (Adaptado de: The Cell. A Mollecular Approach, G.M. Cooper, 2000, con permiso de Oxford University Press).

3.1.5. Cultivos primarios de fibroblastos embrionarios murinos

Para el cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón, el primer paso era conseguir una hembra gestante de 13,5 días, con el mismo procedimiento mostrado en el apartado 3.1.1. Una vez que se alcanzaba ese momento las hembras se sacrificaban por gasificación con CO_2 en hurna siguiendo las especificaciones del procedimiento aprobado para este fin (mismo procedimiento de sacrificio se explica en el apartado 3.1.1). La extracción de los embriones y separación de cada uno de ellos se realizaba del mismo modo que consta en el apartado 3.1.2.

Una vez que teníamos los embriones individualizados se eliminaba en primer lugar la cabeza realizando un corte transversal a la altura del cuelo. En segundo lugar debíamos eliminar los órganos rojos. Para ello bastaba con realizar una pequeña incisión sagital a lo largo del abdomen y con la punta del bisturí conseguir extraer la mayor parte de masa roja que viesemos en la zona abdominal. Una vez eliminados estos, homogeneizábamos el resto de tejido embrionario que quedaba. Para ello seguíamos el protocolo expuesto en el apartado 3.1.3. así como las condiciones en las se sembraban las células y se mantenían en cultivo.

3.1.6 Cultivo de neuroesferas neonatales de ratón

Tras el sacrificio de los ratones neonatos de 9 días, éstos se colocaron en una solución de medio salino Hanks libre de Calcio y Magnesio (Gibco), bajo condiciones estériles. Para extraer el cerebro es preciso en primer lugar realizar un corte horizontal a la altura del cuello para quedarnos así sólo con la cabeza del animal. Sujetando con firmeza la cabeza a la altura de las orejas con una pinza realizamos un corte sagital con bisturí a lo largo de la piel, para poder retirarla y dejar expuesto el cráneo del animal. Repetimos el mismo tipo de corte sagital con bisturí pero esta vez sobre el cráneo, como si quisiéramos separar ambos hemisferios cerebrales. La incisión debe realizarse de manera delicada pues queremos perforar el cráneo pero no el cerebro. Una vez realizado el corte, con el mismo bisturí hacemos presión hacia fuera para retirar con cuidado ambos lados del cráneo, quedando el cerebro expuesto. En este momento, elevando ligeramente con una pinza la parte posterior del cerebro, seccionamos la parte del tronco encefálico que

pudiera haber quedado y haciendo un leve movimiento de palanca conseguimos extraer limpiamente el cerebro, que se coloca en una placa limpia. El siguiente paso consistió en exponer el hipocampo para lo cual se dividió el cerebro en hemisferios. Se retiró el hipocampo y diseccionó en una McIlwain Tissue Chopper, obteniendo láminas sucesivas de 350 μm de grosor.

Los cortes se colocaron en una placa de cultivo, bajo una lupa, para seleccionar y retirar la zona subgranular del Giro Dentado. Los fragmentos obtenidos fueron diferidos en tripsina 0.025 % y EDTA 0.265 mM (ambos de Gibco) durante 10 minutos a 37ºC, seguido de una homogeneización mecánica con micropipeta. Bajo estas condiciones, se generó una suspensión celular que fue diluída en medio libre de suero (SFM, *Serum Free Medium*) compuesto por medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (DMEM/Ham's F-12 medium + GlutaMAX-I) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 μg/ml de estreptomicina, 1 % del suplemento B27, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico bovino (bEGF, *Epidermal Growth Factor*), y 10 ng/ml de factor de crecimiento básico de fibroblastos-2 (bFGF2, *basic fibroblast growth factor-2*). Todos estos factores fueron suministrados por Gibco.

Las células se sembraron en placas Petri con una densidad de 3000 células por cm^2 y se hicieron crecer en un incubador con 5% de CO_2, 95% de aire atmosférico, a 37ºC. Los cultivos permanecieron entre 10 y 12 días en estas condiciones de proliferación, para, de este modo, conseguir la formación de las neuroesferas y que éstas alcancen un tamaño adecuado.

3.1.7 Evaluación de la senescencia

La capacidad limitada de replicación es una característica definitoria de células viables y culmina en un estado de senescencia en el que se produce una parada celular (Goldstein S. 1990). Las células senescentes no muestran estimulación de su división por presencia de suero o por pases celulares, y desemboca en un perfil espécifico de ciclo celular que difiere de la mayoría de perfiles por procesos de parada inducido por daño o inhibición por contacto (Sherwood SW. *et al*. 1988). Las células senescentes vienen caracterizadas por un tamaño celular agrandado, expresión de actividad β-galactosidasa dependiente de pH

(Dimri G. *et al*. 1995) y un patrón de expresión génica alterado (Cristofalo VJ. *et al*. 1998 y Linskens MH. *et al*. 1995).

3.1.7.1 Test de Senescencia

Para la determinación de la senescencia celular se utilizó el Senescence β-Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit está diseñado para detectar histoquímicamente actividad β-galactosidasa a pH 6.0, una característica conocida de las células senescentes. Esta actividad β-galactosidasa sólo está presente en células senescentes y no ha sido encontrada en células presenescentes, quiescentes o células inmortales. Esta actividad se manifiesta con una coloración intensa en células senescentes. El marcaje de los núcleos celulares se realizó con bisbenzamida (Sigma Aldrich) durante 40 minutos. La bisbenzamida es un fluorocromo que actúa como agente intercalante en regiones ricas en A-T del ADN. Este compuesto se excita con luz ultravioleta a 350 nm y emite fluorescencia azul/cian.

3.1.7.2 Visualización y recuento de células senescentes

Se observaron los resultados del test en un microscopio de fluorescencia (Olympus IX70, con cámara DP50) siguiendo los siguientes criterios (Figura 15): Teniendo en cuenta que habíamos realizado 3 réplicas por grupo analizado, es decir, 3 pocillos sembrados con células provenientes de una misma placa del cultivo, procedíamos a seleccionar 4 campos a azar de cada pocillo. De cada uno de estos campos realizábamos dos fotografías exactamente en la misma posición: una fotografía a luz visible y la otra a luz ultravioleta. En la primera observábamos el número de células que habían adquirido una coloración azul (marcadas y por tanto, senescentes) y en la segunda fotografía, gracias al fluorocromo, los núcleos de todas las células presentes en ese campo (senescentes y no senescentes).

Para el recuento se ha utilizó el programa ImageJ de los NIH (National Institutes of Health). Los resultados se muestran como porcentaje de células senescentes con respecto al total.

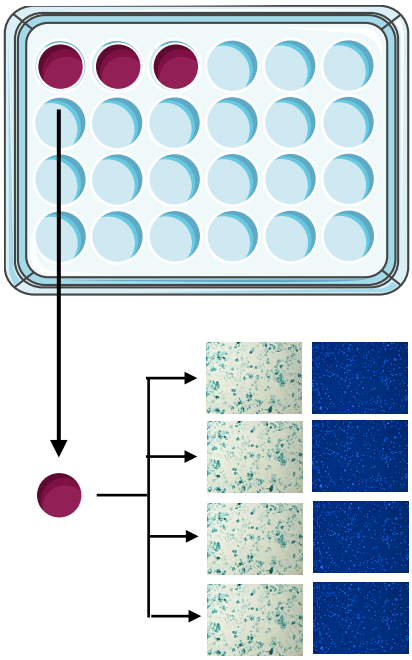

Figura 15. Esquema de protocolo realizado para cada una de las réplicas procedentes de una misma placa. Este proceso se repite a diferentes pases celulares a lo largo del cultivo.

3.1.8 Formación de neuroesferas embrionarias

Cuando se produce un insulto cerebral, las células madre neurales, por su capacidad de regeneración, proliferan y migran hacia la zona dañada para llevar a cabo un proceso de reemplazamiento celular. *In vitro*, se ha observado que las células madre neurales forman neuroesferas.

Para obtener neuroesferas de nuestra línea celular derivada de células madre neurales tripsinizamos las células sembradas en placa, neutralizamos y cuantificamos. Depositamos en una nueva placa de 500.000 a 750.000 células en 5 ml de medio de cultivo (Figura 16). El medio utilizado para la formación de neuroesferas fue medio semisintético estándar en el que duplicamos la

concentración de factores de crecimiento. De este modo, los componentes del medio utilizado fueron: DMEM/F-12 (1:1) + GlutaMAX™-I de GibcoRby Life Technologies™; 10% de Penicilina/Estreptomicina (10,000 unidades de penicilina y 10 mg de estreptomicina por ml en 0,9% NaCl) de Sigma Aldrich; 10% de Suplemento B-27 (50X) de GibcoR by Life Technologies™ ; 1% bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) 0,5 mg/ml y 1% de EGF (Epidermal Growth Factor) 0,5 mg/ml, ambos factores de Invitrogen. Después de 12 a 24 horas de incubación observamos neuroesferas en suspensión.

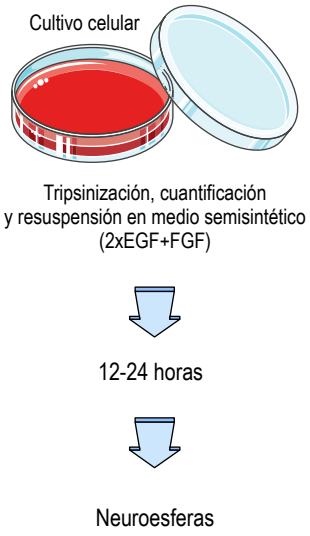

Figura 16. Protocolo para la formación de neuroesferas a partir de la células en cultivo.

3.1.8.1 Tipos de neuroesferas

Hemos caracterizado la formación de dos tipos de neuroesferas que hemos denominado como neuroesferas precoces (N2P) y neuroesferas tardías (N2T). Las N2P se refieren a las neuroesferas generadas a las 12-24 horas según el protocolo descrito en el apartado anterior. Si en el momento de formación de las N2P, se aíslan a una nueva placa y mantenemos las placas de origen durante 5-7

días en incubación en medio semisintético, aparecen las N2T (más numerosas y de menor diámetro de las primeras). Se muestra el protocolo en la figura 17.

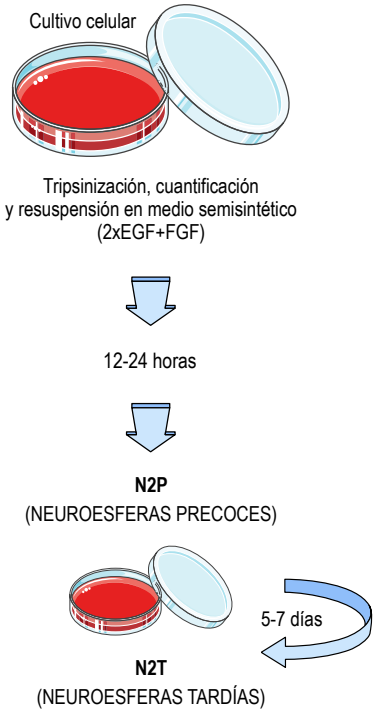

Figura 17. Protocolo para la formación de neuroesferas precoces (N2P) y neuroesferas tardías (N2T) a partir de las células en cultivo.

3.1.8.2 Control de formación de neuroesferas tardías

En el momento de aislar las N2P a una placa nueva, observamos que quedaban células fijadas en la placa de origen. Células que además, al estar creciendo en medio semisintético adquirían una disposición característica.

Nuestra primera sospecha fue si las N2T se formaban por agregación de células que a los 5-7 días daban lugar a una segunda población de neuroesferas (tardías), de menor tamaño y en mayor cantidad, o bien, si eran

las células que quedaban en la superficie de la placa las que se iban agrupando, formando nidos hasta, en un momento determinado, soltarse y quedar en suspensión.

Para aclarar esta cuestión se realizó un experimento en el que, tras la formación y aislamiento de las neuroesferas precoces, se siguió la evolución de las células que quedaban creciendo en la superficie de la placa.

Partimos de tres placas en las que se habían formado N2P y se habían aislado. Establecimos dos campos por placa para hacer un seguimiento a los 1.5, 2.5, 3.5 y 5 días. Se observó la evolución de las células en la placa hasta la formación de las N2T y su pérdida de adherencia.

3.1.8.3 Formación secundaria de neuroesferas

El siguiente paso fue comprobar si tanto las N2P como las N2T, tras adherirse a la superficie de la placa, dividirse y expandirse hasta llegar a confluencia y mantenerlas en cultivo en monocapa dos pases celulares, son capaces de volver a formar neuroesferas, tanto precoces como tardías al estar en contacto de nuevo con medio semisintético. Esto es lo que nosotros hemos llamado Formación Secundaria de neuroesferas. El procedimiento llevado a cabo queda representado en las figuras 18 y 19 a continuación.

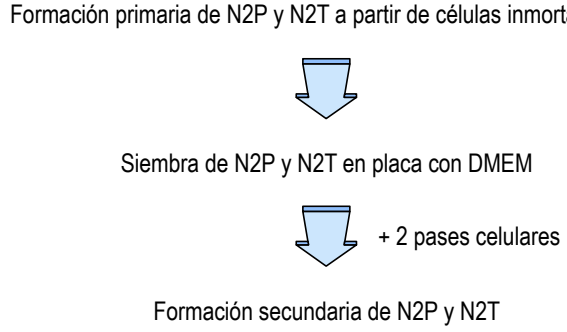

Figura 18. Protocolo para el experimento de formación secundaria de neuroesferas.

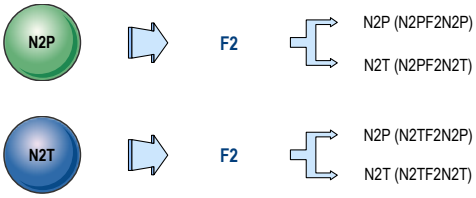

Figura 19. Representación de los diferentes tipos de neuroesferas observadas durante los experimentos, con sus respectivas denominaciones. F2: Formación Secundaria de neuroesferas tras dos pases desde la siembra en monocapa (con DMEM completo).

3.1.8.4 Cuantificación y medición de los diferentes grupos de neuroesferas

Utilizando como referencia la cuadrícula de una cámara de Neubauer, se establecieron equivalencias entre pixeles y mm de fotografías a 10x, para poder no sólo contar el número de neuroesferas generadas en cada grupo del experimento, sino también para poder medir los diámetros de las mismas. Las equivalencias establecidas se muestran en la figura 20.

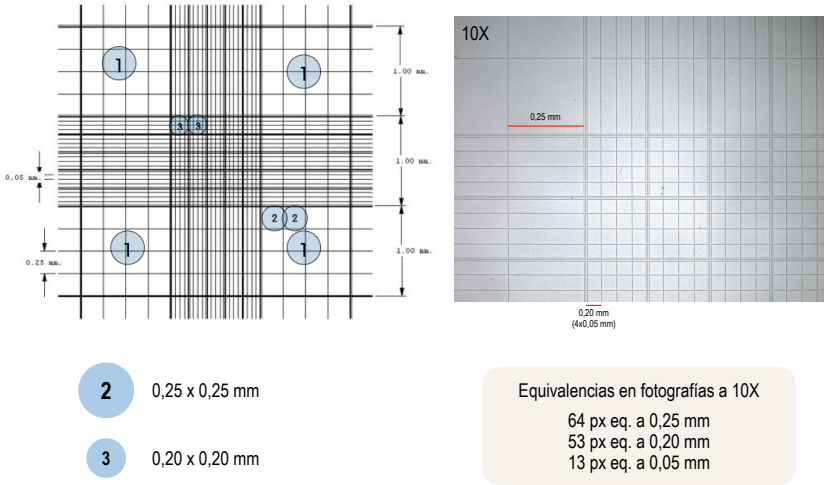

Figura 20. Representación de las equivalencias establecidas para el proceso de medición de diámetros de los diferentes grupos de neuroesferas.

3.2 Caracterización de células madre neurales y neuroesferas

3.2.1 Inmunocitoquímica

3.2.1.1 Evaluación de la expresión de marcadores de linaje neural

La proteína GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) viene codificada por el gen *GFAP* (17q21). Esta proteína pertenece a la familia de los filamentos intermedios, los cuales forman redes que proporcionan apoyo y fuerza a las células. Varias moléculas de GFAP se unen para formar el tipo de filamento intermedio que se encuentra en las células de la astroglía (apoyan y nutren las células en el cerebro y la médula espinal). Si las células del cerebro o de la médula espinal son dañadas por un traumatismo, insulto o enfermedad, las células astrogliales reaccionan rápidamente produciendo más GFAP.

Aunque su función no se conoce por completo, la GFAP probablemente está involucrada en el control de la forma, el movimiento y la función de las células astrogliales. Algunos investigadores han sugerido que las células astrogliales juegan un papel importante en el funcionamiento de otras células, incluyendo las células especializadas que rodean los nervios (oligodendrocitos) así como en el mantenimiento y la producción de mielina (sustancia grasa que forma una capa protectora alrededor de ciertas células nerviosas y asegura la rápida transmisión de los impulsos nerviosos) a largo plazo. Además, las células astrogliales pueden ayudar al mantenimiento de la barrera hematoencefálica (Genetic Home Reference. National Institutes of Health).

La GFAP se utiliza como marcador de astrocitos. Sin embargo, ciertos tipos de tumores cerebrales derivados de células astrocíticas también expresan fuertemente GFAP. Esta proteína también se encuentra en el epitelio del cristalino, en las células de Kupffer del hígado, en células de tumores salivares así como en eritrocitos. En el SNC, este anticuerpo tiñe astrocitos y algunos grupos de células ependimarias. En el Sistema Nervioso Periférico (SNP) tiñe células de Schwann, células satélite y células gliales entéricas.

La vimentina es una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular de células embrionarias, ciertas células endoteliales, así como células sanguíneas. Los monómeros de vimentina se enrollan entre sí formando una fibra estable lo cual es crítico

para sus funciones (proveer un ancla para el soporte de los orgánulos intracelulares como la mitocondria, el retículo endoplasmático, etc, mantener la integridad física de la célula junto con los otros filamentos intermedios y participar en uniones intercelulares como en los desmosomas). En técnicas inmonucitoquímicas la vimentina marcaría fuertemente fibroblastos.

La proteína SOX2, también conocida como SRY-box 2 (de sus siglas en inglés Sex determining Region Y-box 2), es un factor de transcripción cuya función es esencial en el mantenimiento de la auto-renovación de las células madre embrionarias no diferenciadas. La proteína SOX2 es codificada por un gen que no presenta intrones y pertenece a la familia de factores de transcripción SOX HMG-box relacionados con SRY, los cuales se encuentran implicados en la regulación del desarrollo embrionario y en la determinación de la diferenciación celular. También se analizó la expresión de NeuN, que localiza en los núcleos y el citoplasma perinuclear de la mayoría de las neuronas en el sistema nervioso central de los mamíferos. Los anticuerpos monoclonales contra la proteína NeuN se han utilizado activamente en la investigación inmunohistoquímica de la diferenciación neuronal para evaluar el estado funcional de las neuronas. Analizamos también el marcador para proteína básica de mielina (MBP).

En primer lugar, se sembraron aproximádamente $5x10^3$ células sobre portaobjetos tratados con polietilamina o polilisina y se incubaron durante 24 horas. A continuación retiramos el medio de cultivo, lavamos con tampón fosfato salino (PBS: *Phosphate buffered Saline*. Sigma Aldrich) y las fijamos con etanol al 96% durante 1 hora. Si una vez fijadas se hubieran querido conservar, se guardarían a -20ºC.

Tras la fijación se somete a las células a un lavado con PBS para comenzar con la permeabilización (250 ml de TritonX-100 al 0,1%, albúmina de suero bovino (BSA) al 0,3%, durante 1 hora). Una vez realizada la permeabilización, lavamos las muestras tres veces en PBS y se comienza con la incubación de los anticuerpos durante la noche a 4ºC con los siguientes anticuerpos primarios: anti-GFAP (Dako, Agilent Technologies, Madrid, España, lista para usar), anti-proteína básica de mielina (MBP) (Dako, Agilent Technologies, dilución 1: 2000), anti-NeuN

(Merk Millipore, Madrid, España, dilución 1: 200) y anti-SOX2 (Seven Hills Bioreagents, Cincinnati, OH, EUA; dilución1: 1000). Las células positivas se detectaron con un segundo kit de anticuerpos universal que usa un dextranpolímero marcado con peroxidasa conjugado (EnvisionPlus, Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) Y se fotografió con una cámara Olympus BX43 (Olympus Optical Co., Tokio, Japón).

Para asegurarnos de la fiabilidad de los resultados se realizó la substitución del los anticuerpos primarios por PBS (controles negativos).

3.2.1.2 Neuroesferas embrionarias incluídas en parafina

Retiramos las neuroesferas de su placa con una micropipeta y centrifugamos (5 minutos, 1000 rpm) para concentrar las neuroesferas en el fondo del tubo Falcon. De este modo podíamos obtener en poco volumen una cantidad adecuada de neuroesferas. Terminábamos con un tubo eppendorf que contenía de 5 a 10 neuroesferas en un volumen aproximado de 200 µL.

La parafina no es miscible en agua y la mayoría de los fijadores son soluciones acuosas. Esto implica que para que la parafina líquida pueda penetrar completamente en la muestra ha de sustituirse el agua por un solvente orgánico. Esto lo conseguimos por deshidratación de la muestra en etanol, de gradación creciente hasta el de 100º. Posteriormente se transfería la muestra a xileno (miscible tanto con el alcohol como con la parafina). El tiempo de incubación de la muestra en xileno no debía ser excesivo puesto que endurecía la muestra y creaba problemas a la hora de hacer las secciones.

Se pasaba la muestra a parafina previamente licuada en una estufa. Se daban 3 pasos por parafina para favorecer la completa sustitución del xileno por la parafina. Tras el embebimiento completo de la muestra se vertía la parafina líquida en un molde, se introducía la muestra y se dejaba solidificar a temperatura ambiente.

Una vez que teníamos el bloque de parafina debíamos llevar a cabo una serie de procesos antes de hacer el primer corte útil en el microtomo. En primer lugar había que retallar el bloque hasta hacer una pirámide truncada. Una vez detallada la pirámide, y antes de obtener secciones de nuestra

muestra, era necesario un proceso de desbastado, es decir, la eliminación del espesor de parafina que había entre la superficie del bloque y nuestra muestra.

Una vez comenzado el corte de nuestra muestra se obtenían tiras de secciones de 3 micras unidas por las caras paralelas a la cuchilla. Estas tiras se manipulaban con pinceles y antes de su fijación definitiva en la superficie de un portaobjetos, tenían que estirarse para que la muestra quedase perfectamente extendida. Aprovechando la hidrofobicidad de la parafina, las secciones se colocaban sobre agua calentada a unos 35 °C a 40 °C y el calor hacía que se extendiesen sin llegar a su punto de fusión, que está en torno a los 60 °C. El estiramiento se realizaba en baños de agua con regulación térmica.

La superficie del portaobjetos donde se colocaban las tiras de cortes estaba previamente tratada para que nuestras muestras quedasen adheridas durante el procesamiento posterior. Para ello los portaobjetos se recubrían con soluciones de polilisina y se dejaban secar.

Una vez que el agua se había evaporado y estaban extendidas las tiras de cortes de parafina sobre el portaobjetos, se procedía a un secado exhaustivo en una estufa a una temperatura de entre 35 °C y 40 °C durante toda la noche. Una vez secos, los portaobjetos con las secciones estaban listos para el los pasos posteriores.

El siguiente paso era comenzar con la tintinó hematoxilina-eosina. Para ello, primero teníamos que desparafinar las muestras sumergiendo los portas con los cortes en xileno (2x10 minutos) y posteriormente hidratar a través de alcoholes en gradación decreciente hasta terminar en agua destilada. A continuación aplicábamos un choque térmico en microondas a 750W de potencia durante 20 minutos y se dejaba enfriar a temperatura ambiente durante otros 20 minutos. El tampón utilizado fue tampón nitrato (10 mM, pH 6).

Tras lavar con agua destilada se realizaba un baño con hematoxilina de 30 segundos a fin de poder visualizar la muestra.

3.2.2 Ensayo de proliferación celular

Se siembran aproximadamente $2.5x10^3$ células (primariaa), $5x10^3$ (inmortalizadas de pase bajo) o $10x10^3$ (inmortalizadas de pase alto) y crecieron en DMEM durante 1, 3, 5 y 7 días. En estos momentos, las células se fijaron y se tiñeron con 0,1% de cristal violeta (Sigma) durante 30 minutos y luego se lavaron con PBS para eliminar el exceso de colorante. El contenido de colorante se cuantificó en un espectrofotómetro. Para determinar la velocidad de incorporación de BrdU, se sembraron 106 células en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina (1ml/portaobjetos) y se mantuvieron durante 24 h. A continuación, las células se serodeprivaron durante 48 h y se administró BrdU (10 mM, Sigma-Aldrich) durante 2,5 h. Las células BrdU+ se detectaron por inmunocitoquímica usando un anticuerpo monoclonal (BD Biosciences, dilución 1:2000). Las imágenes representativas se capturaron con una cámara Olympus DP72 (Olympus Optical Co., Tokio, Japón), y el número de células BrdU+ se cuantificó en 10 campos aleatorios por diapositiva.

3.2.3 Citometría de Flujo

La Citometría de Flujo (CMF) es una técnica de análisis multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de células alineadas por un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el haz de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros y que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medición de los diferentes paramétros.

Las señales de dispersión resultantes de la interacción de la luz con la célula produce un cambio de dirección (no de longitud de onda) en todas las direcciones del espacio. Las características morfológicas que determinan la dispersión de la luz son fundamentalmente el tamaño celular, el núcleo y el material granular del interior de la célula, llamado complejidad. Las dos fracciones de dispersión medidas son: La luz dispersada en ángulo cónico pequeño, que casi coincide con la dirección de la luz incidente, llamada FSC (Forward Scatter). Es una medida proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión. La luz dispersada en ángulo recto llamada SSC (Side Scatter). Es proporcional a la complejidad de la estructura interna de la célula.

El Citómetro genera también señales de fluorescencia utilizando los espectros de absorción y emisión de los diferentes fluorocromos.

En nuestro caso nos interesaban los parámetros relacionados con las características intrínsecas de la célula como su tamaño y la complejidad de su núcleo y citoplasma.

Refiriéndonos a la complejidad, la cuantificación de la actividad proliferativa y de la cinética celular es útil en el estudio de este proceso biológico para estimar el potencial de crecimiento tumoral. En el estudio de ciclo celular por Citometría de Flujo, el parámetro que cuantifica la actividad proliferativa es el porcentaje de células en fase S, así como el porcentaje del resto de fases del ciclo: G0/G1 y G2/M. De este modo podemos obtener información acerca del contenido diploide o aneuploide del ADN de la células estudiadas.

El procedimiento comenzaba por obtener una suspensión de células fijadas en etanol (70%) a las que sometíamos a una tinción con Yoduro de Propidio (IP. 1mg/ml) durante 30 min. El IP es un florocromo que se une al ADN por intercalación entre las bases y cuando esta ligado a los ácidos nucleicos su excitación de fluorescencia máxima es de 535 nm y la de emisión máxima es de 617 nm. A continuación se introducía la suspensión en el Citómetro (Guava de Millipore) y obteníamos la información de nuestra población celular. Este procedimiento se repite a lo largo de los diferentes pases del cultivo celular.

En el caso de querer analizar neuroesferas el procedimiento cambiaba en determinados pasos. Cuando aplicamos tripsina para eliminar la adherencia de las células a la placa establecemos unos tiempos de acción muy cortos, suficientes para conseguir la separación de las células y obtener una suspensión homogénea. En el caso de las neuroesferas los tiempos de tripsinización iban de 5 a 8 min con el fin de disgregarlas. Durante la exposición a la tripsina es necesario facilitar el proceso con homogeneización mecánica con micropipeta. Desde que tripsinizamos, neutralizamos y fijamos con etanol es muy importante no parar de homogeneizar el vial cada cierto tiempo para poder obtener una suspensión lo más homogénea posible. Dejar una o varias neuroesferas mal disgregadas generaría obturar el citómetro. Otro problema con el que nos encontrábamos a la hora que pasar las células provenientes de neuroesferas por el citómetro eran la cantidad de eventos registrados por el

aparato. La cantidad de células que el aparato va a detectar es mucho menor que si partimos de un vial de células en cultivo. Para ello debemos reajustar los parámetros para la medición concreta de las neuroesferas.

3.2.4 Western Blot

Para la extracción de proteínas se empleó el tampón RIPA completado con ortovanadato sódico (10 µl/ml. Sigma), persulfato amónico (PMSF, 10 µl/ml) y el inhibidor de proteasas (40 µl/ml, Complete Mini EDTA-free. Sigma).

El contenido total de proteína se cunatificó por el método de Bradford utilizando el BioRad Protein Assay Kit (BioRad). La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (Biomate3, Thermo Spectronic), ajustando la longitud de onda a 595 nm. La cantidad de proteína se extrapoló de una recta patrón realizada con cantidades crecientes y conocidas de suero de albúmina bovina (BSA. Sigma).

La separación de proteínas por electroforesis se realizó a partir de 60 µg de proteína total de cada muestra, en un gel de poliacrilamida al 12% (acrilamida:bisacrilamida, 29:1), en condiciones reductoras (10% SDS). Para el seguimiento del frente de migración en el gel, añadimos a todas las muestras tampón de carga 5X: 50% glicerol (Sigma), 10% SDS (Sigma), 5% β-mecaptoetanol (Sigma), 0,4M Tris pH 6.8 (Sigma) y 0,5% azul de bromofenol (Merck). Como marcador de pesos moleculares se utilizó el Precision Plus Protein Standards Dual Color (BioRad). La electroforesis se realizó a 40 mA (amperaje constante) durante una hora y media.

Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot Transfer Medium. 0.2 µm. BioRad) por electroblotting a 100 V durante una hora a temperatura ambiente. Una vez finalizada la transferencia, las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y en agitación en solución de bloqueo: 5% de leche en polvo desnatada (Central Lechera Asturiana) disuelta en TBS-T (0,1% Tween 20. Sigma).

Tras el bloqueo, se procedió a la incubación con los anticuerpos primarios seleccionados atendiendo a las especificaciones de cada uno de ellos. Los utilizados en nuestro caso fueron:

- p21 (F-5):sc-6246: ratón, monoclonal, dilución 1:1000 de Santa Cruz Biotechnologies.
- p19ARF (Ab 80): conejo, policlonal, dilución 1:1000 de Abcam.
- Phospo-p53 (Ser15):9284: conejo, policlonal, dilución 1:1000 de Cell Signalling Technology.
- p53 (1C12) Mouse mAb: ratón, policlonal, dilución 1:1000 de Cell Signaling Technology.
- α-tubulina: ratón, monoclonal, dilución 1:5000 de Sigma.

La incubación de cada uno de ellos fue de toda la noche a 4ºC en agitación. Tras los lavados, se procedió a la incubación de las membranas con los anticuerpos secundarios, anti-ratón (dilución 1:1000) o anti-conejo (dilución 1:5000) en función de las características de los primarios. Esta segunda incubación se realizó durante una hora a temperatura ambiente y en agitación. Finalmente, después de repetir los lavados, volvimos a incubar la membrana durante 1 minuto con el sustrato quimioluminiscente (ECL, Thermo Scientific) con el objetivo de la determinación de la unión específica del anticuerpo a nuestra proteína y su detección. Las bandas inmunoreactivas se visualizaron mediante revelado fotográfico sobre películas Hyperfilm^{TM} MP (Amersham Pharmacia Biotech).

Por último se realizó un análisis densitométrico para obtener una semicuantificación de la cantidad de proteína existente en cada banda y así poder establecer diferencias entre las distintas muestras. Para este análisis utilizamos el software informático Image J del NIH.

3.2.5 Estudio del efecto del medio condicionado sobre neuroesferas neonatales

Se denomina medio condicionado al medio que contiene los productos secretados por un cultivo celular en un tiempo dado. Para obtener medio de cultivo condicionado de nuestras células se tenía que retirar el medio de placas confluentes a lo largo de diferentes pases celulares. Se recogían de 5 a 10 ml de medio condicionado que se conservaba en viales Falcon a -20ºC.

Una vez que disponíamos de los viales de medio condicionado necesarios, realizábamos un cultivo de neuroesferas neonatales con el fin de obtener una cantidad elevada de las mismas.

El experimento consistía en exponer a las neuroesferas a estos medios condicionados para ver como se comportaban en función a ciertos parámetros.

Partíamos de dos placas Corning en las que teníamos neuroesferas recién formadas. Las agrupábamos en una placa y las distribuíamos en las 3 placas que centraban nuestro experimento. A continuación, en cada una de estas tres placas depositábamos medio condicionado de tres pases representativos de los tres estados del cultivo: fase pre-senescente, senescente y post-senescente. Concretamente pases 2, 5 y 32.

A partir de este momento, se realizaba el seguimiento de varias neuroesferas por placa a diferentes tiempos, observando en cada uno de ellos el número de neuroesferas presentes en la placa y su morfología. Los tiempos establecidos son 24h, 5, 12 y 19 días.

Establecíamos una cuadrícula con coordenadas del mismo diámetro de nuestras tres placas experimentales. De este modo podíamos nombrar en función a esas coordenadas las diferentes neuroesferas que controlábamos y fotografiábamos a lo largo de los días.

3.2.6 Análisis estadísticos

Evaluación de los datos de senescencia

Para analizar la evolución de los niveles de senescencia del cultivo a lo largo de 20 pases celulares, se realizó un test de Krustal-Wallis para k=20 muestras independientes con corrección para test múltiple, obteniendo un valor $p<0{,}001$. Se aplicó un análisis encajado para testar si existían diferencias significativas entre réplicas o pocillos para un mismo pase y entre campos de un mismo pocillo.

Además de este análisis, se elaboró un curva no lineal paramétrica de la evolución del porcentaje de células senescentes estimada mediante el algoritmo iterativo de Levengerg-Marquardt. Según la representación de los datos, se planteó un ajuste de los mismos a una ecuación no lineal de tipo:

$$Y = x^{(p-1)}(1-x)^{(q-1)}$$

Donde x corresponde al tiempo, en este caso el pase celular. Los parámetros *p* y *q* pueden obtenerse a partir de un modelo de regresión. En este modelo es conocida la forma de dicha función y sólo se desconoce de ella los valores de los parámetro *p* y *q*.

$$\frac{1}{\beta(p,q)} x^{(p-1)}(1-x)^{(q-1)}$$

Este algoritmo ha demostrado ser más robusto que el de Gauss-Newton (GNA), con lo que permite encontrar una solución aunque los parámetros iniciales estén muy alejados del mínimo final. Este algoritmo está implementado en la función nlsLM del paquete minpack.lm de R. Conociendo las estimaciones de *p* y *q* se puede determinar, por ejemplo, cual es el pase donde la proporción de células senescentes es máxima (x=(1-p)/(q-p)).Este mismo algoritmo fue el utilizado para la elaboración de las curvas comparativas de nuestras células y MEF.

Cuantificación y medición de los diferentes grupos de neuroesferas

En los datos de medición de los diámetros de los diferentes grupos de neuroesferas, representábamos el diámetro medio, la desviación estándar y el error estándar. Se agrupaban estos datos en dos grandes grupos: neuroesferas precoces y tardías (independientemente de la formación primaria o secundaria). A estos datos se les aplicó un t-test con la corrección de Welch. Aplicábamos esta corrección pues era la indicada para casos en los que los grupos comparados no tienen el mismo número de datos y las varianzas entre dichos grupos eran ligeramente distintas.

Estudio del efecto del medio condicionado sobre neuroesferas neonatales

Para el análisis de los datos de número de neuroesferas en diferentes medios condicionados a lo largo de los diferentes tiempo se aplicaba un modelo de regresión. Obteníamos tres pendientes, correspondientes a cada uno de los medios condicionados, estableciendo su significación.

Como durante el análisis observamos que cada una de las 3 pendientes eran diferentes, comparamos las pendientes de regresión entre sí para poder determinar si eran significativamente distintas. Esta comparación se realizó por un análisis de la ANOVA.

A pesar de este análisis de los datos obtenidos, finalmente se incluyó en el apartado de resultados una gráfica de barras que representa el número de neuroesferas frente a los diferentes tiempos, con el fin de mostrar los resultados de una manera más simplificada.

Resultados y Discusión

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Generación de cultivos inmortalizados a partir de cultivos primarios de MEA

Como punto de partida para nuestro estudio, utilizamos una adaptación del método previamente descrito para la extracción y el cultivo de astrocitos (Schildge *et al.*, 2013) con el fin de obtener cultivos primarios a partir de cerebro embrionario. Usando este procedimiento o similares, nuestro grupo ha podido obtener cultivos con más del 95% de células positivas para GFAP, con características morfológicas de astrocitos primarios tanto en ratones neonatales como fetales, así como en ratas adultas, neonatales y fetales (Barca *et al*., 2007; Barca *et al.*, 2008; Seoane *et al*., 2008; Rios *et al*, 2013; Barca *et al*., 2013; Seonae *et al*., 2017). En función de estos resultados, hemos definido los cultivos celulares obtenidos de cerebros de 13.5 dpc como MEA (*mouse embryo astrocytes*, astrocitos embrionarios de ratón), buscando un paralelismo con el término MEF (*mouse embryo fibroblasts*, fibroblastos embrionarios de ratón), obtenidos también a partir de embriones de 13.5 dpc. Sin embargo, es importante tener en cuenta que, en ninguno de los dos casos está totalmente claro a partir de qué tipo de células se originan los cultivos. En el caso de los MEF, ni siquiera se conoce el tejido del que se originan ya que se utilizan embriones completos (excepto la cabeza y los órganos hematopoyéticos abdominales). El origen celular está más definido en el caso de los MEA, ya que los cultivos se generan a partir de tejido encefálico, y se utilizan métodos de cultivo diseñados para favorecer el aislamiento y la proliferación de astrocitos, dentro de los distintos tipos celulares del SNC. En cualquier caso, no se puede descartar (tal y como constataremos más adelante) la presencia de otros tipos celulares, entre los que se encontrarían células madre y/o progenitoras.

Los datos existentes en la literatura muestran que, cuando se siembran a densidades apropiadas, los MEF proliferan vigorosamente durante varios pases, y luego su velocidad de crecimiento disminuye significativamente debido a la presencia de un gran número de células senescentes (Todaro & Green, 1963; Campisi, 1997). De forma similar, los niveles de senescencia en MEA son muy bajos durante los primeros pases celulares del cultivo (alrededor del 0,1 % de las células de la placa presentan fenotipo senescente). La evolución del proceso puede ajustarse a un modelo matemático de regresión no lineal paramétrica, en el que la estimación de los parámetros p y q se realiza mediante el algoritmo iterativo de Levenberg-Marquardt (Figuras 21A y 21B). A partir del cuarto pase los niveles se incrementan de forma significativa hasta alcanzar valores en torno al 40%, alcanzándose el máximo de senescencia entre los pases 5 y 6, donde más del 60 % de las células son senescentes, llegándose a valores próximos al 90% en algunos casos. Los MEA senescentes muestran el fenotipo característico de la senescencia que incluye la presencia de un citoplasma grande y aplanado, junto con un aumento de la actividad de la enzima β-galactosidasa lisosomal que confiere a las células senescentes un característico color azulado en presencia de X-gal (Figura 21C). Estos resultados son similares a los obtenidos en los cultivos de MEF, aunque éstos presentan unos niveles elevados de senescencia de forma más precoz (en pase 2 ya existen niveles de senescencia de entorno al 20%), alcanzando el máximo en el pase 4, con algo más de un 25% de células senescentes. Al igual que los MEA, los MEF senescentes mostraron todas las características fenotípicas del proceso, incluyendo los cambios morfológicos y el aumento de la actividad de la β-galactosidasa lisosomal (Figura 22).

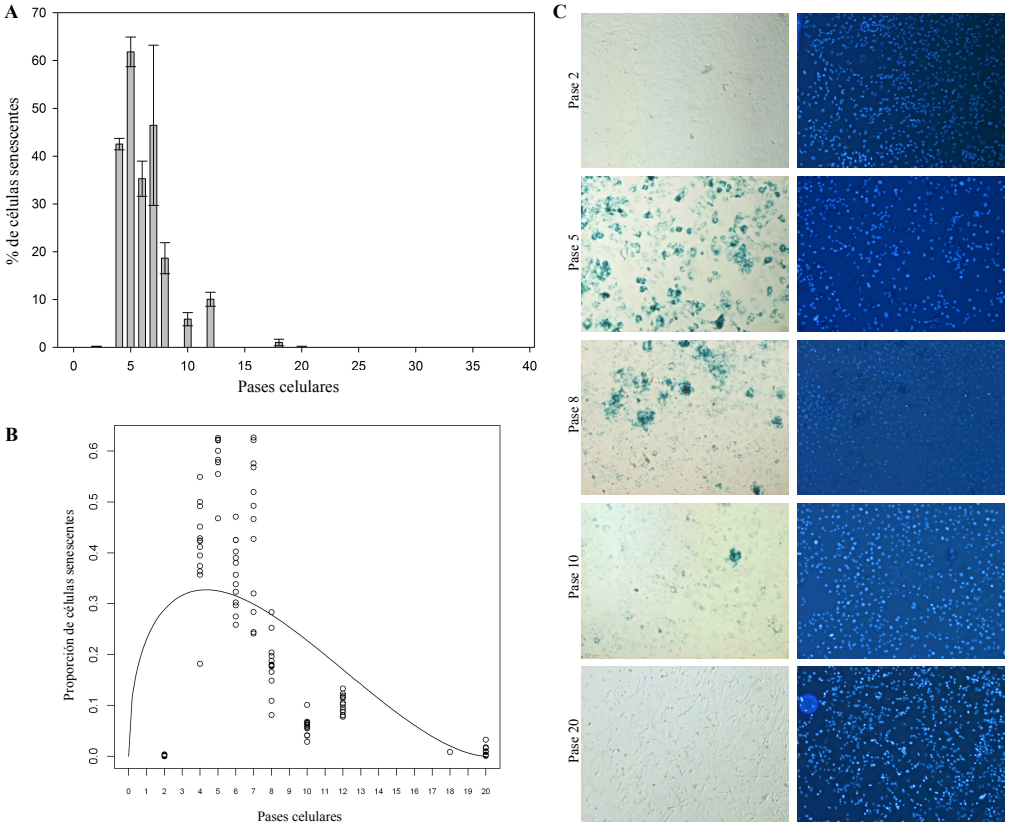

Figura 21. A: Evolución de los niveles de senescencia del cultivo de MEA a lo largo de 20 pases celulares. Se observa un incremento significativo ($p<0.01$) de la senescencia a partir del pase 4, alcanzando valores máximos a pase 5-6 para luego descender hasta niveles pre-senescentes normales en pase 20 y posteriores. B: Curva no lineal paramétrica de la evolución del porcentaje de células senescentes estimada mediante el algoritmo iterativo de Levenberg-Marquardt. C: Imágenes representativas de los resultados mostrados en el panel A. Columna izquierda: fotografías con luz visible 4X. Columna derecha: fotografías con luz UV tras marcaje con bisbenzamida 4X.

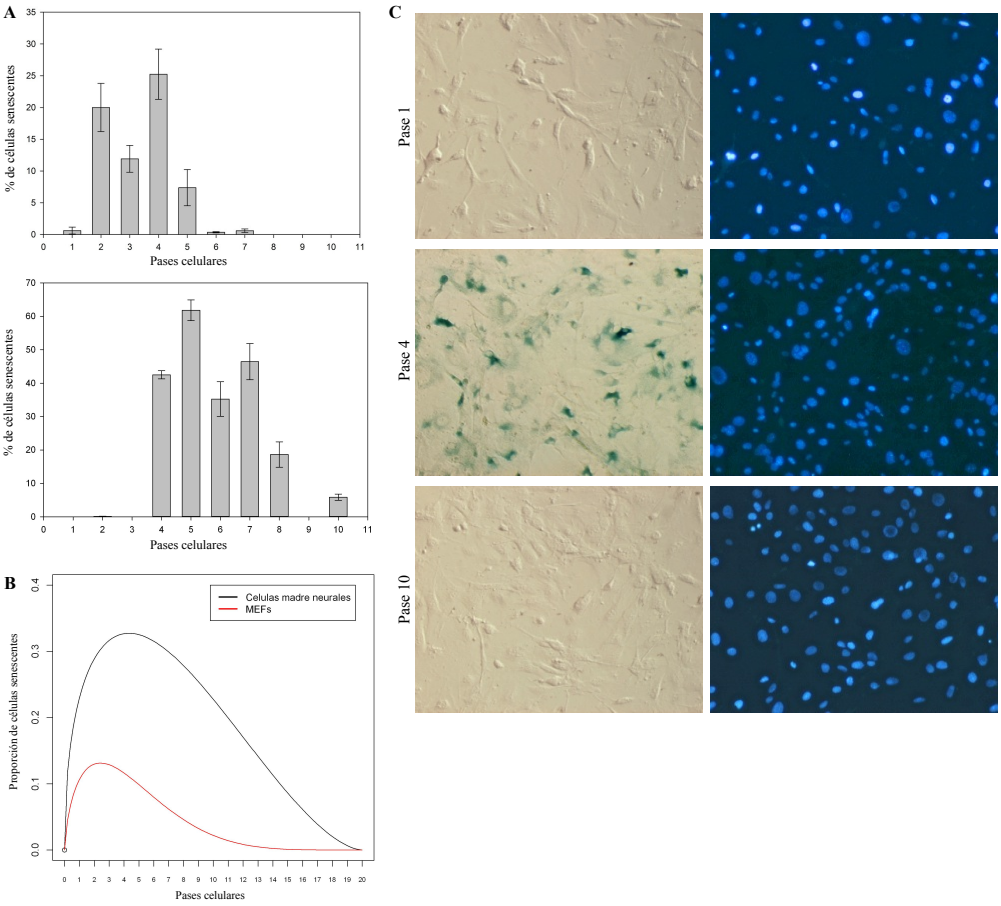

Figura 22. A: Evolución de los niveles de senescencia a lo largo de 10 pases celulares en MEF (superior) y MEA (inferior). B: Curvas no lineales paramétricas de la evolución del porcentaje de células senescentes hasta el pase 10 para MEA (negro) así como para MEF (rojo), estimadas ambas mediante el algoritmo iterativo de Levenberg-Marquardt. C: Imágenes representativas de los resultados mostrados en el panel A para MEF. Columna izquierda: fotografías con luz visible 10X. Columna derecha: fotografías con luz UV tras marcaje con bisbenzamida 10X.

A partir del momento en el que los MEA alcanzan sus niveles máximos de senescencia, entramos en una fase de transición en la que los valores van a fluctuar, pero siguen una tendencia de disminución clara. Entre el pase 12 y el 18, los niveles de células senescentes descienden drásticamente desde un 10% a un 1%, alcanzando niveles muy próximos a cero en torno al pase 20. En el caso de los MEF, la evolución es también similar, aunque se produce de forma más rápida, ya que el porcentaje de células senescentes está en valores en torno al 7% en el pase 5, y ya no se detectan células senescentes al llegar al pase 10 (Figura 22). Mediante la aplicación del algoritmo de Levenberg-Marquardt es posible determinar el pase donde la proporción de células senescentes es máxima ($x=(1-p)/(q-p)$), que sería el pase 6,8 en el caso de los MEA y el pase 2,86 en los MEF. Dado que, en cada experimento, tanto MEA como MEF procedían de los mismos embriones y teniendo en cuenta que el protocolo de cultivo fue idéntico para ambos tipos de células, esta diferencia en la cinética de entrada en la senescencia y en el escape de ella, podría deberse a diferencias en la tasa de crecimiento entre MEA y MEF, lo que condiciona un número diferente de duplicaciones entre pases. De hecho, cuando el proceso de inmortalización se aplica siguiendo el protocolo 3T3 tal y como lo definió Todaro (1963), siguen existiendo diferencias en relación con el pase en el que se alcanza el máximo porcentaje de células senescentes, aunque, en este caso, el pico de máxima senescencia se produce antes en los MEA (pase 5 en el caso de los MEA y pases 6-7 en el caso de los MEF) (Figura 23). Dado que también en este caso se trata de células procedentes de los mismos embriones y cultivadas en las mismas condiciones, la causa más probable de las diferencias observadas es también la mayor velocidad de duplicación que existe en MEF.

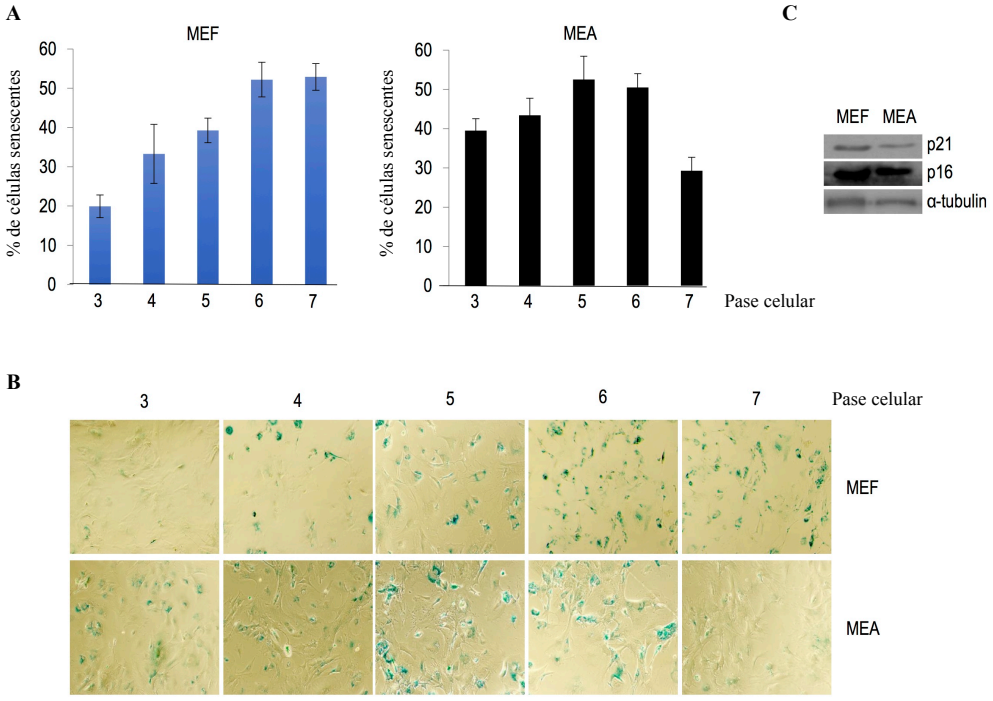

Figura 23. A: Evolución de los niveles de senescencia a lo largo de 7 pases celulares para MEF (izquierda) y MEA (derecha) siguiendo el protocolo 3T3. B: Imágenes representativas de los resultados mostrados en el panel A. C: Western blot en el momento de máxima senescencia (Anexo).

La capacidad de los MEF de superar el período de "crisis" mediante la realización de pases continuos había sido ya comunicada en la literatura (Rizzo *et al*., 2011), recuperando, las células capaces de evadir la senescencia, su crecimiento normal. En el caso de los MEA, esta es la primera demostración de la existencia de capacidad de evadir la senescencia por parte de este tipo de células. Además, a diferencia de los MEF, en los que la aparición de células capaces de evadir la senescencia replicativa y con un potencial de crecimiento, en teoría, ilimitado, es un hecho relativamente poco habitual, todos los cultivos primarios de MEA en los que

se llevó a cabo el proceso fueron capaces de evadir la senescencia y, por tanto, de generar líneas de células inmortales. En concreto, el proceso de inmortalización se realizó al menos tres veces con cada protocolo (el 3T3 y el CTC) y, en todos los casos, se generaron cultivos celulares inmortalizados, entendiendo como tales aquellos capaces de mantenerse durante varios meses, además de haberse realizado numerosos experimentos en los que se demostró la capacidad de los cultivos primarios de MEA de superar la crisis de la senescencia replicativa, que no fueron mantenidos a largo plazo por razones prácticas. Todas las células inmortalizadas han crecido ininterrumpidamente durante varios meses, con un máximo de 140 pases completados durante más de un año de cultivo continuo de uno de los casos, y no se detectaron signos de senescencia o apoptosis en ningún momento durante estos periodos prolongados de cultivo.

En el caso de los MEF, se ha descrito que la senescencia se asocia con un aumento en la expresión de p21, mientras que el cambio de MEF primarios a inmortalizados se asocia con una disminución de los niveles de expresión de dicha proteína. Esta disminución en los niveles de p21 podría reflejar un daño espontáneo en la vía de p53, que sería el responsable de la aparición de una población de células inmortalizadas con potencial de crecimiento ilimitado (Harvey & Levine, 1991; Kamijo *et al*., 1997; Roussel, 2002). De acuerdo con esos estudios, el aumento del número de células senescentes se acompañó de un incremento de la expresión de p21 en MEF, que disminuyó una vez superada la fase de "crisis" de la senescencia replicativa. De forma similar, los niveles de p21 se incrementaron también en MEA senescentes, pero, sorprendentemente, permanecieron elevados en células postsenescentes (Figura 24) lo que sugiere que, a diferencia de lo que ocurre en MEF, la actividad transcripcional de p53 sigue presente en los MEA inmortalizados. En este sentido, es importante tener en cuenta que, también en contraste con los resultados obtenidos en MEF, se observaron niveles aumentados de p53 y fosfo-p53 en las células inmortalizadas derivadas de MEA primarios (Figura 24), probablemente como consecuencia del aumento de la expresión de $p19^{ARF}$ que se observa en estas células. Estas diferencias pueden reflejar la

existencia de diferentes mecanismos implicados en la regulación de la respuesta celular a la senescencia replicativa entre MEF y MEA, una circunstancia similar a la descrita previamente por nuestro grupo en respuesta a la senescencia inducida por estrés oncogénico (Seoane *et al.*, 2017). En dicho estudio se pudo comprobar que cuando se induce un daño al DNA mediante la activación de oncogenes, tanto en los MEF como los MEA se produce una activación de la denominada respuesta al daño al DNA (*DNA damage response*, DDR). Sin embargo, a pesar de que la activación de la respuesta que se produce es muy similar en ambos casos, la respuesta biológica es diferente. En concreto, los MEA son resistentes a la senescencia inducida por la activación de Ras, pese a que se produce una acumulación de p53, fosfo-p53 y p21 como respuesta a la activación del daño al DNA que se produce. El hecho de que los resultados obtenidos en el presente estudio sean similares sugiere que la relación establecida entre la activación de p53 (tanto por estrés replicativo como por estrés oncogénico) y la entrada en senescencia puede ser más un efecto específico de MEF que un evento universal, tal y como se asume en la actualidad (Figura 25).

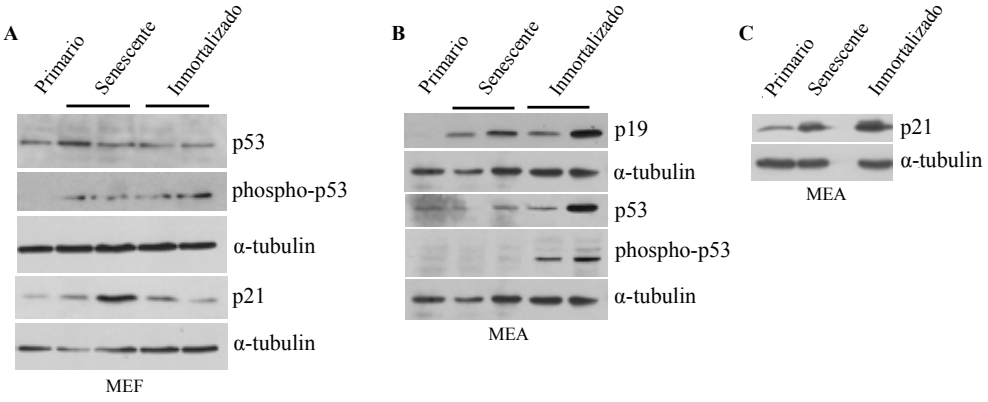

Figura 24. A: Niveles celulares de p53, fosfo-p53 y p21 en MEF primarios, senescentes e inmortalizados. **B:** Niveles celulares de p53 y fosfo-p53 en MEA primarios, senescentes e inmortalizados. C: Niveles celulares de p21 en MEA primarios, senescentes e inmortalizados. Se utilizó α-tubulina como control en todos los casos.

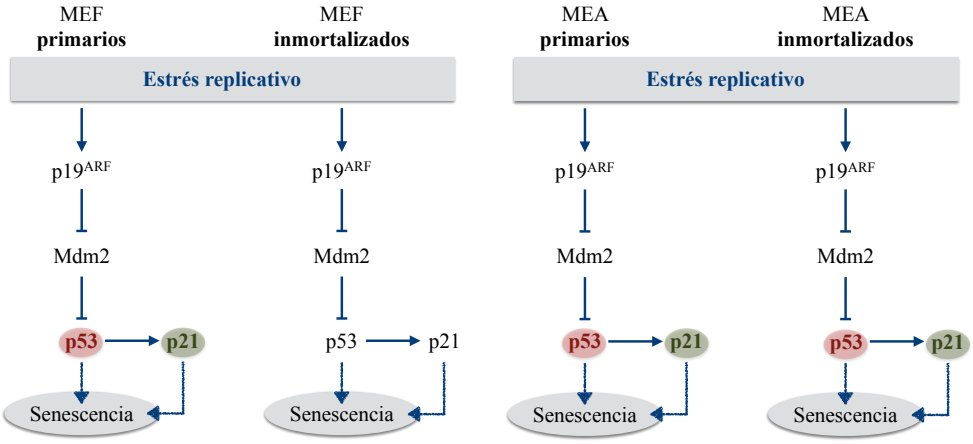

Figura 25. Papel de p53 en el proceso de inmortalización de MEF y MEA. Mientras que en MEF es necesaria la inactivación de p53 para que se produzca la inmortalización, los MEA son capaces de inmortalizarse en presencia de p53 activo.

4.2. Caracterización de las células inmortalizadas

Los datos existentes en la literatura muestran que los MEF inmortalizados pueden diferenciarse en linajes adipogénicos, condrogénicos y osteogénicos que expresan marcadores de diferenciación típicos (Sabatini *et al.*, 2005; Lorenz *et al.*, 2008; Blasi *et al.*, 2011). Por lo tanto, como primer paso para caracterizar la naturaleza de las células inmortalizadas a partir de cultivos primarios de MEA, decidimos estudiar la expresión de diferentes marcadores neurales en esas células. De acuerdo con resultados previos de nuestro grupo (Seoane *et al.*, 2017), los cultivos primarios de MEA obtenidos de embriones de ratón de 13,5 dpc mostraron tinción intensa con GFAP (Figura 26), mientras que vimentina, una proteína de filamento intermedio tipo III que es un componente citoesquelético principal de MEF no fue detectada (datos no mostrados). Además, los MEA primarios también expresan SOX2, un miembro de la familia de factores de transcripción SoxB1 que se está presente en poblaciones de progenitores neurales durante el desarrollo y es necesario para mantener un estado

progenitor neural (Zhang y Cui, 2014). Por el contrario, tanto la expresión de NeuN como la de MBP fueron apenas detectables en estas células (Figura 26). En contraste con los resultados obtenidos en MEA primarios, todos los marcadores celulares se detectaron en células inmortalizadas (Figura 26). Este resultado está en consonancia con nuestros hallazgos previos (Almengló et al, 2017) y es probable que refleje el hecho de que el proceso de inmortalización está favoreciendo la presencia de células menos diferenciadas con características propias de células progenitoras o de células madre.

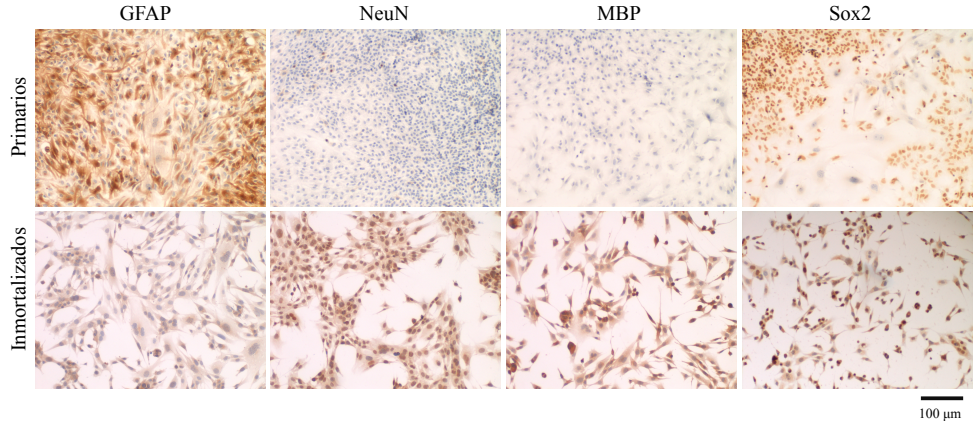

Figura 26. Expresión de marcadores neurales en MEA primarios e inmortalizados. Los MEA primarios e inmortalizados fueron marcados con anticuerpos para GFAP, NeuN, MBP y Sox2. Las células primarias muestras una fuerte inmunoreactividad a GFAP y Sox2 mientras que los marcajes para NeuN y MBP fueron prácticamente nulos. Por el contrario, todos los marcadores fueron detectados en las células inmortalizadas (Anexo).

Dado que una característica definitoria de las NSC es su capacidad para formar neuroesferas en cultivo, nuestro siguiente paso fue cultivar las células inmortalizadas en un medio semisintético que contiene tanto EGF como FGF que, según se ha descrito, es capaz inducir la formación de neuroesferas en un NSA (Azari *et al.*, 2010; Azari *et al.*, 2001). En estas condiciones experimentales, pudimos inducir la formación de neuroesferas

en todas las líneas celulares inmortales generadas. La formación de neuroesferas ocurrió de forma rápida, dentro de las primeras 24h. Las neuroesferas presentaban inicialmente una forma esférica brillante, aunque algo irregular y no totalmente compactada, que con el tiempo aumentaba de tamaño, mostrando una forma más esférica, siendo característica la presencia de microespinas (cilios) en la periferia (Figura 27B). Estas neurosferas de aparición precoz se forman principalmente como consecuencia de la agregación de células en suspensión, que no llegan a adherirse a la placa de cultivo. Sin embargo, si los cultivos se mantienen durante suficiente tiempo, se observa que, al cabo de unos 5-7 días, se produce una segunda oleada de formación de neuroesferas que, en este caso, es consecuencia, principalmente, del despegue de células adheridas a la placa de cultivo (Figura 27D y 27E). Estas neuroesferas tardías son similares a las precoces en cuanto a su morfología, pero presentan diferencias en el tamaño y en número de neuroesferas formadas siendo de mayor tamaño pero menos abundantes en el caso de las precoces (Tabla 1). Este proceso de formación de neuroesferas tardías no había sido previamente descrito en el NSA y, de hecho, el periodo de 5-7 días está ya al límite de la capacidad de supervivencia de las células primarias a partir de las cuales se originan, habitualmente, las neuroesferas. Por ese motivo, consideramos que la formación de las neuroesferas tardías es una característica distintiva de las células inmortalizadas. En cualquier caso, aparte de las diferencias mencionadas en número y tamaño, que pueden ser, simplemente, consecuencia de la existencia de menos células de partida, no hemos encontrado diferencias significativas en el comportamiento de las neuroesferas precoces y las neuroesferas tardías.

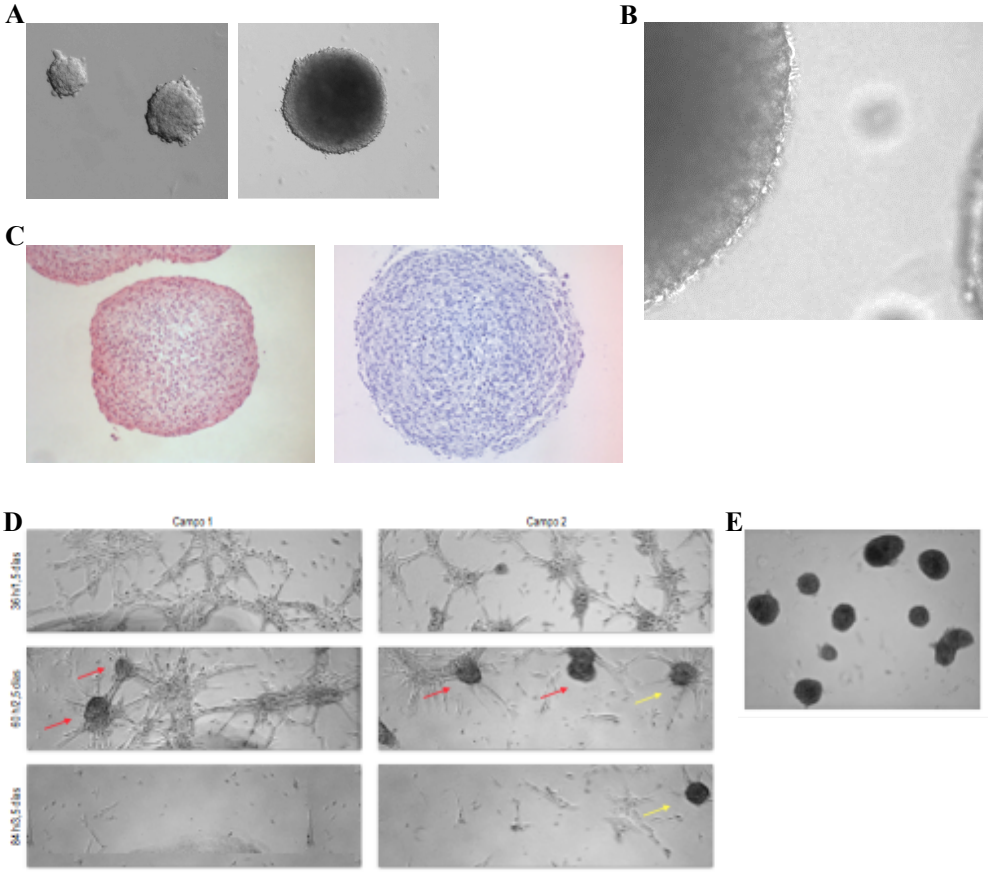

Figura 27. Formación de neuroesferas a partir de MEA inmortalizados. A: Neuroesferas precoces (N2P). Primera fotografía a 40X, segunda a 20X. B: Detalle de microespinas de una neuroesfera precoz. 63X. C: Tinción con Hematoxilina-Eosina de N2P incluídas en parafina y cortadas en secciones de 3 micras. 20X. D: Formación de neurosferas tardías (N2T) de células post-senescentes. Con flechas rojas aparecen marcadas las N2T observadas dentro del campo que perdieron su adherencia y pasaron a estar en suspensión. Con flechas amarillas, las N2T que permanecen adheridas a la superficie de la placa. E: Fotografía de neuroesferas tardías en suspensión. 4X.

Tabla 1. Características de los diferentes tipo de neuroesferas generados. Los datos se muestran como media ± SEM. p< 0.01 precoces vs. tardías.

GRUPO	Número	Diámetro medio (mm)
N2P	5	0.39 ± 0.36
N2T	17	0.41 ± 0.23
N2P.F2.N2P	6	0.36 ± 0.31
N2P.F2.N2T	25	0.29 ± 0.28
N2T.F2.N2P	7	0.37 ± 0.35
N2T.F2.N2T	13	0.23 ± 0.22

N2P: Neuroesferas precoces. N2T: Neuroesferas tardías. N2P.F2.N2P: Formación secundaria de neuroesferas precoces a partir de precoces. N2P.F2.N2T: Formación secundaria de neuroesferas tardía a partir de precoces. N2T.F2.N2P: Formación secundaria de neuroesferas precoces a partir de tardías. N2T.F2.N2T: Formación secundaria de neuroesferas tardías a partir de tardías (ver materiales y métodos).

En ambos casos, cuando las neuroesferas se colocaron de nuevo en DMEM, comenzaron a adherirse a la placa y recuperaron el crecimiento en monocapa (Figura 28) que, como indicamos anteriormente, puede, *a priori*, mantenerse durante un período de tiempo ilimitado. Este proceso puede repetirse indefinidamente ya que la formación de neuroesferas puede inducirse colocando nuevamente células monocapa en medio semisintético con EGF y FGF, y estas neuroesferas pueden dar lugar a células en monocapa inmortalizadas después de la retirada de EGF y FGF (Figura 29). Sorprendentemente, no se observaron signos de senescencia celular o apoptosis en ningún momento en ninguno de estos subconjuntos de poblaciones celulares. Al igual que ocurría en las neuroesferas de formación primaria, estas neuroesferas secundarias pueden dar origen tanto a neuroesferas precoces como tardías que, también en este caso, son de menor tamaño y más abundantes. Los cultivos en monocapa obtenidos a partir de neuroesferas retuvieron consistentemente la expresión de marcadores

celulares de todos los linajes neurales aunque, curiosamente, la expresión de GFAP se redujo visiblemente (Figura 30).

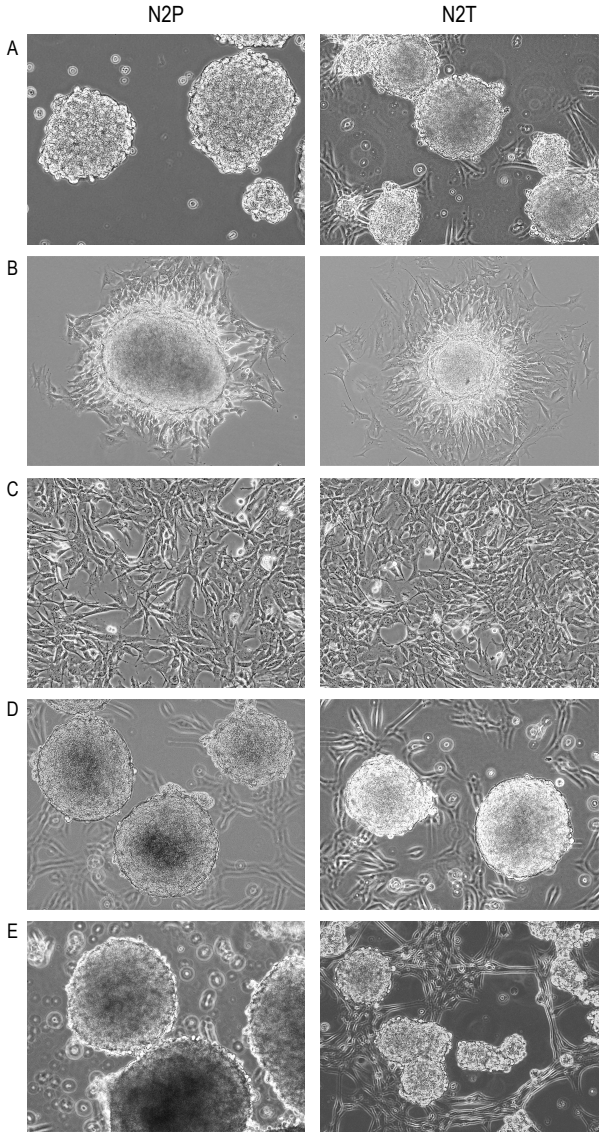

Figura 28. Neuroesferas precoces (Columna izquierda) y tardías (Columna derecha) procedentes de MEA inmortalizados. Fotografías a 10X. Fila A: Neuroesferas a 24h en medio con factores. Fila B: Neuroesferas tras 24h en DMEM completo. Fila C: Cultivo en monocapa de neuroesferas precoces y tardías. Fila D: Formación secundaria de N2P. Fila E: Formación secundaria de N2T (ver materiales y métodos).

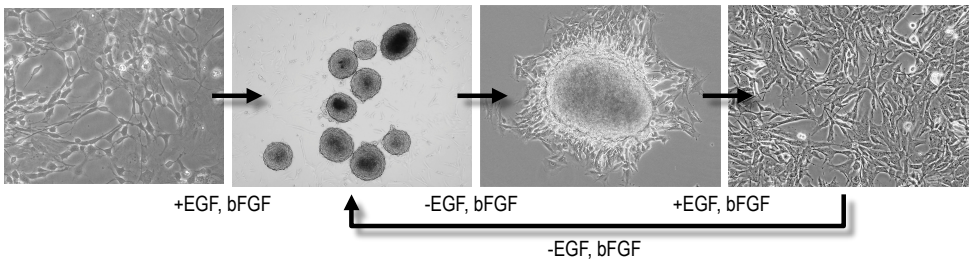

Figura 29. Representación esquemática de los ciclos de formación de neuroesferas y de cultivos en monocapa

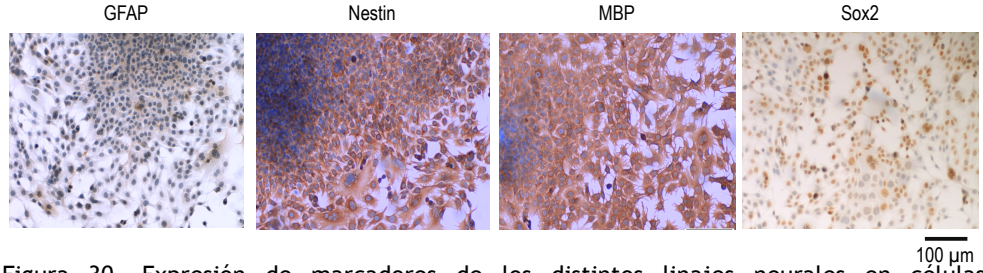

Figura 30. Expresión de marcadores de los distintos linajes neurales en células inmortalizadas (Anexo).

En conjunto, estos hallazgos sugieren que hemos generado una población de células inmortalizadas que muestran las características definitorias de las células multipotentes. Sin embargo, una de las principales características de las neuroesferas es el hecho de que contienen células madres, junto con células progenitoras con un mayor grado de diferenciación. Aunque los estudios realizados no permiten distinguir que porcentaje de células son células madre en sentido estricto, sí nos permiten afirmar que un importante número de células conservan su capacidad de autorrenovación durante un período prolongado, junto con la capacidad de generar células que expresan marcadores característicos de todos los linajes neurales. En este sentido, es importante señalar que cuando la generación de neuroesferas se lleva a cabo a partir de MEA primarios, no de células

inmortalizadas, los resultados obtenidos son diferentes. Como se muestra en la Figura 29, el cultivo de MEA primarios en medio semisintético que contiene tanto EGF como bFGF da como resultado la formación de neuroesferas, con características similares a las indicadas anteriormente, incluida la capacidad de dar lugar a células capaces de crecer en monocapa cuando se colocan en DMEM. Sin embargo, en contraste con los resultados obtenidos con neuroesferas formadas a partir de células inmortalizadas, un número significativo de células en monocapa formadas a partir de neuroesferas primarias entran en senescencia después de tan solo dos pases, observándose el número máximo de células senescentes después de 4 pases (Figura 31). Tanto el número de células senescentes como el número de pases necesarios para entrar en senescencia son similares a lo observado durante el proceso de inmortalización de los MEA primarios, así como a las características descritas para las neuroesferas primarias por otros autores (Azari *et al.*, 2011; Reynolds & Rietze, 2005). Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que las neuroesferas originadas a partir de células inmortalizadas muestran características diferentes de las originadas a partir de células primarias, que podrían reflejar la existencia de una población más homogénea de NSC en el primero de los casos. En este sentido, es también importante mencionar que, como ocurre con los MEA primarios, algunas de las células que crecen a partir de neuroesferas primarias son capaces de superar la senescencia, de forma que el número de células senescentes disminuye de forma significativa después de 12 pases, no encontrándose casi ninguna célula senescente a partir del pase 14. Cuando en lugar de realizar el protocolo 3T3, las células procedentes de las neuroesferas primarias son sometidas a un protocolo CTC, los resultados obtenidos son similares, observándose, en este caso, una disminución del porcentaje de células senescentes a partir del pase 5. En conjunto, estos resultados refuerzan la posibilidad de que las neuroesferas primarias contienen células con potencial de crecimiento ilimitado, junto con células más comprometidas con capacidad de crecimiento limitada; mientras que las neuroesferas generadas a partir de células inmortalidas están formadas, en su gran mayoría por células con capacidad de crecimiento ilimitado.

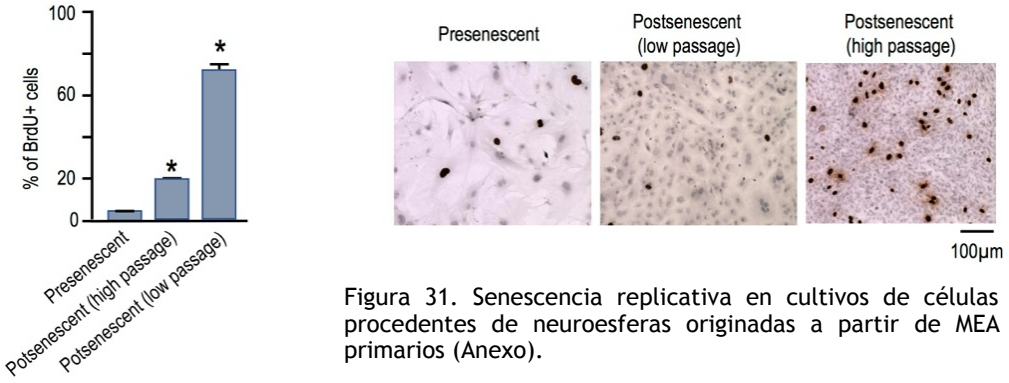

Figura 31. Senescencia replicativa en cultivos de células procedentes de neuroesferas originadas a partir de MEA primarios (Anexo).

Otro de los aspectos básicos en el mantenimiento del carácter multipotencial de las células madre es la existencia de un microambiente específico que está determinado por una serie de factores producidos tanto por las propias células madre, como por otras células que forman parte del nicho en el que se asientan las células madre. Por tanto, para analizar si las células inmortalizadas eran capaces de producir y liberar al medio factores capaces de favorecer el mantenimiento de las neuroesferas, decidimos comparar el efecto del medio condicionado obtenido a partir de células primarias (presenescentes), senescentes o inmortalizadas postsenescentes sobre el desarrollo y la viabilidad de neuroesferas ya formadas. Al igual que ocurría al colocar las células en DMEM, el cambio de medio semisintético a medio condicionado indujo la adherencia de las neuroesferas a la placa. El análisis cuantitativo del número de neuroesferas viables en cada uno de los tiempos, reveló una disminución significativa ($p<0.05$) del número de neuroesferas. A los 5 días de tratamiento, en las placas que contenían medio condicionado procedente de células en pre-senescentes o de células senescentes, en comparación con las células cultivadas en medio de células inmortalizadas (Figura 32A). Además, tanto las neuroesferas que se encuentran expuestas a medio condicionado de células primarias como de células inmortalizadas mantienen en gran parte su disposición y perímetro de densidad celular con unos *carpet* bien definidos y con abundantes células. No ocurre así en neuroesferas expuestas a medio condicionado

procedente de células senescentes, cuyos límites se desdibujan rápidamente y pasan a formar un continuo entre neuroesfera y *carpet* que, en estos casos, aparece también con un perímetro más difuso. La densidad celular en estos *carpets* es también mucho menor y su expansión no lleva a abarcar la superficie que vemos en los otros dos grupos (Figura 32B).

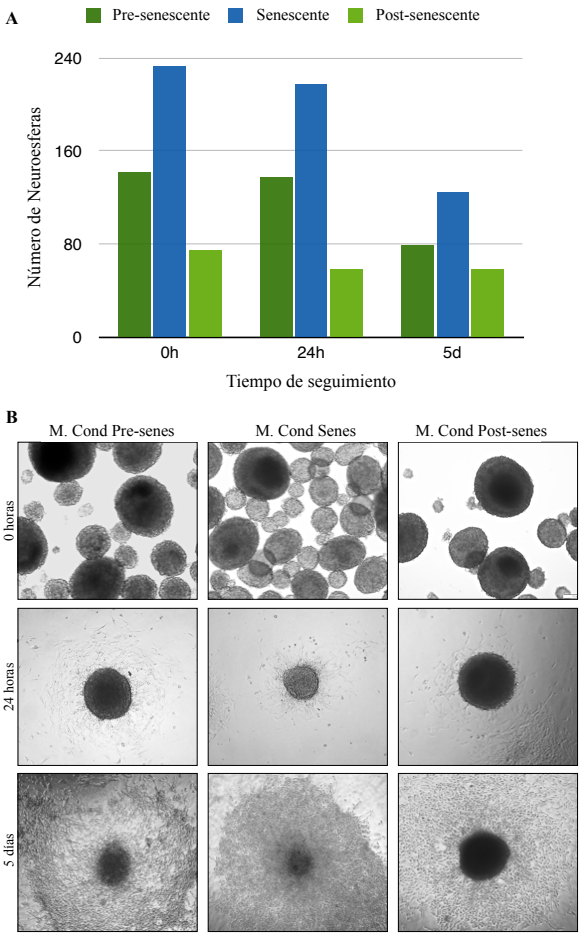

Figura 32. A: Efecto de los medios condicionados procedentes de células pre-senescentes, senescentes y post-senescentes sobre la formación de neuroesferas. B: Características morfológicas de las neuroesferas expuestas a los diferentes medios condicionados. 40X.

Una vez generada la línea de células inmortalizadas, nuestro siguiente objetivo fue analizar su destino a largo plazo. En el caso de otros tipos de células inmortalizadas con los protocolos 3T3 tales como MEFs (Todaro y Green, 1963) o células de Schwann (Mathon *et al*., 2001) se ha descrito que mantienen una velocidad proliferativa constante en cultivo. Sin embargo, en nuestro caso, empezamos a observar que, a medida que aumentaban los pases realizados, disminuía el tiempo necesario para alcanzar la confluencia. Además, aunque existían diferencias dependiendo del cultivo, en la mayoría de los casos se observaba un cambio en la cinética de crecimiento alrededor de los 30 pases. Aunque el estudio de los efectos del mantenimiento a largo plazo de las líneas celulares está fuera de los objetivos del presente estudio, es importante discutir algunos de los principales cambios observados. Dado que, como mencionamos anteriormente, se producía un cambio "brusco" en torno al pase 30, decidimos dividir los cultivos en tres grupos: pre-senescentes, post-senescentes (inmortalizados) de pases bajos y postsenescentes (inmortalizados) de pases altos. Se consideraron como de pases bajos los cultivos con menos de 30 pases, generalmente entre 20 y 25, mientras que se consideraron como células inmortalizadas de pase alto las de cultivos con más de 30 pases, generalmente entre 80 y 100 pases.

Como puede observarse en la figura 33, la velocidad de proliferación aumenta significativamente en células inmortalizadas de pase bajo en comparación con células presenescentes, pero su velocidad de crecimiento es significativamente menor que en células inmortalizadas de pase alto. La existencia de una tasa proliferativa más alta en células de pase alto se observa también cuando se compara la cantidad de BrdU incorporada (Figura 33).

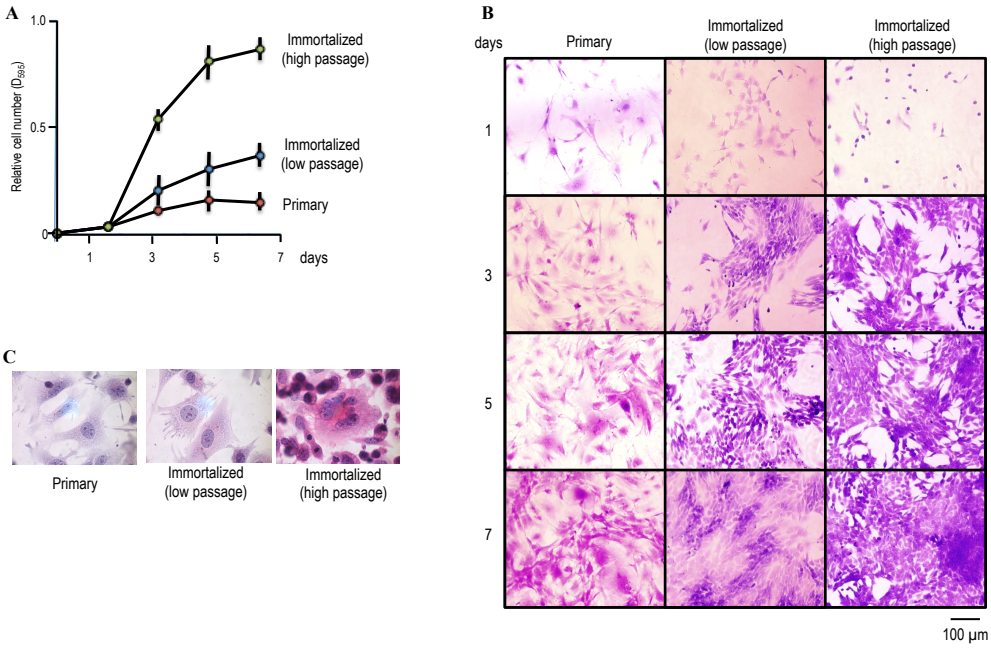

Figura 33. A: Efecto del número de pases sobre la proliferación de células inmortalizadas. B: Imágenes representativas del panel A.C: Efecto del número de pases sobre la morfología de células inmortalizadas (Anexo).

Además, es también importante señalar que, mientras que tanto las células presenescentes como las inmortalizadas presentan una morfología similar, las células de pase alto presentan un diferente fenotipo morfológico, siendo habitual encontrar células multinucleadas de gran tamaño (Figura 33C). En general, estos cambios en el aspecto celular se asemejan a los observados en los MEA primarios en respuesta a la activación oncogénica (Seonae et al, 2017), y sugieren la existencia de daño celular. De hecho, el análisis del contenido en DNA mediante citometría de flujo reveló un importante incremento del número de células con contenido superior a 2n en cultivos de pase alto, comparados con los cultivos de células senescentes o de células inmortalizadas de pase bajo. En concreto, a medida que avanzamos en los pases celulares, observamos que, manteniendose el primer pico (es decir,

el número de células diploides que se encuentran en fase G0/G1), el segundo comienza a extenderse a valores superiores de fluorescencia. Además, la morfología de este segundo pico se desdibuja con numerosas irregularidades. Todo esto hace pensar en una pérdida de la dotación cromosómica tetraploide estricta en fases G2/M (Figura 34).

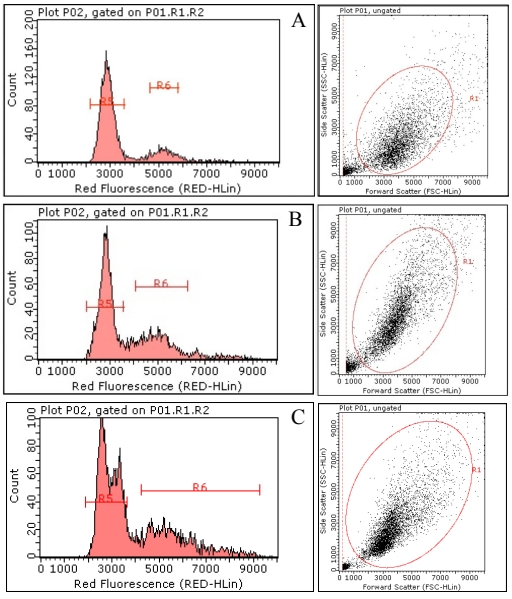

Figura 34. Citometría de flujo en células pre-senescentes, inmortalizadas de pase bajo e inmortalizadas de pase bajo. Gráfica de ciclo (izquierda) y población (derecha). Se realizaron controles de población sin IP así como controles de sobretinción con IP overnight.

En conjunto, estos datos sugieren que, a diferencia de lo que ocurre en otros tipos celulares, el crecimiento a largo plazo de los cultivos inmortalizados a partir de MEA da lugar a un proceso de transformación.

En resumen, en este estudio, describimos la generación de una línea celular con características de NSC que puede proporcionar una fuente constante y renovable de precursores indiferenciados del SNC. El aislamiento de NSCs del tejido cerebral embrionario del día 14 en ratón ha sido descrito previamente por Azari *et al.* (2011) mediante el uso del NSA. Aunque las neuroesferas generadas con este método contienen tanto NSC *bona fide* como progenitores más comprometidos, pueden someterse a pases celulares para expandir el número de NSC disponibles. Sin embargo, estas neuroesferas primarias no pueden mantenerse durante períodos prolongados (Azari *et al.*, 2011; Reynolds & Rietze, 2005), ni siquiera cuando se usan métodos de aislamiento más selectivos, como el ensayo de células formadoras de colonias neurales. Por el contrario, las líneas celulares aisladas en el presente estudio pueden cultivarse indefinidamente y, dependiendo de las condiciones de crecimiento, pueden utilizarse para formar neuroesferas o diferenciarse a células que expresan marcadores característicos de todos los linajes neurales. Estas células cumplen las características de las células multipotentes: la capacidad de proliferar durante un período de tiempo prolongado y de diferenciarse en los tipos celulares primarios del tejido del que se obtienen (Potten, 1990, Gage, 2000). En conjunto, estos resultados sugieren que hemos generado una línea celular que muestra características de auténticas NSC.

Además de proporcionar un modelo novedoso para estudios de neuroregeneración, esta línea celular también se puede utilizar para investigar los mecanismos que subyacen a la senescencia replicativa. De hecho, cuando los MEF cultivados se someten a un protocolo 3T3, las células inmortales surgen a baja frecuencia, dando lugar a líneas celulares 3T3 establecidas, mientras que hemos descubierto que los MEA explantados sometidos a protocolos de cultivo similares dan lugar a células finalmente inmortales. Aunque la caracterización precisa de los mecanismos moleculares responsables de la capacidad de superar la senescencia en MEA primarios está más allá del propósito de este trabajo, hemos encontrado que MEA inmortalizados retienen o mantienen la actividad de p53 (como lo demuestra el aumento en los niveles de p21), en desacuerdo con MEF inmortalizados en los que la mutación de p53 es imprescindible para escapar

de la senescencia replicativa. Curiosamente, las células de Schwann también se pueden expandir indefinidamente en cultivo, manteniendo los puntos de control (normalmente perdidos) durante el proceso de inmortalización (Mathon *et al*., 2001). Además, hemos encontrado que los MEA primarios también muestran diferencias significativas en la senescencia inducida oncogenicamente en comparación con MEF primarios (Seoane *et al*., 2017), lo que sugiere que los mecanismos que regulan la respuesta de senescencia pueden diferir dependiendo del tipo de célula, es decir, entre las células epiteliales y mesenquimales. A este respecto, también es interesante observar que, a medida que aumenta el número de replicaciones, las células inmortalizadas muestran modificaciones fenotípicas importantes que incluyen una tasa proliferativa más alta. Esta es otra diferencia significativa con MEF inmortalizados, que mantienen su tasa proliferativa y no muestran signos de transformación celular a lo largo del tiempo de cultivo, pero también con células de Schwann que pueden expandirse indefinidamente mientras mantienen su tasa de proliferación (Mathon *et al*., 2001). Se están realizando más estudios para investigar el destino final de las NSC inmortalizadas.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Conclusiones

1. Los MEA tienen capacidad de evadir el proceso de senescencia replicativa dando lugar a la formación de líneas celulares inmortales.

2. Las células inmortalizadas a partir de MEA presentan características propias de células madre neurales como son su capacidad de formar neuroesferas, de dividirse durante largos periodos de tiempo y de generar células que expresan marcadores de las tres estirpes neurales.

3. Los mecanismos de inmortalización en MEA son compatibles con una activación de los checkpoints de daño celular, lo que indica la existencia de importantes diferencias en el proceso de senescencia dependiendo del tipo celular.

Bibliografía

6 BIBLIOGRAFÍA

Abramov AY, Canevari L, Duchen MR (2003) Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity. *J Neurosci* 23:5088–5095

Acosta JC, O'Loghlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, et al. (2008) Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* 133:1006–18

Akiguchi I, Tomimoto H, Suenaga T, Wakita H, Budka H (1997) Alterations in glia and axons in the brains of Binswanger's disease patients. *Stroke* 28:1423–1429

Alimonti A, Nardella C, Chen Z, Clohessy JG, Carracedo A, Trotman LC, Cheng K, Varmeh S, Kozma SC, Thomas G et al (2010) A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J Clin Invest* 120: 681 – 693

Almengló C, Devesa P, Devesa J, Arce VM (2017) GPE Promotes the Proliferation and Migration of Mouse Embryonic Neural Stem Cells and Their Progeny In Vitro. *Int. J. Mol. Sci*. 18, 1280

Altieri P, Spallarossa P, Barisione C, Garibaldi S, Garuti A, Fabbi P, Ghigliotti G, Brunelli C (2012) Inhibition of doxorubicin-induced senescence by PPARdelta activation agonists in cardiac muscle cells: cooperation between PPARdelta and Bcl6. *PLoS ONE* 7: e46126

Altman J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135: 1127–1128

Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319–335

Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137: 433–457

Astle MV, Hannan KM, Ng PY, Lee RS, George AJ, Hsu AK, Haupt Y, Hannan RD, Pearson RB (2012) AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene* 31: 1949 – 1962

Azari H, Rahman M, Sharififar S, Reynolds BA (2010) Isolation and expansion of the adult mouse neural stem cells using the neurosphere assay. *J Vis Exp* 45: e2393

Azari H, Louis SA, Sharififar S, Vedam-Mai V, Reynolds BA (2011) Neural-colony forming cell assay: an assay to discriminate bona fide neural stem cells from neural progenitor cells. *J Vis Exp.* 6; (49)

Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, LeBrasseur NK, Chils BG, et al. (2011) Clearence of p16^{INK4a} positive senescent cells delays aging-associated disorders. *Nature* 479:232–236

Banda E, Grabel L (2016) Directed differentiation of human embryonic stem cells into neural progenitors. *Methods Mol Biol* 1307: 289–298.

Barca O, Seoane M, Ferré S, Prieto JM, Lema M, Señarís R, Arce VM (2007) Mechanisms of interferon-beta-induced survival in fetal and neonatal primary astrocytes. Neuroimmunomodulation. 14(1):39-45

Barca O, Costoya JA, Señarís RM, Arce VM (2008) Interferon-beta protects astrocytes against tumour necrosis factor-induced apoptosis via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. Exp Cell Res. 314:2231-2237

Barca O, Seoane M, Señarís RM, Arce VM (2013) Fas/CD95 ligation induces proliferation of primary fetal astrocytes through a mechanism involving caspase 8-mediated ERK activation. Cell Physiol Biochem. 2:111-120

Barkho BZ, Song H, Aimone JB, Smrt RD, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH and Zhao X (2006) Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells Dev* 15, 407–421

Bassi C, Ho J, Srikumar T, Dowling RJ, Gorrini C, Miller SJ, Mak TW, Neel BG, Raught B, Stambilic V (2013) Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress. *Science* 341:395 – 399

Bavik C, Coleman I, Dean JP, Knudsen B, Plymate S, Nelson PS (2006) The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res* 66:794–802

Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, et al. (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 22:4212–22

Belenguer G, Domingo-Muelas A, Ferron SR, Morante-Redolat JM, Farinas I (2016) Isolation, culture and analysis of adult subependymal neural stem cells. *Differentiation* 91: 28–41

Blasi A, Martino C, Balducci L, Saldarelli M, Soleti A, Navone SE, Canzi L, Cristini S, Invernici G, Parati EA, Alessandri G (2011) Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. *Vasc. Cell.* 3, 5

Bonaguidi MA, Wheeler MA, Shapiro JS, Stadel RP, Sun GJ, Ming GL, Song H (2011) In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell* 145: 1142–1155

Bond AM, Ming GL, Song H (2015) Adult mammalian neural stem cells and neurogenesis: five decades Later. *Cell Stem Cell* 17: 385–395

Broe M, Kril J, Halliday GM (2004) Astrocytic degeneration relates to the severity of disease in frontotemporal dementia. *Brain* 127:2214–2220.

Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T, Gotz M (2008) Origin and progeny of reactive gliosis: a source of multipotent cells in the injured brain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 3581–3586.

Bundgaard M and Abbott NJ (2008) All vertebrates started out with a glial blood-brain barrier 4.500 million years ago. *Glia* 56, 699–708

Campisi J (1997) The biology of replicative senescence. Eur J Cancer. 33(5):703-9.

Campisi J (2001) Cellular senescence as tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* 11:27–31

Campisi J (2005) Review. Senescent cells, tumor suppression and organismal aging. Good citizens, bad neighbors. *Cell* 120:513–522

Campisi J, d'Adda di Fagagna F (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:729–740

Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, Melow S (2011) Cellular senescence: a link between cancer and age- related degenerative disease? *Semin Cancer Biol* 21:354–359

Chen QM, Liu J, Merrett JB (2000) Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H_2O_2 response of normal human fibroblasts. *Biochem J* 347: 543 – 551

Cheng L, Hu W, Qiu B, Zhao J, Yu Y, Guan W et al. (2014) Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Res* 24: 665–679

Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, Campisi J, Van Deursen JM (2014) Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO reports* 15(11):1139-53

Cho KS, Yang L, Lu B, Feng Ma H, Huang X, Pekny M, Chen DF (2005) Re-establishing the regenerative potential of central nervous system axons in postnatal mice. *J. Cell Sci* 118, 863–872

Chow MT, Moller A, Smyth MJ (2012) Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin Cancer Biol* 22:23–32

Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mullowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA (2005) Thrombospondins are astrocyte secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120, 421–433

Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD Jr, Fragniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage FH, Bussey TJ (2009) A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325: 210–213

Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguría A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M (2005) Tumour biology: senescence in premalignant tumours. Nature 4;436(7051):642

Collado M, Serrano M (2010) Senescence in tumors: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 10:51–57

Cook, MJ (1965) The anatomy of the laboratory mouse (1965). Academic Press. New York.

Cooper GM (2000) The Cell. A Mollecular Approach, 2nd edition. Boston University. Sunderland (MA): Sinauer Associates. ISBN-10: 0-87893-106-6

Coppé JP, Kauser K, Campisi J, Beausejour CM (2006) Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem* 281:29568–29574

Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz D, et al. (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell non-autonomous functions of oncegenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 6:2853–68

Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beauséjour C, et al. (2010) A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS ONE* 5: e9188

Corti S, Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Donadoni C, Salani S et al. (2012) Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons. *Exp Cell Res* 318: 1528–1541

Cristofalo VJ, Volker C, Francis MK, Tresini M (1998) Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts. *Crit Rev Eukaryo Gene Expr* 8, 43-80

Dahmane N, Sánchez P, Gitton Y, Palma V, Sun T, Beyna M, Weiner H, Ruiz i Altaba A (2001) The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* 128:5201–5212

Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1–105

Debacq-Chainiaux F, Borlon C, Pascal T, Royer V, Eliaers F, Ninane N, Carrard G, Friguet B, de Longueville F, Boffe S et al. (2005) Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci* 118: 743 – 758

Demidenko ZN, Zubova SG, Bukreeva EI, Pospelov VA, Pospelova TV, Blagosklonny MV (2009) Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle* 8: 1888 – 1895

Deng W, Aimone JB, Gage FH (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11: 339–350

Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez- Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703–716

Elzi DJ, Song M, Hakala K, Weintraub ST, Shiio Y (2012) Wnt antagonist SFRP1 functions as secreted mediator of senescence. *Mol Cell Biol* 21:4388–4399

Eroglu C, Allen NJ, Susman MW et al. (2009) Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell* 139, 380–392

Felsher DW (2008) Oncogene addiction versus oncogene amnesia: perhaps more than just a bad habit? *Cancer Res* 68:3081–3086

Feng N, Han Q, Li J, Wang S, Li H, Yao X et al. (2014) Generation of highly purified neural stem cells from human adipose-derived mesenchymal stem cells by Sox1 activation. *Stem Cells Dev* 23: 515–529

Ferrari D, Binda E, De Filippis L, Vescovi AL (2010) Isolation of neural stem cells from neural tissues using the neurosphere technique. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 15: 2D.6.1–2D.6.18

Freund A, Orjalo A, Desprez PY, Campisi J (2010) Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* 16:238–248

Freund A, Patil CK, Campisi J (2011) p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J* 30:1536–1548

Fulop T, Kotb R, Fortin CF, Pawelec G, de Angelis F, Larbi A (2010) Potential role of immunosenescence in cancer development. *Ann NY Acad Sci* 1197:158–165

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399:597 – 601

Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science*. 287(5457):1433-8.

Gao R, Xiu W, Zhang L, Zang R, Yang L, Wang C et al. (2017) Direct induction of neural progenitor cells transiently passes through a partially reprogrammed state. *Biomaterials* 119: 53–67

Ge W, Ren C, Duan X, Geng D, Zhang C, Liu X et al. (2015) Differentiation of mesenchymal stem cells into neural stem cells using cerebrospinal fluid. *Cell Biochem Biophys* 71: 449–455

Geva-Zatorsky N, Rosenfeld N, Itzkovitz S, Milo R, Sigal A, Dekel E, Yarnitzky T, Liron Y, Polak P, Lahav G et al. (2006) Oscillations and variability in the p53 system. *Mol Syst Biol* 2: 2006.0033

Giaume C, McCarthy KD (1996) Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci* 19, 319–325

Giaume C, Kirchhoff F, Matute C, Reichenbach A, Verkhratsky A (2007) Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ* 14, 1324–1335

Gil-Perotín S, Duran-Moreno M, Cebrián-Silla A, Ramírez M, García-Belda P, García-Verdugo JM (2013) Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay. *Anat Rec (Hoboken)* 296(9):1435-52

Ginhoux F, Prinz M (2015) Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020537

Goldstein S (1990) Replicative Senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* 24:1129-1133

Graf T, Enver T (2009) Forcing cells to change lineages. *Nature* 462: 587–594

Hampel B, Malisan F, Niederegger H, Testi R, Jansen-Durr P (2004) Differential regulation of apoptotic cell death in senescent human cells. *Exp Gerontol* 39: 1713 – 1721

Han DW, Tapia N, Hermann A, Hemmer K, Hoing S, Arauzo-Bravo MJ et al. (2012) Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell* 10: 465–472

Hayflick L (1977) The cellular basis for biological aging. In: Finch, Caleb E.; Hayflick, Leonard, editors. Handbook of the Biology of Aging. VNR; New York. p. 159-186

Hayflick L (2001) The role of telomeres and telomerase in aging and longevity determination. In: Matson, Mark P., editor. Telomerase, aging and disease. Vol. 8.p. 185-198. Advances in cell aging and disease

Hazell AS, Sheedy D, Oanea R, Aghourian M, Sun S, Jung JY, Wang D, Wang C (2009) Loss of astrocytic glutamate transporters in Wernicke encephalopathy. *Glia* 58:148–156

Heneka MT, Rodriguez JJ, Verkhratsky A (2010) Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev* 63:189–211

Herbig U, Fereira M, Condel I, Carey D, Sedivy JM (2006) Cellular senescence in aging primates. *Science* 311:1257

Huang LYM, Gu Y, Chen Y (2013) Communication between neuronal somata and satellite glial cells in sensory ganglia. *Glia* 61, 1571-1581

Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA (2002) Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39:193–206

Jacob C (2015) Transcriptional control of neural crest specification into peripheral glia. *Glia* 63:1883-1896

Kaul M, Garden GA, Lipton SA (2001) Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature* 410:988–994

Kim HM, Qu T, Kriho V, Lacor P, Smalheiser N, Pappas GD, Guidotti A, Costa E, Sugaya K (2002) Reelin function in neural stem cell biology. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 4020-4025

Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Arauzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M, Scholer HR (2008) Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 454, 646-650

Knights CD, Catania J, Di Giovanni S, Muratoglu S, Perez R, Swatzbeck A, Quong AA, Zhang X, Beerman T, Pestell RG et al. (2006) Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *J Cell Biol* 173: 533 – 544

Koch P, Opitz T, Steinbeck JA, Ladewig J, Brustle O (2009) A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 3225–3230

Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R (2006) Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* 8:877–884

Kosar M, Bartkova J, Hubackova S, Hadny Z, Lukas J, Bartek J (2011) Senescence-associated heterochromatin loci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type and insult-dependent manner, and follow expression of $p16^{INK4a}$. *Cell Cycle* 10:457–468

Kozhich OA, Hamilton RS, Mallon BS (2013) Standardized generation and differentiation of neural precursor cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev and Rep* 9:531–536

Krizhanovsky V, Xue W, Zender L, Yon M, Hernando E, Lowe SW (2008) Implications of cellular senescence in tissue damage response, tumor suppression, and stem cell biology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73:513–522

Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J (2001) Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12072–12077

Krtolica A, Larocque N, Genbacev O, Ilic D, Coppé JP, et al. (2011) GROα regulates human embryonic stem cell self-renewal or adoption of a neuronal fate. *Differentiation* 81:222–232

Kuchibhotla KV, Lattarulo CR, Hyman BT, Bacskai BJ (2009) Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science* 323:1211–1215

Kuilman T, Michaloglu C, Vredeveld LCW, Douma S, van Doorn L, et al. (2008) Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 133:1019–31

Laberge RM, Awad P, Campisi J, Desprez PY (2012) Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts. *Cancer Microenviron* 5:39–44

Larsson LG, Henriksson MA (2010) The Yin and Yang functions of the Myc oncoprotein in cancer development and as targets for therapy. *Exp Cell Res* 316:1429–1437

Lee JJ, Kim BC, Park MJ, Lee YS, Kim YN, Lee BL, Lee JS (2011) PTEN status switches cell fate between premature senescence and apoptosis in glioma exposed to ionizing radiation. *Cell Death Differ* 18:666 – 677

Levine AJ, Oren M (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 9:749–758

Li T, Kon N, Jiang L, Tan M, Ludwig T, Zhao Y, Baer R, Gu W (2012) Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell* 149: 1269 – 1283

Liebner S, Czupalla CJ, Wolburg H (2011) Current concepts of blood-brain barrier development. *Int J Dev Biol* 55, 467–476

Linskens MH, Feng J, Andrews WH, Enlow BE, Saati SM, Tonkin LA, Funk WD, Villeponteau B (1995) Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nucleic Acid Research* 23:3244-3251

Liu D, Hornsby PJ (2007) Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res* 67:3117–3126

Lodygin D, Menssen A, Hermeking H (2002) Induction of the Cdk inhibitor p21 by LY83583 inhibits tumor cell proliferation in a p53-independent manner. *J Clin Invest* 110:1717–1727

Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E, Rupf T, Salvetter J, Schulz-Siegmund M, Bader A (2008) Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp. Dermatol.* 17, 925–932

Macieira-Coelho A (1988) Relevance for in vivo Aging. Karger; Basel. A Biology of Normal Proliferating Cells in vitro

Magistretti PJ (2006) Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol* 209:2304–2311

Malarkey EB, Parpura V (2008) Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int* 52:142–154

Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G (2014) Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 81 – 94

Marusyk A, Wheeler LJ, Mathews CK, DeGregori J (2007) p53 mediates senescence-like arrest induced by chronic replicational stress. *Mol Cell Biol* 27: 5336 – 5351

Mathon NF, Malcolm DS, Harrisingh MC, Cheng L, Lloyd AC (2001) Lack of replicative senescence in normal rodent glia. *Science.* 291(5505):872-5

Matsushita H, Chang E, Glassford AJ, Cooke JP, Chiu CP, Tsao PS (2001) eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: preser- vation by hTERT immortalization. *Circ Res* 89: 793 – 798

Matute C (2010) Calcium dyshomeostasis in white matter pathology. *Cell Calcium* 47:150–157

McElhaney JE, Effros RB (2009) Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults? *Curr Opin Immunol* 21:418–424

Mena MA, Garcia de Yebenes J (2008) Glial cells as players in parkinsonism: the "good," the "bad," and the "mysterious" glia. *Neuroscientist* 14:544–560

Michalczyk K, Ziman M (2005) Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol* 20 (2): 665–71

Morris AM, Weeden CS, Churchwell JC, Kesner RP (2013) The role of the dentate gyrus in the formation of contextual representations. *Hippocampus* 23: 162–168

Mulligan SJ, MacVicar BA (2004) Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. N*ature* 431,195–199

Munoz-Espin D, Canamero M, Maraver A, Gomez-Lopez G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, Rodriguez-Baeza A, Varela-Nieto I, Ruberte J, Collado M et al. (2013) Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 155: 1104 – 1118

Murray-Zmijewski F, Slee EA, Lu X (2008) A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 702 – 712

Nagler K, Mauch DH, Pfrieger FW (2001) Glia-derived signals induce synapse formation in neurones of the rat central nervous system. *J Physiol* 533, 665–679

Nardella C, Clohessy JG, Alimonti A, Pandolfi PP (2011) Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 11:503–511

Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26, 523–530

Nedergaard M, Dirnagl U (2005) Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia* 50:281–286

Nelyudova A, Aksenov N, Pospelov V, Pospelova T (2007) By blocking apoptosis, Bcl-2 in p38-dependent manner promotes cell cycle arrest and accelerated senescence after DNA damage and serum withdrawal. *Cell Cycle* 17: 2171 – 2177

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314–1318

Nogueira V, Park Y, Chen CC, Xu PZ, Chen ML, Tonic I, Unterman T,Hay N (2008) Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell* 14: 458 – 470

Noureddine H, Gary-Bobo G, Alifano M, Marcos E, Saker M, et al. (2011) Pulmonary artery smooth muscle cell senescence is a pathogenic mechanism for pulmonary hypertension in chronic lung disease. *Circ Res* 109:543–553

Oberheim NA, Wang X, Goldman S, Nedergaard M (2006) Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci* 29, 547–553

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kayed R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409–421

Olabarria M, Noristani HN, Verkhratsky A, Rodriguez JJ (2010) Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia* 58:831–838

Orjalo A, Bhaumik D, Gengler B, Scott GK, Campisi J (2009) Cell surface IL-1α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:17031–1736

Ortega F, Gascón S, Masserdotti G, Deshpande A, Simon C, Fischer J, Dimou L, Chichung Lie D, Schroeder T, Berninger B (2013) Oligodendrogliogenic and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nat Cell Biol* 15: 602–613

Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliet SH, Schousboe A, Haydon PG, Stout RF Jr, Spray DC, Reichenbach A, Pannicke T, Pekny M, Pekna M, Zorec R, Verkhratsky A (2012) Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem* 121(1):4-27

Paukert M, Bergles DE (2006) Synaptic communication between neurons and $NG2^{+}$ cells. *Curr Opin Neurobiol* 16, 515–521

Pazzoli E, Alspach E, Milczarek A, Prior J, Piwnica-Worms D, Stewart SA (2012) Chromatin remodeling underlies the senescence-associated secretory phenotype of tumor stromal fibroblasts that supports cancer progression. *Cancer Res* 72:2251–2261

Potten CS, Loeffler M (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development.* 110, 1001–1020

Pourabdolhossein F, Hamidabadi HG, Bojnordi MN, Mojaverrostami S (2017) MULTIPLE SCLEROSIS: Perspectives in Treatment and Pathogenesis. Brisbane (AU): Codon Publications; Chapter 6

Probin V, Wang Y, Bai A, 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. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 551 – 560

Pruschy M, Resch H, Shi YQ, Aalame N, Glanzmann C, Bodis S (1999) Ceramide triggers p53-dependent apoptosis in genetically defined fibrosarcoma tumour cells. *Br J Cancer* 80: 693 – 698

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D et al. (2001). Neuroscience 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland (MA)

Purvis JE, Karhohs KW, Mock C, Batchelor E, Loewer A, Lahav G (2012) p53 dynamics control cell fate. *Science* 336: 1440 – 1444

Ramón y Cajal R. Histology of the Nervous System, translated by N. Swanson & L. Swanson, Oxford University Press (Reedición de 1995)

Ramón y Cajal S (1928) Degeneration and regeneration of the nervous system. Oxford University Press. London: Humphrey Milford. Volume I.

Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, Mirkin BL (2003) Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene* 22: 2805 – 2811

Reynolds BA y Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710

Reynolds BA, Rietze RL (2005) Neural stem cells and neurospheres: re-evaluating the relationship. *Nat Methods*. 2(5):333-6

Ríos M, Foretz M, Viollet B, Prieto A, Fraga M, Costoya JA, Señarís R (2013) AMPK activation by oncogenesis is required to maintain cancer cell proliferation in astrocytic tumors. Cancer Res. 73(8): 2628-38.

Rizzo M, Evangelista M, Simili M, Mariani L, Pitto L, Rainaldi G (2011) Immortalization of MEF is characterized by the deregulation of specific miRNAs with potential tumor suppressor activity. Aging (7):665-71

Rochette PJ, Brash DE (2008) Progressive apoptosis resistance prior to senescence and control by the anti-apoptotic protein BCL-xL. *Mech Ageing Dev* 129: 207 – 214

Rodier F, Munoz DP, Teachenor R, Chu V, Le O, et al. (2011) DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci* 124:68–81

Rodríguez JJ, Verkhratsky A (2011) Neuroglial Roots of Neurodegenerative Diseases? *Mol Neurobiol* 43:87–96

Rossi D, Brambilla L, Valori CF, Roncoroni C, Crugnola A, Yokota T, Bredesen DE, Volterra A (2008) Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Differ* 15:1691–1700

Rossi D, Volterra A (2009) Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res Bull* 80:224–232

Rowitch DH, Kriegstein AR (2010) Developmental genetics of vertebrate glial cell specification. *Nature* 468, 214-222

Sabatini F, Petecchia L, Tavian M, Jodon de Villeroche V, Rossi GA, Brouty-Boye D (2005) Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab. Invest. J. Tech. Meth. Pathol*. 85, 962–971

Salminen A, Olaja J, Kaarniranta K, Haappasalo A, Hiltunen M, Soininen H (2011) Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. *Eur J Neurosci* 34:3–11

Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS (2005) Neural stem cells and the origin of gliomas. *New Engl J Med* 353:811–822

Sanders YY, Liu H, Zhang X, Hecker L, Bernard K, Desai L, Liu G, Than- nickal VJ (2013) Histone modifications in senescence-associated resistance to apoptosis by oxidative stress. *Redox Biol* 1: 8 – 16

Schildge S, Bohrer C, Beck K, Schachtrup C (2013) Isolation and Culture of Mouse Cortical Astrocytes. J Vis Exp.

Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW (2002) A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 109: 335 – 346

Seaberg RM y van der Kooy D (2003) Stem and progenitor cells, the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci* 26, 125-131

Seluanov A, Gorbunova V, Falcovitz A, Sigal A, Milyavsky M, Zurer I, Shohat G, Goldfinger N, Rotter V (2001) Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Mol Cell Biol* 21: 1552 – 1564

Seoane M, Iglesias P, Gonzalez T, Dominguez F, Fraga M, Aliste C, Forteza J, Costoya JA (2008) Retinoblastoma loss modulates DNA damage response favoring tumor progression.*PLoS One.* 3(11):e3632

Seoane M, Costoya JA, Arce VM (2017) Uncoupling Oncogene-Induced Senescence (OIS) and DNA Damage Response (DDR) triggered by DNA hyper-replication: lessons from primary mouse embryo astrocytes (MEA). Sci Rep. 7(1):12991.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and $p16^{INK4a}$. *Cell* 88:593–602

Shane Anderson A, Loeser RF (2010) Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24:15–26

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD (2001) IFN-γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107–1111

Shay JW, Wright WE (2011) Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol* 21:349–353

Sherwood SW, Rush D, Ellsworth JL, Schimke RT (1988) Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc Natl Acad Sci* 85:9086-9090

Shimi T, Butin-Israeli V, Adam SA, Hamanaka RB, Goldman AF, et al. (2011) The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes Dev* 25:2579–2593

Shin J, Berg DA, Zhu Y, Shin JY, Song J, Bonaguidi MA, Enikolopov G, Nauen DW, Christian KM, Ming GL, Song H (2015) Single-cell RNA-Seq with waterfall reveals molecular cascades underlying adult neuro- genesis. *Cell Stem Cell* 17: 360–372

Smart I, Leblond C (1961) Evidence for division and transformations of neuroglia cells in the mouse brain, as derived from radioautography after injection of thymidine-H^3. *J Comp Neurol* 116: 349–367

Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32:638–647

Song H, Stevens C, Gage FH (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417, 39–44

Song YS, Lee BY, Hwang ES (2005) Dinstinct ROS and biochemical profiles in cells undergoing DNA damage-induced senescence and apoptosis. *Mech Ageing Dev* 126: 580 – 590

Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE et al. (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131, 1164–1178

Su G, Zhao Y, Wei J, Xiao Z, Chen B, Han J et al. (2013) Direct conversion of fibroblasts into neural progenitor-like cells by forced growth into 3D spheres on low attachment surfaces. *Biomaterials* 34: 5897–5906.

Sundar SJ, Hsieh JK, Manjila S, Lathia JD, Sloan A (2014) The role of cancer stem cells in glioblastoma. *Neurosurg Focus* 37:E6

Takagi Y (2016) History of Neural Stem Cell Research and Its Clinical Application. *Neurol Med Chir* 56:110-124

Tang Y, Yu P, Cheng L (2017) Current progress in the derivation and therapeutic application of neural stem cells. *Cell Death Dis.* 12;8(10):e3108.

Tavana O, Benjamin CL, Puebla-Osorio N, Sang M, Ullrich SE, Ananthaswamy HN, Zhu C (2010) Absence of p53-dependent apoptosis leads to UV radiation hypersensitivity, enhanced immunosuppression and cellular senescence. *Cell Cycle* 9: 3328 – 3336

Thier M, Worsdorfer P, Lakes YB, Gorris R, Herms S, Opitz T et al. (2012) Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell Stem Cell* 10: 473–479

Todaro GJ, Green H (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17:299-313

Tzingounis AV, Wadiche JI (2007) Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* 8, 935–947

Vakifahmetoglu H, Olsson M, Orrenius S, Zhivotovsky B (2006) Functional connection between p53 and caspase-2 is essential for apoptosis induced by DNA damage. *Oncogene* 25: 5683 – 5692

Velarde MC, Flynn JM, Day NU, Melov S, Campisi J (2012) Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging* 5:3–12

Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA (2006) Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 6:425–436

Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6, 626–640

Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR (2008) Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* 132:363–374

Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T (2009) DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* 8:311–323

Wang E (1995) Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res* 55: 2284 – 2292

Wang P, Yu J, Zhang L (2007) The nuclear function of p53 is required for PUMA-mediated apoptosis induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 4054 – 4059

Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC et al. (1996) Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16: 7599–7609

Widestrand A, Faijerson J, Wilhelmsson U, Smith PL, Li L, Sihlbom C, Eriksson PS, Pekny M (2007) Increased neurogenesis and astrogenesis from neural progenitor cells grafted in the hippocampus of GFAP-/- Vim-/- mice. *Stem Cells* 25, 2619–2627

Wilhelmsson U, Li L, Pekna M et al. (2004) Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *J Neurosci* 24, 5016–5021

Wiman KG (2010) Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. *Oncogene* 29:4245–4252

Wu CH, van Riggelen J, Yetil A, Fan AC, Bachireddy P, Felsher DW (2007) Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13028–13033

Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW (2007) Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445:656–660

Yang H, Zhang L, An J, Zhang Q, Liu C, He B et al. (2017) MicroRNA-mediated reprogramming of somatic cells into neural stem cells or neurons. *Mol Neurobiol* 54: 1587–1600

Yentrapalla R, Azimzadeh O, Sriharshan A, Malinowsky K, Merl J, Wojcik A, Harms-Ringdahl M, Atkinson MJ, Becker KF, Haghdoost S et al. (2013) The PI3K/Akt/mTOR pathway is implicated in the premature senescence of primary human endothelial cells exposed to chronic radiation. *PLoS ONE* 8: e70024

Zhang J, Patel JM, Block ER (2002) Enhanced apoptosis in prolonged cultures of senescent porcine pulmonary artery endothelial cells. *Mech Ageing Dev* 123: 613 – 625

Zhang M, Lin YH, Sun YJ, Zhu S, Zheng J, Liu K et al. (2016) Pharmacological reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by signaling-directed transcriptional activation. *Cell Stem Cell* 18: 653–667

Zhang S, Cui W (2014) Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J. Stem. Cells*. 6:305–311

Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA (2001) In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19: 1129–1133

Zhang Y, Fujita N, Tsuruo T (1999) Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene* 18: 1131 – 1138

Zhang X, Li J, Sejas DP, Pang Q (2005) The ATM/p53/p21 pathway influences cell fate decision between apoptosis and senescence in reoxygenated hematopoietic progenitor cells. *J Biol Chem* 280: 19635 – 19640

Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645-660

Zhu S, Ambasudhan R, Sun W, Kim HJ, Talantova M, Wang X et al. (2014) Small molecules enable OCT4-mediated direct reprogramming into expandable human neural stem cells. *Cell Res* 24: 126–129

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274: 11549 – 11556

Zuchero JB, Barres BA (2013) Intrinsic and extrinsic control of oligodendrocyte development. *Curr Opin Neurobiol* 23, 914-920

http://ghr.nlm.nih.gov Genetic Home References. National Institute of Health (USA)

Anexo

Manuscript Click here to download Manuscript MEA3T3 1.0.docx

Click here to view linked References

IMMORTALIZATION OF A CELL LINE WITH NEURAL STEM CELL (NSC) CHARACTERISTICS DERIVED FROM MOUSE EMBRYO BRAIN

Cristina Almengló[1]*, Tamara González-Mosquera[1]*, Marcos Seoane[1], Jesús Devesa[2], José A. Costoya[1], Víctor M. Arce[1$]

* These two authors equally contributed to the work

[1]Departamento de Fisioloxia, Facultade de Medicina and Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS). Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

[2]Research and Development, Medical Center Foltra, Teo 15886, Spain

[$]Corresponding author:

Víctor M. Arce, M.D., Ph.D.

Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas

Avda. de Barcelona s/n

15782 Santiago de Compostela. A Coruña. Spain

victor.arce@usc.es

+34 600 940 220

Abstract

Neural stem cells (NSC) have been extensively used as a tool to investigate the mechanisms responsible for neural repair, and they have been also considered as the source for a series of promising replacement therapies in various neurodegenerative diseases. However, their use is limited by their relative rarity and anatomical localization, and also because the methods for isolation and characterization are usually time consuming and have some technical limitations. In this study we describe a mechanism that allows the obtaining of immortalized cells with NSC characteristics obtained from mouse brain embryo. Since these cells can be maintained indefinitely in culture, they may constitute a permanent source of NSC that can be used for research studies on neural development and regeneration.

Key words: Neural stem cells, neurospheres, replicative senescence

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Introduction

Neural stem cells (NSC) are the most primordial and uncommitted self-renewing precursors of the nervous system, that give rise to the different neural lineages: neurons, astrocytes, and oligodendrocytes [1-4]. NSC are responsible for the formation of the nervous system during development, but also support postnatal neurogenesis, thus contributing to the cellular plasticity of the adult mammalian brain [2, 5, 6]. Owing to this, NSC have been extensively used as a tool to investigate the mechanisms responsible for neural development and repair, and even proposed as replacement therapies in various neurodegenerative diseases [7-9]. However, because of the relative rarity and anatomical localization of NSC, methods for isolation and characterization are usually time consuming and have some technical limitations [10,11].

Up to now, the neurosphere assay is the most commonly used method to isolate and expand NSC from both adult and embryonic CNS tissue [12,13]. Under those assay conditions, a small population of growth factor-responsive precursor cells form colonies called neurospheres in the presence of epidermal growth factor (EGF) and/or basic fibroblastic growth factor (bFGF). These neurospheres can be subcultured to expand the pool of neural stem cells or can be induced to generate the three major cell types of the CNS. However, although this assay provides a helpful tool to supply a consistent, renewable source of undifferentiated CNS precursors, it requires continual use of embryos as the primary source of cells which along with ethical considerations, lengthy delays the procedure.

In the present report, we have adapted the 3T3 protocol previously described for fibroblasts [14] to develop a neural cell line that can be maintained for a long time in culture while preserving its multipotent characteristics. Depending on the culture conditions, the immortalized neural cells can be induced to form neurospheres in an NSA, or to differentiate, giving rise to the three neural lineages. Therefore, this cell line provides a consistent and renewable source of undifferentiated CNS precursors that can be used for studies on neural development and regeneration. In addition, this cell line may also represent an unevaluable tool to investigate the mechanisms underlying replicative senescence in a cellular system that shows striking differences with mouse embryo fibroblasts (MEF) [15], one of the gold-standards in biomedical research.

Materials and methods

Cell cultures

Primary monolayer cultures of either MEA (mouse embryo astrocytes) or MEF were initially established from 13.5 dpc (day post coitum) C57BL/6 mice embryos. The care and use of all experimental animals was in accordance with institutional guidelines and approved by the Ethics Committee of the University of Santiago de Compostela and Xunta de Galicia (approval ID 15005AE/07/FUN01/FIS02/JACP1). Pregnant mice were sacrificed at 13.5 dpc, uterine horns were dissected, and each embryo was separated from its placenta and embryonic sac and transferred to an individual petri dish with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain).

Once red organs were dissected, the head and carcass of each embryo were individually transferred to new dry petri dishes for isolation and culture of MEA and MEF, respectively. MEA isolation was performed as previously described [16], with appropriate modifications [15]. Briefly, brains were isolated, finely minced and dissociated by mechanical shearing followed by filtration through a 40-micron mesh. Cell were plated in Falcon polystyrene culture dishes (BD Biosciences, Madrid, Spain) and grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain), 2 mM glutamine, 2.5 U/ml penicillin, 2.5 mg/ml and streptomycin (all from Thermo Fisher Scientific). The cultures were maintained at 37ºC in a humidified atmosphere of 5% CO_2. MEF cultures were also performed as previously described [15, 17]. In this case, each chopped embryo carcass was resuspended in 5 mL of cold PBS and transferred into a 25 mL falcon tube and settled for 5 min. Supernatant was discarded and the process was repeated twice. PBS was replaced with 2 mL of cold trypsin/EDTA 0.05% (Thermo Fisher Scientific) and the cells were incubated at 4°C for 6 to 18 hours, followed by incubation a 37°C for 20 min. After 5 min of incubation, cells were dissociated by pipetting up and down thoroughly, and then trypsin was inactivated by adding 2 volumes of complete medium. Isolated MEF were routinely cultured in DMEM.

Cell immortalization was achieved by either using the 3T3 protocol [14] or a modification of it (see results for further details). In the first case, cells were transferred to new dishes with fresh medium every 3 days. The same cell density ($3 \cdot 10^3/cm^2$) was seeded in every transfer. In the second case, cells were grown until confluence and then transferred to new dishes with fresh medium in a 1:3 ratio. In all cases, cell cultures were maintained until

immortalization, and some immortalized cells were used for generating long-term cultures (Fig. 1, see also results for further details).

Determination of cell senescence

Cell senescence was assessed with the senescence β-galactosidase staining kit (Werfen, Barcelona, Spain) that measures SA-β-galactosidase activity. All procedures were performed according with the manufacturer´s instructions.

Generation of neurospheres

Neurosphere formation was induced by using a modification of the neurosphere assay [13]. Immortalized cells growing in DMEM as previously indicated, were trypsinized and transferred to fresh polystyrene culture dishes with semi-synthetic medium supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 1% Gibco B27 supplement, 10 ng/mL of EGF, and 10 ng/mL of bFGF.

Western blot

Cells were lysed by adding RIPA buffer supplemented with sodium orthovanadate (10 µl/ml, Sigma), ammonium persulfate (PMSF, 10µl/mL), NaCl (150 mM) and 40 µl/ml of a EDTA-free protease inhibitor cocktail (cOmplete. Sigma). Cell extracts were resolved in 12% SDS-PAGE denaturalizing gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Trans-Blot Transfer Medium 0.2 µm BioRad). Blocking and membrane incubation with antibodies were performed in accordance with the specifications of each manufacturer. Antibodies against p21, p16, p19, p53, phospho-p53, pERK1/2 and pAkt were obtained from Cell Signaling Technology. Anti-GAPDH was obtained from Santa Cruz Biotechnology. Immunoreactive bands were detected with a western-light

chemiluminiscence detection system (ECL, Amersham Pharmacy Biotech, Freiburg, Germany) and photographed (HyperfilmECL, GE Healthcare Bio-Sciences AB).

Immunocytochemistry

Approximately 5×10^3 cells were seeded in glass coverslips, placed in 24-multiwell plates, and incubated for 24 h as described above. Cells were then fixed in 96% ethanol for 1 h, rinsed in posphate-bufferedsaline (PBS), and permeabilized by adding 250 µL of 0.1% TritonX-100, 0.3% bovine serum albumin (BSA) for 1 h. After rinsing the cells three times in PBS, an overnight incubation at 4ºC was performed with the following primary antibodies: anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Dako, Agilent Technologies, Madrid, Spain; ready to use), anti-myelin basic protein (MBP) (Dako, Agilent Technologies; dilution 1:2000), anti-NeuN (Merk Millipore, Madrid, Spain; dilution 1:200), and anti-SOX2 (Seven Hills Bioreagents, Cincinnati, OH, USA; dilution1:1000). Positive cells were detected with a universal second antibody kit that uses a peroxidase-conjugated labeled-dextranpolymer (EnvisionPlus, Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and photographed with an Olympus BX43 camera (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan).

Cell proliferation assays

Cells were seeded at $2.5\text{x}10^3$ (primary), $5\text{x}10^3$ (immortalized low passage) or $10\text{x}10^3$ (immortalized high passage) and grown in DMEM for 1, 3, 5 or 7 days. At these times, cells were fixed and stained with 0.1% violet crystal (Sigma) for 30 minutes and then washed with PBS to remove the dye excess. Dye content was quantified in a spectrophotometer. To determine the rate of BrdU incorporation, 10^6 cells were seeded in poly-L-lysine-coated slides (1 mL/slide)

and maintained for 24 h. Cells were then serum-starved for 48h and BrdU (10 mM, Sigma-Aldrich) was given for 2.5 h. BrdU+ cells were detected by immunocytochemistry using a monoclonal antibody (BD Biosciences, dilution 1:2000). Representative images were captured with an Olympus DP72 camera (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan), and the number of BrdU+ cells was quantified in 10 random fields per slide.

Wound-healing assay

Cells were seeded at approximately 1×10^5 per slide and incubated as previously described. Using a plastic pipette tip, a wound field was created with a defined gap of 1 mm, and cells were then grown for 24 or 48 h. BrdU+ cells were detected by immunocytochemistry, as previously indicated, and random fields were photographed with an Olympus DP72 camera. The number of BrdU+ cells within the gap and at the edge of the lesion was quantified with the image J software (https://imagej. nih.gov/ij/index.html).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the Kruskall-Wallis test. Statistical significance was established at $p<0.05$.

Results

We used an adaptation of a method previously described for extraction and culture of astrocytes [16] in order to obtain primary cultures from brain embryos. Using this or similar procedures, we have been able to obtain more than 95% of GFAP+ cells with morphological characteristics of primary astrocytes in both neonatal and fetal mice as well as in adult, neonatal and fetal rats [15,18-22].

Owing to this, we have defined cell cultures obtained from 13.5 dpc brains as "mouse embryo astrocytes, MEA" in sameness to "mouse embryo fibroblasts, MEF" obtained from 13.5 dpc embryos. As occurs with MEF, in which it is unclear from which tissues originate the cells because cell cultures are prepared from whole minced embryos, we do not actually know which kind of neural cells contribute to MEA cultures, since they were obtained from whole brains.

It is presently known that, when plated at appropriate densities, MEF proliferate vigorously for several passages, and then their growth rate significantly decreases due to the presence of many senescent cells [14, 23]. In keeping with those reports, continual passage of MEF resulted in an increase in the percent of senescent cells that peaked at 6-7 passages (Figure 2A). Senescent MEF developed the large, flattened morphological phenotype characteristic of replicative senescence. In addition, induction of senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) activity, another classic hallmark of the senescent phenotype, was revealed by the accumulation of the distinctive blue staining (Figure 2B). Similarly, a progressive increase in the percent of senescent cells was also observed in primary MEA (Figure 2A). Senescent MEA displayed all the morphological characteristics of senescence, including the presence of strong SA-β-gal staining (figure 2B). However, the maximal number of senescent cells was observed at 5-6 passages in these cells. Since the culture protocol was identical for both cell types, this difference in the timing of senescence may be due to the lower growth rate of MEA that conditions a higher number of population doublings between passages. In fact, despite these slight differences in timing, the maximal number of senescent cells observed

was similar between MEF and MEA, ranging between 50-60% in most cases. Furthermore, cellular levels of p21 and p16 two of the main regulators of cellular senescence were also similar in both cell types when peak senescence was achieved (Fig 2C).

It has been also reported that, if MEF cultures are continuously passed, the "crisis" period will be eventually overcome, and cultures will resume their normal growth. In keeping with those studies, a sharp decrease in the percent of senescent MEF was observed after 6-8 passages, with almost no senescent cells present after passage 10 (Fig. 3A and 3B). As it has been also reported in the literature [24], while MEF senescence was associated with an increase in p21 expression, p21 down regulation marked the switch from primary to immortalized MEF (Fig. 3C). The decrease in p21 levels may reflect a spontaneous damage to the p53 pathway, that may lead to the outgrowth of an immortalized cell population with unlimited growth potential [25-27]. Interestingly, continual culture of primary MEA also resulted in the eventual outgrowth of immortalized cells, since no senescent cells observed beyond passage 15-20, depending on the batch of cells. The immortalization process was performed at least three separate times with each protocol, and immortalized cell cultures were generated in every case. Despite subtle variations in the time required to escape senescence, no differences were observed in the outcome of the cells, depending on the protocol of immortalization used or among the different cell lines generated and, therefore, results obtained from different batches of immortalized cells are presented throughout this study. All immortalized cells have been uninterruptedly grown for various months (typically between 3-6 months), with a maximum of 140

passages completed during more than one year of continual culture of one of the batches. No signs of senescence or apoptosis were detected at any time during these prolonged periods of culture.

As observed in MEF, p21 levels increased in senescent MEA, but, at odds with immortalized fibroblasts, they remained elevated in immortalized cells (Fig. 2C and 2D). This finding, together with the fact that increased p19, p53 and phospho-p53 levels were observed in the immortalized cells derived from primary MEA (Fig. 2D and 2E) suggests that, at odds with MEF, immortalization MEA cultures does not depend on the existence of spontaneous damage of the p53 pathway. Therefore, these differences may reflect the existence of diverse mechanisms regulating the cellular response to replicative senescence, as we previously reported between primary MEF and MEA in response to oncogenic-induced senescence [15].

Reportedly, immortalized MEF can differentiate into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages expressing typical differentiation markers [28-30]. Therefore, to further characterize the nature of the immortalized cells generated from primary MEA, we investigated the expression of different neural markers in those cells. As we previously reported [15], primary cultures of MEA obtained from 13.5 dpc mouse embryos showed intense GFAP staining (Fig. 4), while vimentin, a type III intermediate filament protein that is a major cytoskeletal component of MEF was not detected (data not shown). In addition, primary MEA also expressed SOX2, a member of the SoxB1 transcription factor family that is expressed in neural progenitor populations throughout development and is necessary to maintain a neural progenitor state [31]; while either NeuN or MBP staining were barely detected in these cells (Fig. 4). In contrast with the

results obtained in primary MEA, all cellular markers were clearly detected in immortalized cells (Fig. 4). This result is in keeping with our previous findings [32] and it likely reflects the fact that the immortalization process is favoring the presence of less differentiated cells with progenitor/stem-cell characteristics.

Since a defining characteristic of NSC is its ability to form neurospheres in culture, we grown immortalized cells in a semi-synthetic medium containing both EGF and bFGF which, reportedly, can induce neurosphere formation in a NSA [12, 13]. Under these experimental conditions, we were able to induce formation of neurospheres in all cases in which batches of immortal cell lines were generated. Neurosphere formation occurred within 24 h, and they were found to have a phase bright spherical shape. As previously reported [12], neurosphere size increased with time, showing a more spherical shape with rigid micro-spikes at the periphery (Fig. 5A and 5B). When neurospheres were placed again in DMEM, they began to attach to the dish and recover the monolayer growth (Fig. 5C) that can be, potentially, maintained for an unlimited time. This process can be indefinitely repeated, since neurosphere formation can be induced by placing again monolayer cells in semi-synthetic medium with EGF and bFGF, and these neurospheres can give rise to immortalized monolayer cells after EGF and bFGF withdrawal (Fig. 5C to 5F). Strikingly, no signs of cellular senescence or apoptosis were observed at any time in any these subsets of cell populations. Monolayer cultures obtained from neurospheres consistently retained the expression of cellular markers of all neurological lineages though, interestingly, GFAP expression was visibly reduced (Fig. 5G).

Altogether, these findings suggest that we have generated a population of immortalized cells that display defining characteristic of multipontent cells. However, one of the main tenets of neurospheres, is the fact that they contain both NSC and more committed progenitors. Although we do not know whether all the cells present in the neurospheres are *bona fide* NSC, it is important to point out that they retain their capability of self-renewal over a long-time period, together with the capacity to give rise to cells which express characteristic markers of all neural lineages. To further investigate whether those characteristics are restricted to neurospheres obtained from immortalized cells, we generated a different population of neurospheres obtained, in this case, from primary MEA. As shown in figure 6, culture of primary MEA in semi-synthetic medium containing both EGF and bFGF resulted in the formation of neurospheres, with similar characteristics to those indicated above, including the recovery of monolayer growth when placed in DMEM (data not shown). However, at odds with the results obtained with neurospheres formed from immortalized cells, a significant number of monolayer cells formed from primary neurospheres underwent senesce after only two passages, with the maximal number of senescent cells observed after 4 passages (Fig. 6B and 6C). Both the timing and the number of cells undergoing senescence were similar to those observed when primary MEA were continually cultured, and also resemble the reported characteristics of primary neurospheres that cannot maintained for long periods [10,13]. Therefore, these findings suggest that the neurospheres originated from immortalized cells display different characteristics from those originated from primary cells, that could reflect the existence of a more homogeneous population of *bona fide* NSC in the former. Strikingly, as occurred

with primary MEA, some of the cells growth from primary neurospheres were able to overcome senescence after 12 passages, with almost no senescent cells observed at passage 14, thus reinforcing the fact that primary neurospheres contain cells with unlimited growth potential, together with more committed cells with limited growth capacity.

Finally, to further investigate the long-term proliferative potential of the immortalized cell lines generated, we analyzed the effect of continual passaging on the proliferation rate. It has been reported that other cell types immortalized with the 3T3 protocols such as MEF [14] or Schwann cells [33] maintain a constant proliferative rate in culture. However, at odds with those findings, we found an increase in the rate of cell proliferation with continual passaging in all batches of immortalized cells investigated. Though some differences were observed depending on the batch, the increase in the growth rate usually occurred at about 30 passages. Owing to this, and to better characterize the differences observed, we considered two different conditions, termed low passage immortalized cells (less than 30 passages, typically between 20 and 25 passages) and high passage immortalized cells (more than 30 passages, typically between 80-100 passages). As figures 7A and 7B show, the rate of proliferation was significantly increased in low passage immortalized cells as compared with primary cells, but their growth rate was significantly lower than in high passage immortalized cells. Furthermore, although flat, polygonal cells were still present high passage cells, many of these cells displayed distinct morphological modifications, including the presence of multinucleated cells with very large cytoplasms (Fig. 7C). Overall, these changes in cellular appearance resembled those observed in primary MEA in response to oncogenic-induced

senescence [15]. The existence of a higher proliferative rate in high passage cells was confirmed by measuring the amount of BrdU incorporation (Fig. 8). Both under basal conditions and in response to a wound healing assay, a significant increase in the number of BrdU+ cells was observed in immortalized cells as compared with controls, with the highest BrdU staining observed in high passage immortalized cells.

Discussion

In this report, we describe the generation of a cell line that displays *bona fide* NSC-like characteristics and may provide an invaluable tool to supply a consistent and renewable source of undifferentiated CNS precursors. The isolation of NSC from embryonic day 14-mouse brain tissue has been previously reported by Azari et al. [12] by using the neurosphere assay. Although the neurospheres generated with this method contain both *bona fide* NSC and more restricted progenitors, they can be passaged to expand the number of NSC. However, primary neurospheres that cannot be maintained for extended periods [10, 13], even if more effective isolation methods, such as the neural-colony forming cell assay, are used [34]. On the contrary, the immortalized cells reported in this study can be indefinitely cultured and, depending on the growing conditions, can be induced to form neurospheres or to differentiate to cells expressing characteristic markers of all neural lineages. These characteristics fulfil the two hallmarks of multipotent cells: the ability to proliferate over an extended period of time and to differentiate into the primary cell types of the tissue from which it is obtained [35, 36].

In addition to provide a novel model for neuroregeneration studies, these immortalized cells can be used as an alternative model to investigate the mechanisms underlying replicative senescence. In fact, when cultured MEF are placed on a 3T3 protocol, immortal cells emerge at low frequency, giving rise to established 3T3 cell lines, while we have found that explanted MEA placed on similar culture protocols give rise to eventually immortal cells with a 100% oddity. Although the precise characterization of the molecular mechanisms responsible for the ability to overcome senescence in primary MEA are beyond the purpose of this work, we have found that immortalized MEA retain both p19 and p53 activity (as also demonstrated by the increase in p21 levels observed), at odds with immortalized MEF in which mutation of p53 is a must to escape from replicative senescence. Interestingly, we have found that primary MEA also show significant differences in oncogenic induced senescence when compared with primary MEF [15, 37]. In fact, while DNA damage response to oncogene activation is similar in both cell types, significant levels of oncogene-induced senescence (OIS) are only detected in MEF, thus demonstrating that truthful activation of DDR is uncoupled with OIS in primary MEA. Since we have found, in the present work, that replicative senescence is also absent in immortalized MEA with straight activation of the p53 pathway, it ca be hypothesized that the mechanisms that regulate the senescence response to cellular damage may differ depending on the cell type investigated. In this regard, it is interesting to point that Schwann cells can be also expanded indefinitely in culture while maintaining checkpoints normally lost during the immortalization process [33].

Finally, it is also interesting to notice that, as the number of replications increase, immortalized cells show important phenotypical modifications including a higher proliferative rate. This is another significant difference with immortalized MEF, which maintain their proliferative rate and do not show signs of cellular transformation throughout the culture time, but also with that Schwann cells that can be expanded indefinitely while maintaining their proliferation rate [33]. Further studies are now in progress to investigate the ultimate fate of immortalized NSC.

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Acknowledgements

The expert technical help of Ana Senra is greatly acknowledged. This work was supported in part by grants from Xunta de Galicia (GPC2014/030) and Instituto de Salud Carlos III (2015PI15/01129). The authors declare no potential conflicts of interest

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

References

1. Temple, S. (1989). Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. *Nature*, 340, 471-473.

2. Reynolds, BA., Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science, 255, 1707-1710.

3. Davis, A.A., Temple, S. A. (1994). Self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature*, 372, 263-266.

4. Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Craig, C.G., et al. (1994). Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*, 13, 1071-1082.

5. Altman, J., Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 124, 319-335.

6. Paton, JA., Nottebohm, F.N. (1984). Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*, 225, 1046-1048.

7. Andressen, C. (2013). Neural stem cells: from neurobiology to clinical applications. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 14, 20-28.

8. Bellenchi, G.C., Volpicelli, F., Piscopo, V., Perrone-Capano, C., di Porzio, U. (2013). Adult neural stem cells: an endogenous tool to repair brain injury? *Journal of Neurochemistry*, 124, 159-67.

9. Wang, C., Lu, CF., Peng, J., Hu, C.D., Wang, Y. (2011). Roles of neural stem cells in the repair of peripheral nerve injury. *Neural Regeneration Research*, 12, 2106-2112.

10. Reynolds, B.A., Rietze, R.L. (2005). Neural stem cells and neurospheres. Reevaluating the relationship. *Nature Methods*, 2, 333-336.

11. Rietze, R.L., Reynolds, B.A. (2006). Neural stem cell isolation and characterization. *Methods in Enzymology*, 419, 3-23.

12. Azari, H., Rahaman, M., Sharififar, S., Reynolds, B.A. (2010). Isolation and Expansion of the Adult Mouse Neural Stem Cells Using the Neurosphere Assay. *Journal of Visualized Experiments*, 45, 2393.

13. Azari, H., Sharififar, S., Rahman, M., Ansari, S., Reynolds, B.A. (2011). Establishing embryonic mouse neural stem cell culture using the neurosphere assay. *Journal of Visualized Experiments*, 2457.

14. Todaro, G.J., Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *Journal of Cell Biology*, 17, 299-313.

15. Seoane, M., Costoya, J.A., Arce, V.M. (2017). Uncoupling Oncogene-Induced Senescence (OIS) and DNA Damage Response (DDR) triggered by DNA hyper-replication: lessons from primary mouse embryo astrocytes (MEA). *Scientific Reports*, 7, 12991.

16. Schildge, S., Bohrer, C., Beck, K., Schachtrup, C. (2013). Isolation and Culture of Mouse Cortical Astrocytes. *Journal of Visualized Experiments*, 71, 50079.

17. Xu, J. (2005). Preparation, Culture, and Immortalization of Mouse Embryonic Fibroblasts. *Current Protocols in Molecular Biology*, 28, 28.1.

18. Barca, O., Ferré, S., Seoane, M., et al. (2003). Interferon beta promotes survival in primary astrocytes through phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Neuroimmunololy*, 139, 155-159.

19. Barca, O., Costoya, J.A., Señarís, R.M., Arce, V.M. (2008). Interferon-beta protects astrocytes against tumour necrosis factor-induced apoptosis via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Experimental Cell Research*, 314, 2231-2237.

20. Barca, O., Seoane, M., Señarís, R.M., Arce, V.M. (2013). Fas/CD95 ligation induces proliferation of primary fetal astrocytes through a mechanism involving caspase 8-mediated ERK activation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 32, 111-120.

21. Seoane, M., Iglesias, P., Gonzalez, T., et al. (2008). Retinoblastoma loss modulates DNA damage response favoring tumor progression. *Public Library of Science One*, e3632.

22. Ríos, M., Foretz, M., Viollet, B., et al. (2013). AMPK activation by oncogenesis is required to maintain cancer cell proliferation in astrocytic tumors. *Cancer Research* 73, 2628-2638.

23. Campisi, J. (1997). The biology of replicative senescence. *European Journal of Cancer*, 33, 703-709.

24. Rizzo, M., Evangelista, M., Simili, M., Mariani, L., Pitto, L., Rainaldi, G. (2011). Immortalization of MEF is characterized by the deregulation of specific miRNAs with potential tumor suppressor activity. *Aging*, 3, 665-671.

25. Harvey, D.M., Levine, A.J. (1991). p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes and Development* 5, 2375-2385.

26. Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., et al. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*, 91, 649-659.

27. Roussel, M.F. (2002). p53: regular or super. *Cancer Cell*, 2, 434-435.

28. Sabatini, F., Petecchia, L., Tavian, M., et al. (2005). Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Laboratory Investigation*, 85, 962-971.

29. Lorenz, K., Sicker, M., Schmelze,r E., et al. (2008). Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Experimental Dermatology*, 17, 925-932.

30. Blasi, A., Martino, C., Balducci, L., et al. (2011). Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. *Vascular Cell*, 3, 5.

31. Zhang, S., Cui, W. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World Journal of Stem Cells*, 6, 305-311.

32. Almengló, C., Devesa, P., Devesa, J., Arce, V.M. (2017). GPE Promotes the Proliferation and Migration of Mouse Embryonic Neural Stem Cells and Their Progeny In Vitro. *International Journal of Molecular Science*, 18,1280.

33. Mathon, N.F., Malcolm, D.S., Harrisingh, M.C., Cheng, L., Lloyd, A.C. (2001). Lack of replicative senescence in normal rodent glia. *Science*, 291, 872-875.

34. Azari, H., Louis, S.A., Sharififar, S., Vedam-Mai, V., Reynolds, B.A. (2011). Neural-colony forming cell assay: an assay to discriminate bona fide neural stem cells from neural progenitor cells. *Journal of Visualized Experiments*, 49, 2639.

35. Potten, C.S., Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*, 110,1001-1020.

36. Gage, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*, 287, 1433-1438.

37. Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88, 593-602.

Figure legends

Figure 1. Protocol used for cell immortalization. MEA obtained from 13.5 dpc mouse embryos were seeded in polystyrene flasks and cultured according with the 3T3 protocol or a modification of it (see materials and methods for further details). Continual passaging of primary cultures resulted in the generation of immortalized cells that, depending on the culture conditions, could be used for neurosphere formation or grown for an indefinitely period. MEF immortalization was performed with the same protocol, but no long-term cultures of MEF were generated.

Figure 2. Induction of replicative senescence in MEF and MEA. A. Continual passaging of both MEF and MEA resulted in an increase in the percent of senescent cells, with the maximal levels observed at 6-7 (MEF) or 5-6 (MEA) passages. Senescent cells were scored by the presence of distinct SA-β-gal staining. Each bar represents the mean±SEM of 3 experiments in triplicate. *=p<0.05 vs day 3. **B.** Representative images or results presented in panel A. **C.** Cellular levels of p21 and p16 in both MEF and MEA at the time of senescence peak. Despite the subtle timing differences, both cellular models expressed similar levels of both p21 and p16 when the maximal percent of senescent cells was present.

Figure 3. Continual passaging of MEF or MEA results in the eventual outgrowth of immortalized cells. A. A sharp decrease in the percent of senescent cells was observed after 7-8 passages in both MEF and MEA, and no senescent cells were observed after 10-12 passages (MEF) or 15-20 passages (MEA). Senescent cells were scored by the presence of distinct SA-β-gal staining. *=p<0.05 vs passages 1 and 10 (MEF) or 1 and 20 (MEA). **B.**

Representative images showing SA-β-gal staining in primary (1 passage), senescent (4 passages) and immortalized (10 or 20 passages). **C.** Cellular levels of p53, phospho-p53 and p21 in primary, senescent or immortalized MEF. **D.** Cellular levels of p19, p53 and phospho-p53 in primary, senescent or immortalized MEA. **E.** Cellular levels of p21 in primary, senescent or immortalized MEA. In all cases, α-tubulin was used as housekeeping.

Figure 4. Expression of neural markers in primary and immortalized MEA. Primary and immortalized MEA were labelled with antibodies directed against GFAP, NeuN, MPB or SOX2. Primary cells showed strong GFAP and SOX2 immunoreactivity, while NeuN and MBP staining was almost absent. In contrast, all markers were clearly detected in immortalized cells.

Figure 5. Generation of neuropheres from immortalized cells. A. Immortalized cells were places in semi-synthetic medium containing EGF and bFGF. Neurosphere formation was observed after 24 h and neurosphere size increased with time. **B.** Neurospheres showed a bright spherical shape with rigid micro-spikes at the periphery. **C to D**. When neurospheres were placed again in DMEM, they began to attach to the dish and recover the monolayer growth (C). Neurosphere formation can be induced again by placing monolayer cells in semi-synthetic medium with EGF and bFGF (D), and these neurospheres can give rise to immortalized monolayer cells after EGF and bFGF withdrawal (E, F). Theoretically, this process can be indefinitely repeated. **G.** Monolayer cultures obtained from neurospheres retained the expression of cellular markers of all neurological lineages, although GFAP expression is decreased.

Figura 6. Neurospheres originated from primary MEA show different characteristics than those obtained from immortalized cells. A. Protocol of neurosphere generation from primary MEA. Primary cells were placed in semi-synthetic medium containing EGF and bFGF to induce neurosphere formation. Primary neurospheres were then placed in DMEM to induce monolayer growth and continually passaged under a 3T3 protocol. **B.** Continual passaging of primary MEA resulted in an increase in the percent of senescent cells, with the maximal levels observed at 4 passages. A sharp decrease in the percent of senescent cells was observed after this, and almost no senescent cells were observed after 14 passages. Senescent cells were scored by the presence of distinct SA-β-gal staining. Each bar represents the mean±SEM of 2 experiments in duplicate *=p<0.05 vs passage 2. **C.** Representative images of results presented in panel B.

Figure 7. Long-term cultures of immortalized NSC show increased growth rate. A. Cells were fixed and stained with 0.1% violet crystal and Dye content was quantified in a spectrophotometer. Each bar represents the mean±SEM of 3 experiments in triplicate. *=p<0.05 vs primary cells; #=p<0.05 vs low passage immortalized cells. **B.** Representative images of results shown in panel A. **B.** High passage immortalized cells displayed significant morphological changes including the presence of giant cells with multinucleated nulei.

Figure 8. Long-term cultures of immortalized NSC show increased BrdU incorporation. A. Cells were then serum-starved for 48h and BrdU was given for 2.5 h. BrdU+ cells were detected by immunocytochemistry. Each bar represents the mean±SEM of 3 experiments in triplicate. *=p<0.05 vs primary cells; #=p<0.05 vs low passage immortalized cells. **B.** Representative images of

results presented in panel A. **C.** BrdU+ cells were determined in a wound healing assay. Each bar represents the mean±SEM of 2 experiments in duplicate. *=p<0.05 vs primary cells; #=p<0.05 vs low passage immortalized cells. **D.** Representative images of results presented in panel C.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Click here to download Figure Figure 1.tif

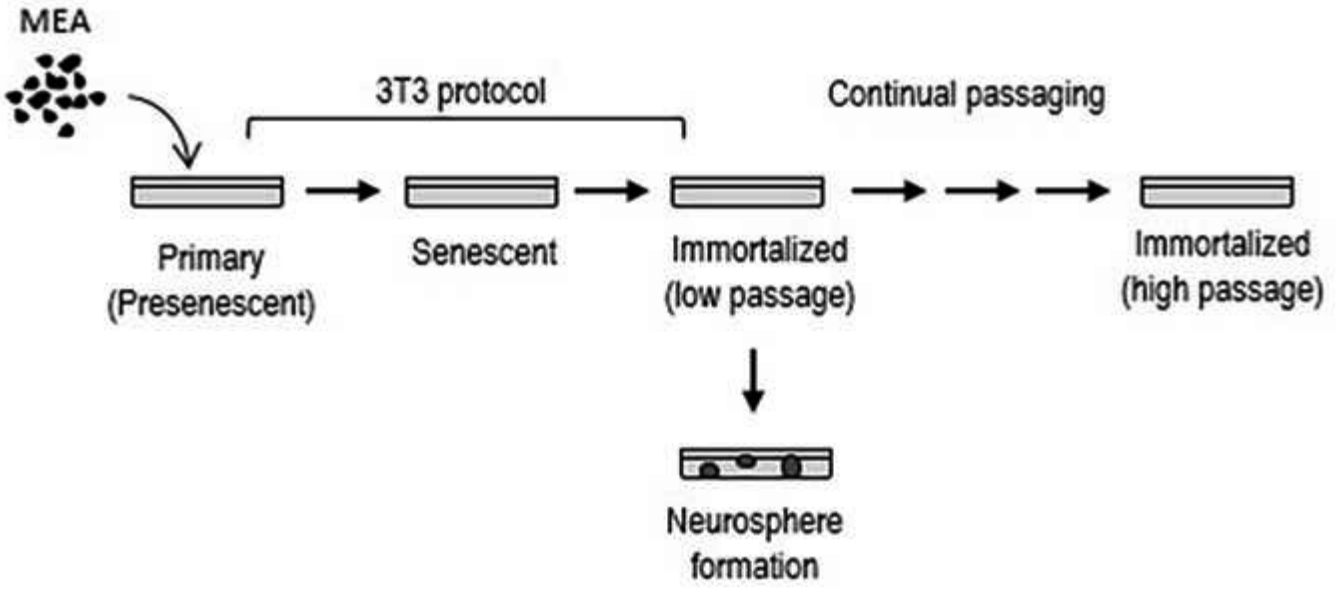

Figure 1

Figure

Click here to download Figure Figure 2.tif

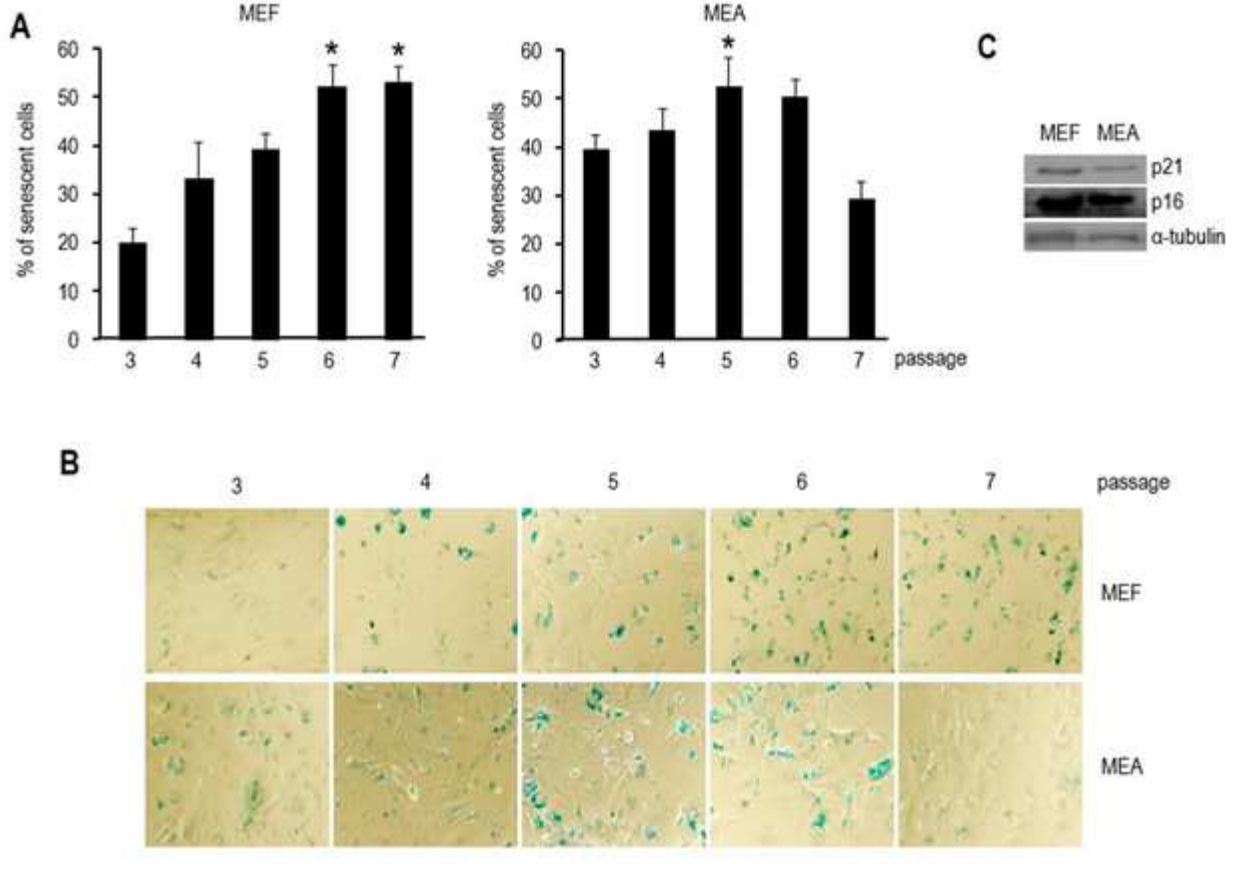

Figure 2

Figure

Click here to download Figure Figure 3.tif

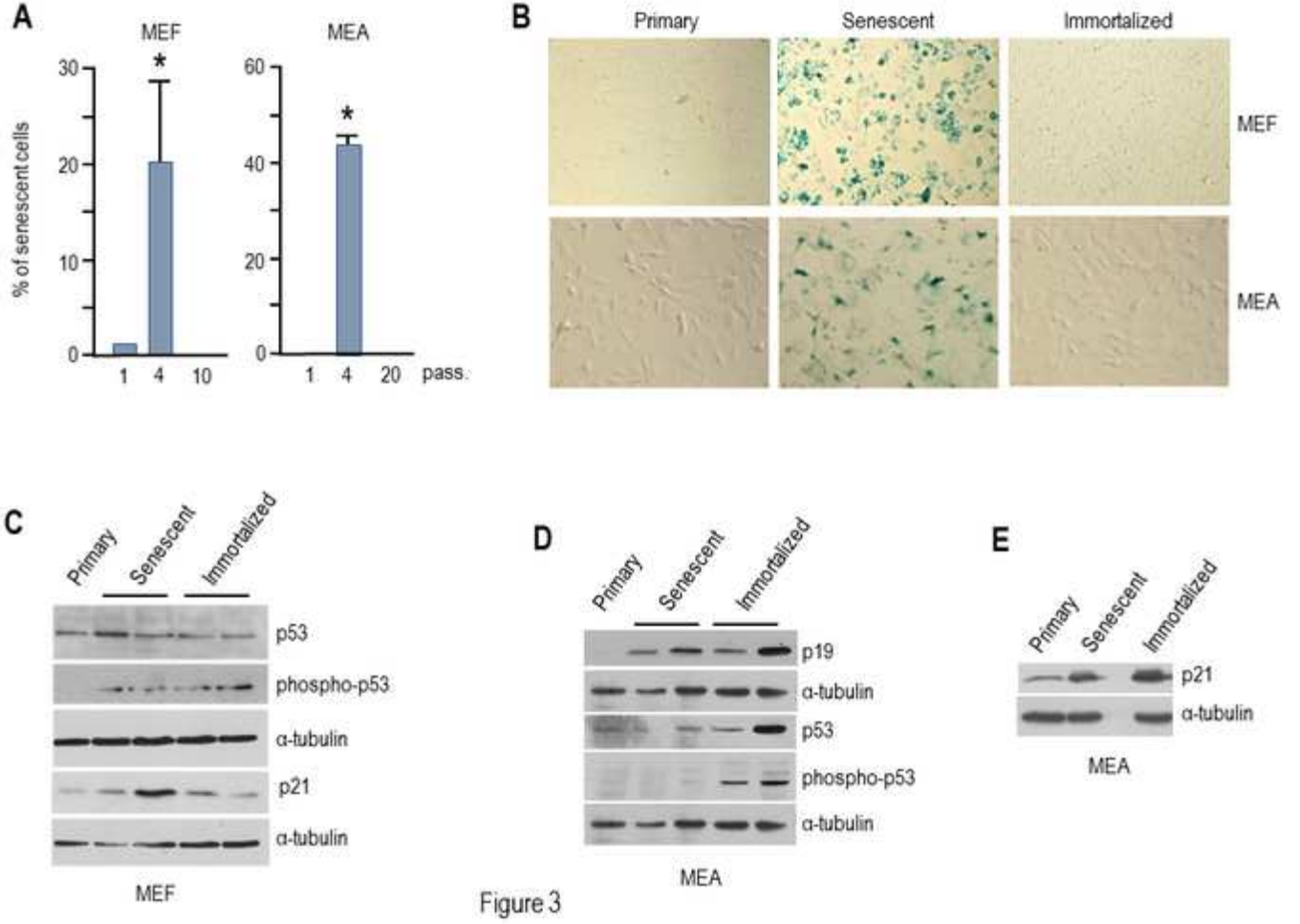

Figure 3

Figure

Click here to download Figure Figure 4.tif

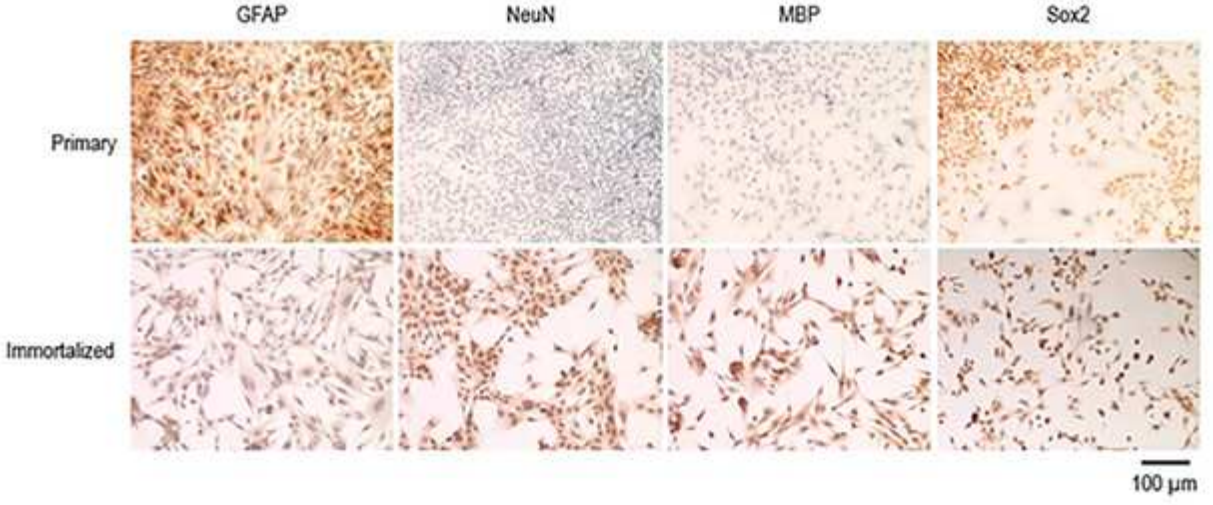

Figure 4

Figure

Click here to download Figure Figure 5.tif

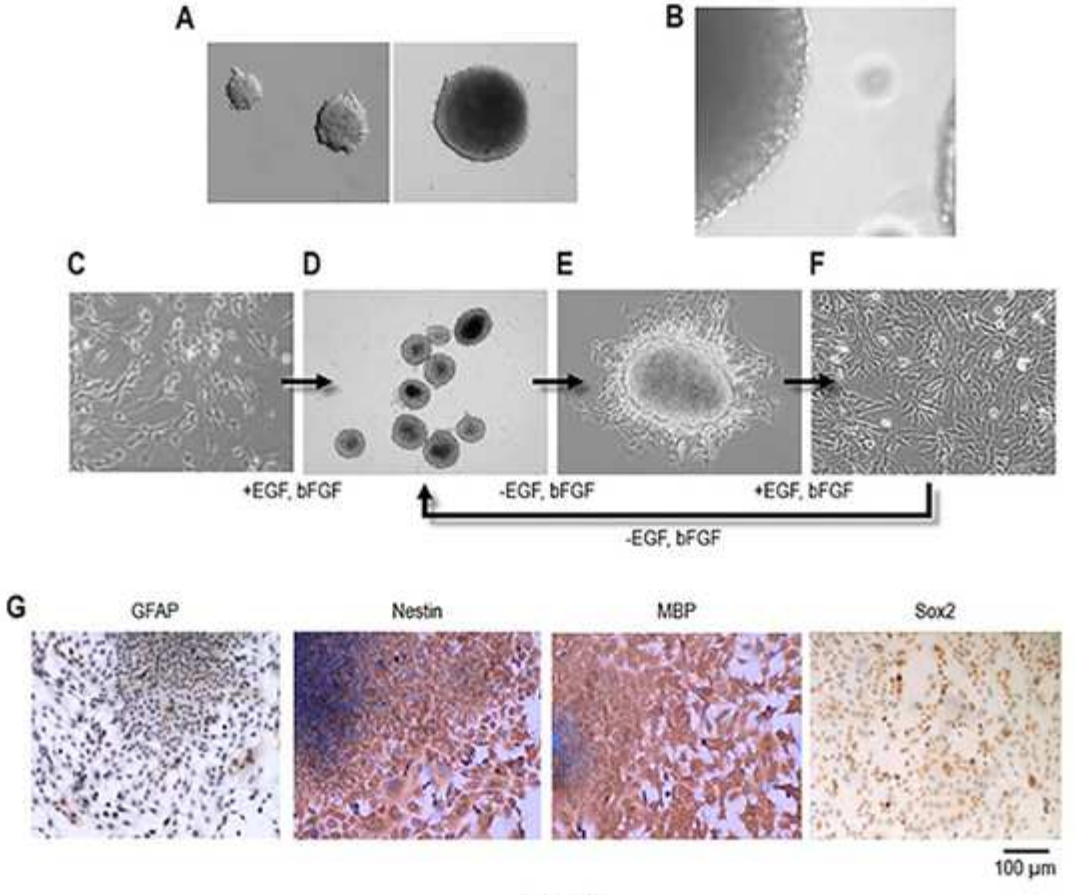

Figure 5

Figure

Click here to download Figure Figure 6.tif

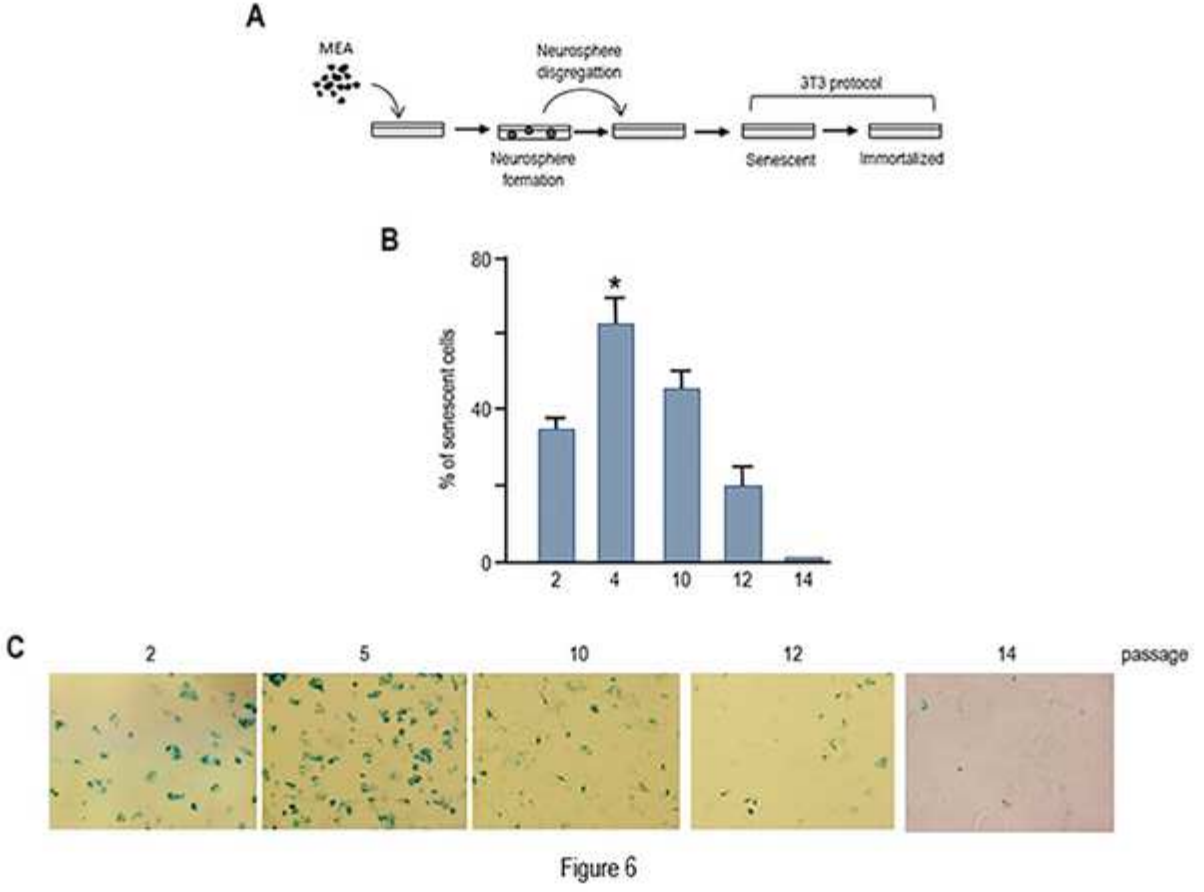

Figure 6

Figure

Click here to download Figure Figure 7.tif

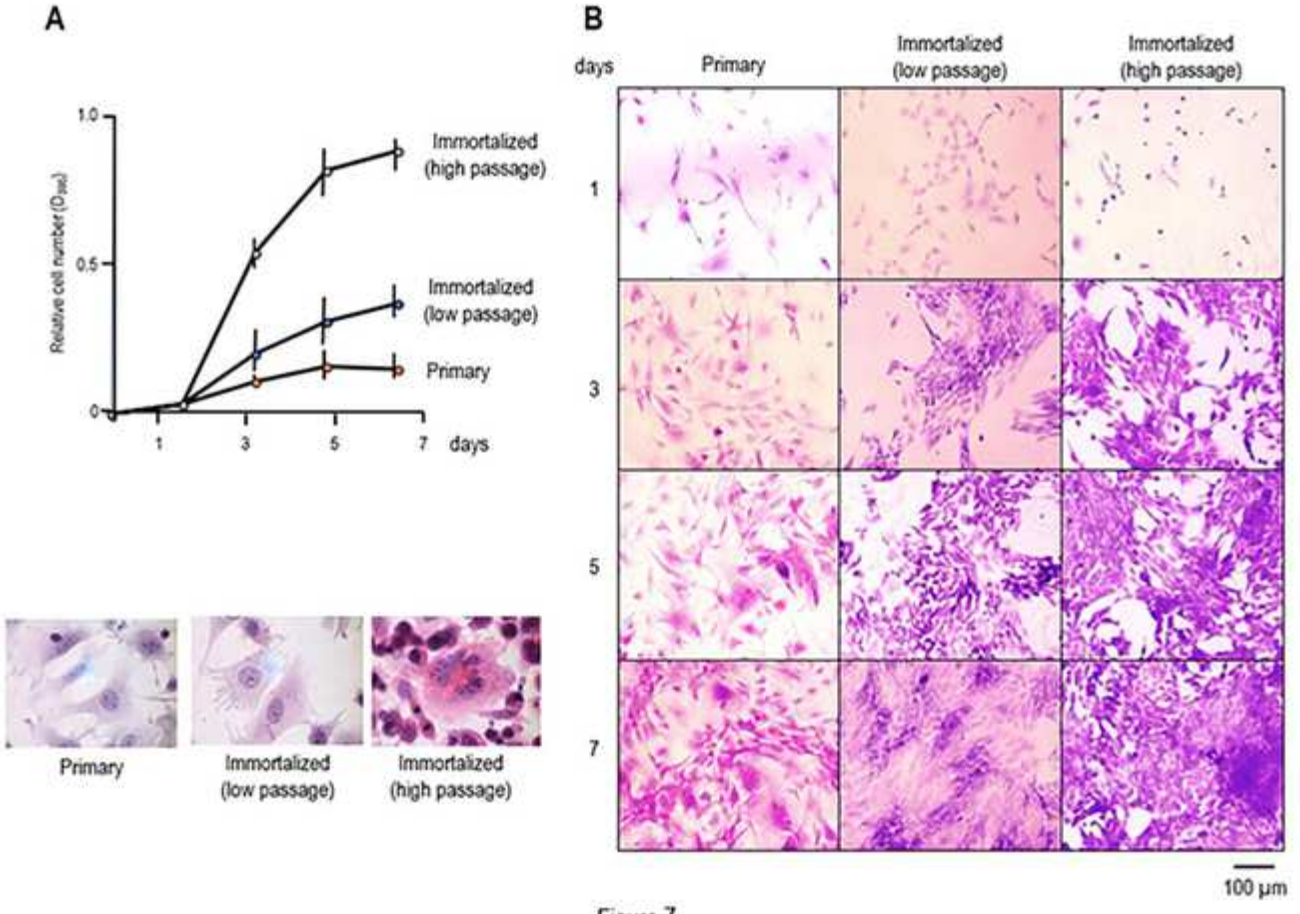

Figure 7

Figure

Click here to download Figure Figure 8.tif

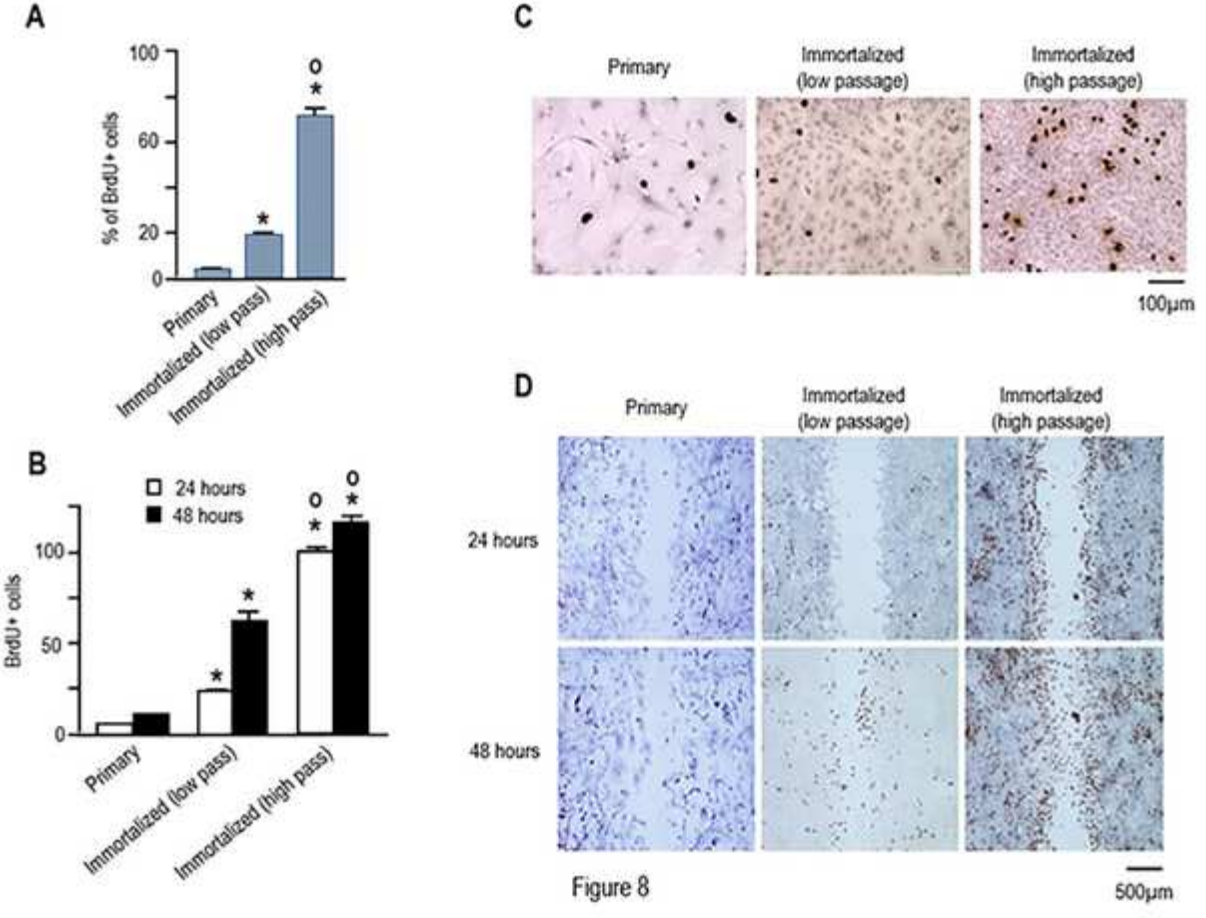

Figure 8