



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Valentín
Estévez Souto

Tesis doctoral

Actividad paracrina de las
vesículas extracelulares (VE)
secretadas por células
tumORAles senescentes

Santiago de Compostela, 2024

Programa de doctorado en Medicina Molecular

TESIS DOCTORAL

**ACTIVIDAD PARACRINA DE LAS
VESÍCULAS EXTRACELULARES (VE)
SECRETADAS POR CÉLULAS
TUMORALES SENESCENTES**

Autor

Valentín Estévez Souto

Directores: Manuel Collado Rodríguez y Sabela Da Silva Álvarez

Tutor: Anxo Vidal Figueroa

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, el grupo de investigación de Senescencia Celular, Cáncer y Envejecimiento del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) recibió financiación procedente del Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN/AEI/FEDER, UE [PID2021-125479OB-I00]) y de Axencia Galega de Innovación (GAIN, Xunta de Galicia [IN607B, 2024/13])



CONFLICTO DE INTERÉS

Valentín Estévez Souto, autor de esta tesis, declara no tener ningún conflicto de interés.

AGRADECIMIENTOS

Quizás sea esta la parte más injusta de una tesis doctoral, ya que debe reflejar en unas pocas palabras la contribución a este proyecto de tantas y tantas personas que han pasado por aquí en estos cinco años.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, no solo por darme la oportunidad de formar parte de este maravilloso equipo, sino por toda la confianza depositada en un pobre biólogo como yo. Manuel, gracias por tu paciencia, por todos los conocimientos que me has transmitido y por tu componente humano, que sin duda vertebra este laboratorio. Sabela, gracias por aguantar todas mis locuras, por los ánimos en los momentos malos y por el apoyo incondicional que me has brindado todos estos años. Allá donde me lleve la vida, siempre me llevaré un pedacito de vosotros.

Por supuesto mis más sinceros agradecimientos a los miembros de nuestra chiquifamilia que es el Laboratorio 13. Víctor, gracias por enseñarme que la pasión no se diluye con el paso del tiempo. Migue, gracias por inundar con alegría nuestro día a día y por cantar conmigo esa canción que siempre te tarareo. Álex, gracias por seguirme todas las bromas y por compartir mi humor tan “único”. Miralles y Raquel, gracias por vuestra ilusión y por todo este apoyo que me habéis dado. No habría podido imaginar dos sustitutos mejores. A Christian, que en tan poco tiempo se ha convertido en alguien tan especial. Tenemos que recuperar ese imán, meu. Un agradecimiento especial a mi querida Patri, que aguantó siempre todas mis tonterías, desde la carrera hasta el cierre de esta etapa. El que se va a aburrir un montón cuando no trabaje contigo voy a ser yo. A Sandra, que no hay palabras, tú. Gracias por todos estos años de sincera amistad. Eres la científica más fuerte que conozco.

Como iba a olvidarme del resto de personas del IDIS que han pasado por mi vida en estos años. Gracias a mis niñas del Laboratorio 11, Raquel, María, Eloísa y en especial a Ana, por todo tu cariño, amistad y complicidad. Nunca podrás imaginar lo que te admiro. A Bárbara y Javi, los mejores compañeros de juegos de mesa de la historia. A Álex, que comparte mi pasión por Roma. También un agradecimiento especial a Carmen Rivas y a todos los miembros de su laboratorio, en especial a Yanis, que me ha demostrado que la amistad no entiende de culturas o lenguas. A mis colaboradores del CiMUS, Jorge y Eva, gracias por toda vuestra generosidad. Ha sido un placer trabajar con vosotros.

A mis amigos del colegio, en especial a Estefanía, gracias a todos por tantos años y tantos momentos vividos. A mis colegas de la resi, Xabi, Soff y Carlos, con los que siempre me encuentro en casa. A Beis, por estos años de sincera amistad y de conversaciones trascendentales. A mis amigos de Poio, Bego, Esteban, Martín y Claudia, con los que he pasado tantas horas hablando de todo y de nada. Gracias por este vínculo tan nuestro que hemos forjado. Sin vosotros, esto no habría sido posible. A Sabela, Luis, Tania, Je, Isaac e Isma, por todas las risas y los momentos buenos. A Fer, gracias por todos esos momentos tan locos que hemos vivido. A Andrea, por ser mi melliza y por compartir ese humor tan nuestro.

A mis colegas meióticos, con los que tantos momentos he compartido en la carrera. A los marisqueiros, Lucía, Raquel, Alba y Celia, por tantos buenos momentos vividos. A Javi, por tantos años de amistad y tantas charlas sobre la vida. Mil grazas meu.

A mis hermanos, Pablo, Mikaela y Miguel. Maikis, no me llegarían todas las páginas de esta tesis para decirte lo importante que eres para mí. Una amistad de tantos años no puede ser casualidad. Gracias por todo, por esta ahí siempre y por apoyarme cuando el resto no creía en mí. Siempre puñito. Mika, doy gracias todos los días por haberte ofrecido aquella sopa insípida en la resi. Gracias por aguantar todos estos años mis locuras y por siempre decirme lo orgullosa que estás de mí. Por último, al ilustre Dr. Paul Stoneside. Pablo, no existen términos en élfico, lengua ent o de los hombres para decirte lo agradecido que estoy de haberte conocido y de ser tu Passepartout. Esta amistad es para toda la vida.

A Lauri, la persona que más llena mi vida de risas y locuras. Al final conseguiste lo que nadie pudo, que me gustase la coliflor. Te quiero. A Misi, a Giogio y a Corni, que nunca me dejaron salir de casa sin pelitos en la ropa.

Y, por último, a mi extraordinaria familia, sin la cual yo no sería la persona que soy hoy. A mis tíos, en especial a Mari, Santi, Eli, Nolo y Nati, y a mis primas Paula y Adriana. A Mila y Enrique, cuyo cariño ha dejado una profunda huella en mí. A mi abuela Cloti. Abuela, gracias por criarme y por todo el amor que me has dado todos estos años. Con esta tesis acabo de estudiar, prometido. A mi abuela Pila, que nunca dudó de mi valía ni un solo momento. A mi abuelo, que siempre me deseó “suertiña” en los estudios. Ojalá pudieses estar aquí para ver que al final tuve suerte.

Pero el mayor agradecimiento de esta tesis es para mis padres, sin cuya educación y valores no habría llegado hasta aquí. Papá, gracias por siempre animarte a dar lo mejor de mí aun cuando lo único que quisiese era tirar la toalla y por animarme en todas mis locuras y proyectos. Mamá, gracias por ser siempre mi roca, por enseñarme el valor del esfuerzo y por ser la guía que necesito cuando no sé encontrar la solución. Tu eres la auténtica científica. Os quiero.

Y, por último, gracias a ti, que estás leyendo esta tesis. Espero que disfrutes tanto con estas páginas como yo he disfrutado redactándolas.

*“La ciencia se compone de errores, pero de errores útiles,
porque conducen poco a poco a la verdad”*

ÍNDICE

ABREVIATURAS	11
RESUMEN	16
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1 INTRODUCCIÓN	19
1.1 SENESCENCIA CELULAR	19
1.1.1 Tipos de senescencia celular	19
1.1.1.1 Senescencia replicativa	19
1.1.1.2 Senescencia inducida por oncogenes	19
1.1.1.3 Senescencia por estrés oxidativo.....	20
1.1.1.4 Senescencia inducida por terapia	20
1.1.2 Características y detección de la senescencia celular	20
1.1.2.1 Rutas moleculares de control de senescencia celular.....	20
1.1.2.2 Cambios morfológicos	21
1.1.2.3 Daño macromolecular asociado a senescencia	22
1.1.2.4 Expansión del compartimento lisosomal	22
1.1.2.5 Resistencia a la apoptosis.....	23
1.1.2.6 Alteraciones mitocondriales.....	23
1.1.3 El fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP)	24
1.1.3.1 Regulación del SASP	25
1.1.3.2 Funciones del SASP. Efectos antitumorales	27
<i>1.1.3.2.1 Modulación autocrina y paracrina</i>	27
<i>1.1.3.2.2 Modulación del sistema inmune</i>	27
1.1.3.3 Funciones del SASP. Efectos protumorales.....	28
<i>1.1.3.3.1 Efectos en la proliferación tumoral</i>	28
<i>1.1.3.3.2 Efectos sobre la angiogénesis</i>	29
<i>1.1.3.3.3 Efectos sobre la invasividad y la metástasis</i>	29
1.2 LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES	30
1.2.1 Nomenclatura y diversidad	30
1.2.2 Biogénesis	31

1.2.2.1 Rutas de biogénesis de EVs.....	31
1.2.2.2 Transporte y liberación.....	32
1.2.3 Interacciones con otras células	33
1.2.4 Aislamiento	36
1.2.4.1 Ultracentrifugación diferencial (<i>differential ultracentrifugation</i>).....	36
1.2.4.2 Cromatografía de exclusión por tamaño (<i>size exclusion chromatography</i>).....	36
1.2.4.3 Asymmetric Flow Field Flow Fractionation (AF4).....	37
1.2.5 Estructura molecular	37
1.2.5.1 Componentes asociados a membrana.....	37
1.2.5.2 Componentes asociados al interior de las vesículas.....	37
1.2.6 Vesículas extracelulares en senescencia	38
1.2.6.1 Cambios en la biogénesis y composición durante senescencia.....	38
1.2.6.1.1 Aumento de la biogénesis.....	38
1.2.6.1.2 ARNs.....	38
1.2.6.1.3 Proteínas.....	39
1.2.6.1.4 ADN.....	39
2 OBJETIVOS	41
3 METODOLOGÍA.....	42
3.1 CULTIVOS CELULARES	42
3.1.1 Líneas celulares	42
3.1.1.1 Células HEK-293T.....	42
3.1.1.2 Células A549.....	42
3.1.2 Tratamientos	42
3.1.2.1 Tratamientos de inducción de senescencia.....	42
3.1.2.2 Otros tratamientos.....	42
3.2 VECTORES PLASMÍDICOS.....	43
3.2.1 Cepas empleadas	43
3.2.2 Medios de cultivo bacteriano	43
3.2.3 Transformación bacteriana.....	43
3.2.4 Obtención de ADN plasmídico.....	44
3.2.5 Plásmidos utilizados.....	44
3.3 TRANSDUCCIÓN RETROVIRAL Y LENTIVIRAL	45
3.3.1 Transfección retroviral y lentiviral	45

3.3.2 Transducción retroviral y lentiviral	45
3.3.3 Selección de células transducidas.....	45
3.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	46
3.4.1 Extracción y purificación de ARN	46
3.4.2 Retrotranscripción de ARN.....	46
3.4.3 qRT-PCR.....	46
3.5 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA.....	47
3.5.1 Extracción de proteína total	47
3.5.2 Cuantificación de proteína.....	47
3.5.3 Western blot.....	47
3.6 ANÁLISIS MEDIANTE ARRAY DE CITOQUINAS.....	48
3.7 DETECCIÓN DE MARCADORES DE SENESCENCIA	49
3.7.1 Tinción SA- β -GAL cromogénica.....	49
3.7.2 Detección de actividad SA- β -GAL por citometría.....	49
3.7.3 Contaje celular	49
3.7.4 Tamaño celular	49
3.8 TINCIONES.....	49
3.8.1 EdU	49
3.8.2 Cristal violeta	50
3.8.3 Naranja de acridina.....	50
3.9 INMUNOFLUORESCENCIA	50
3.10 OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS Y VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	50
3.10.1 Obtención de medio condicionado	50
3.10.2 Ultrafiltrado	51
3.10.3 Aislamiento mediante ultracentrifugación diferencial.....	51
3.10.4 Aislamiento y purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño	51
3.11 CARACTERIZACIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS Y VESÍCULAS EXTRACELULARES .	51
3.11.1 Marcaje de vesículas extracelulares con DiO	51
3.11.2 Caracterización mediante NTA.....	52
3.11.3 Detección mediante cuantificación de proteína	52
3.11.4 Caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)....	52
3.11.5 Caracterización mediante AF4.....	52

3.12 ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD	52
3.12.1 Internalización.....	52
3.12.2 Inducción de senescencia paracrina con medios condicionados.....	53
3.13 MICROSCOPIA.....	53
3.14 SOFTWARES UTILIZADOS.....	53
3.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	53
4 RESULTADOS	54
4.1 CARACTERIZACIÓN DE SENESCENCIA POR ESTRÉS QUIMIOTERÁPICO EN A549	54
4.2 CARACTERIZACIÓN DE SENESCENCIA PARACRINA MEDIADA POR MEDIOS CONDICIONADOS DE CÉLULAS A549 SENESCENTES TRAS QUIMIOTERAPIA.....	56
4.3 EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA BIOGÉNESIS DE EVS TRAS GW4869.....	58
4.3.1 Efecto de GW4869 en células senescentes.....	58
4.3.2 Efectos en las células diana tras el uso de GW4869.....	58
4.4 CARACTERIZACIÓN DE EVS MEDIANTE DISTINTAS METODOLOGÍAS	60
4.4.1 Efecto de las EVs aisladas en la inducción de senescencia paracrina	62
4.4.2 Caracterización de EVs mediante la tecnología AF4.....	63
4.5 MODULACIÓN GENÉTICA DE LA BIOGÉNESIS DE EVS	64
4.5.1 Caracterización de las líneas celulares con niveles reducidos de <i>RAB27A</i>	64
4.5.2 Reducción de los niveles de EVs tras sh <i>RAB27A</i>	66
4.5.3 Caracterización de las líneas celulares con niveles reducidos de <i>mTOR</i>	67
4.5.4 Efecto de la modulación genética de EVs en células diana	67
4.6 MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA BIOGÉNESIS DE EVS	69
4.6.1 Caracterización del efecto de los fármacos en las células productoras.....	69
4.6.2 Efecto de los medios condicionados derivados del tratamiento farmacológico	71
4.6.3 Arrastre de BAFA1 en los medios condicionados	73
4.7 INHIBICIÓN DE LA ENDOCITOSIS	74
4.8 MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE INNATO	76
4.8.1 Caracterización de la línea celular con niveles reducidos de <i>RELA</i>	77
4.8.2 Modulación de cGAS-STING	77
4.8.3 Efectos de la modulación del sistema inmune innato en las células diana.....	79
5 DISCUSIÓN	81
6 CONCLUSIONES	87
7 BIBLIOGRAFÍA	88

ANEXOS	114
ÍNDICE DE FIGURAS.....	115
ÍNDICE DE TABLAS.....	117
DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE LAS FIGURAS	118
FIGURAS SUPLEMENTARIAS	119
GRÁFICOS DE CITOMETRÍA.....	119

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
A549	<i>Human Lung Adenocarcinoma Cell Line</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	<i>Adenosine diphosphate</i>
AF4	<i>Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation</i>
ALIX	<i>ALG-2-Interacting protein X</i>
AMP	<i>Adenosine monophosphate</i>
AMPK	<i>5' Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase</i>
AREG	<i>Amphiregulin</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATM	<i>Ataxia-Telangiectasia Mutated</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3-related Protein</i>
B	Bleomicina
BAFA1	Bafilomicina A1
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C₁₂FDG	<i>5-dodecanoylamino fluorescein Di-β-D-galactopyranoside</i>
CAV1	<i>Caveolin-1</i>
CCFs	<i>Cytoplasmic Chromatin Fragments</i>
CCL2	<i>C-C motif Chemokine 2</i>
CD226	<i>Antigen CD226</i>
CD63	<i>Antigen CD63</i>
CD81	<i>Antigen CD81</i>
CD86	<i>Antigen CD86</i>
CD9	<i>Antigen CD9</i>
CDK4/6	<i>Cyclin-Dependent Kinase 4/6</i>
CDKi	<i>Cyclin-Dependent Kinase inhibitor</i>
CDKN1A	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
cGAS	<i>Cyclic GMP-AMP Synthase</i>
CHK1	<i>Checkpoint Kinase 1</i>

CHK2	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
CLIC	<i>Clathrin-Independent Carriers</i>
CM	<i>Conditioned Media</i>
CME	<i>Clathrin-Mediated Endocytosis</i>
CTFG	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
CXCL1	<i>C-X-C motif Chemokine Ligand 1</i>
CXCL2	<i>C-X-C motif Chemokine Ligand 2</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-fenilindol</i>
DDR	<i>DNA Damage Response</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA-SCARs	<i>DNA Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence</i>
DNASE2	<i>Deoxyribonuclease II</i>
Doxi	<i>Doxiciclina</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
dUC	<i>Differential Ultracentrifugation</i>
E2F	<i>Early region 2 binding Factor</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EdU	<i>5-ethynyl-2'-deoxyuridine</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EMT	<i>Epithelial to Mesenchymal Transition</i>
EpH4	<i>Primary murine mammary epithelial cells</i>
EPHA2	<i>Ephrin type-A receptor 2</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>
EVs	<i>Extracellular Vesicles</i>
FasL	<i>Fas ligand</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FEME	<i>Fast Endophilin-Mediated Endocytosis</i>
FFF	<i>Flow Field Fractionation</i>
G3BP1	<i>Ras GTPase-activating protein-binding protein 1</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GATA4	<i>GATA Binding Protein 4</i>
GDF15	<i>Growth Differentiation Factor 15</i>

GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
H2AX	<i>H2A histone family member X</i>
H3K9me3	<i>Trimethylation of lysine 9 on histone H3</i>
H4K20me3	<i>Trimethylation of lysine 20 on histone H4</i>
HDFs	<i>Human dermal fibroblasts</i>
HEK-293T	<i>Human embryonic kidney 293 cell line</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HFFF2	<i>Human Fetal Foreskin Fibroblast 2</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HSP70	<i>Heat Shock Protein 70</i>
HSP90	<i>Heat Shock Protein 90</i>
HUVECs	<i>Human Umbilical Vein Endothelial cells</i>
IFITM3	<i>Interferon-induced Transmembrane protein 3</i>
IGFBP3	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein - 3</i>
IL-1α	<i>Interleukin 1 alpha</i>
IL-1β	<i>Interleukin 1 beta</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
IL-8	<i>Interleukin 8</i>
ILVs	<i>Intraluminal Vesicles</i>
ISG15	<i>Interferon-Stimulated Gene 15</i>
JAK-STAT	<i>Janus Kinase-Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LC3B	<i>Microtubule-associated proteins 1A/1B Light Chain 3B</i>
IEVs	<i>Large Extracellular Vesicles</i>
LMNB1	<i>Lamin B1</i>
MDM2	<i>Murine Double Minute 2</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein Kinase</i>
MHC-I	<i>Major Histocompatibility Complex class I</i>
MHC-II	<i>Major Histocompatibility Complex class II</i>
miARN	<i>microARN</i>
MICA	<i>MHC class I polypeptide-related sequence A</i>
MiDAS	<i>Mitochondrial Dysfunction-Associated Senescence</i>
MK2	<i>Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2</i>
MMP1	<i>Matrix Metalloproteinase 1</i>

MMP2	<i>Matrix Metallopeptidase 2</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MVB	<i>Multivesicular Body</i>
MβCD	<i>Methyl-β-cyclodextrin</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NG2D	<i>Natural Killer Group 2 member D</i>
NOTCH1	<i>Neurogenic Locus Notch homolog protein 1</i>
N-SMase	<i>Neutral Sphingomyelinase</i>
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
NVEPs	<i>Non-Vesicular Extracellular Particles</i>
OIS	<i>Oncogene-Induced Senescence</i>
OPN	<i>Osteopontin</i>
p38MAPK	<i>p38 Mitogen Activated Protein Kinase</i>
PARP1	<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 1</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGFA	<i>Platelet-Derived Growth Factor A</i>
PEI	<i>Polyethylenimine</i>
PML	<i>Promyelocytic Leukemia</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Real Time PCR</i>
RAB27A	<i>Ras-related protein RAB27A</i>
RAB27B	<i>Ras-related protein RAB27B</i>
RAB5B	<i>Ras-related protein RAB5B</i>
RAB7	<i>Ras-related protein RAB7</i>
RAPA	<i>Rapamicina</i>
RAS	<i>Rat sarcoma virus</i>
Rb	<i>Retinoblastoma protein</i>
RELA	<i>REL-associated protein</i>
RFP	<i>Red Fluorescent protein</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>

ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	Revoluciones por minuto
SAHF	<i>Senescence-Associated Heterochromatin Foci</i>
SASP	<i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i>
SA-β-GAL	<i>Senescence-Associated β-Galactosidase</i>
Scr	<i>Scramble</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
SERPINE1	<i>Serpin family E member 1</i>
sEVs	<i>Small Extracellular Vesicles</i>
shARN	<i>Short hairpin ARN</i>
SN	Sobrenadante
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
STING	<i>Stimulator of Interferon Genes</i>
TCA	<i>Tricarboxylic Acid Cycle</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TIMP1	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 1</i>
TIS	<i>Therapy-Induced Senescence</i>
TNBC	<i>Triple Negative Breast Cancer</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TREX1	<i>Three-prime Repair Exonuclease 1</i>
TSG101	<i>Tumor Susceptibility 101</i>
ULBP2	<i>UL16 Binding Protein 2</i>
VCAM1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VSMCs	<i>Vascular smooth muscle cells</i>
WNT	<i>Wingless-related integration site</i>
WT	Wild Type
X-Gal	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactoside</i>

RESUMEN

La senescencia celular se define como una parada estable del ciclo celular en respuesta a múltiples tipos de estrés. Durante esta parada estable, numerosos factores son secretados por las células senescentes, lo que constituye un fenotipo secretor propio que se conoce como fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP). Dentro de este conjunto de factores podemos distinguir una fracción soluble, así como una fracción formada por vesículas extracelulares (EVs). Durante senescencia, se ha descrito un aumento significativo en la producción y liberación de EVs, lo que sugiere que pueden desempeñar un papel relevante durante este estado celular.

En el contexto del cáncer, al SASP se le han descrito tanto funciones antitumorales como protumorales. Una de las funciones antitumorales descritas es la inducción de senescencia paracrina, lo que permite limitar la progresión tumoral. A pesar de su relevancia, la contribución relativa de cada uno de los componentes del SASP a este proceso es contradictoria, por lo que el interés de esta tesis es el de clarificar el papel de estos componentes para identificar cual es el agente causal de este proceso. Para ello, hemos diseccionado el SASP con distintas metodologías, tratamientos farmacológicos y modificaciones genéticas.

En primer lugar, hemos caracterizado la inducción de senescencia paracrina mediada por el medio condicionado de células A549 senescentes. Tras esto, modulamos la biogénesis de las EVs con el inhibidor GW4869 para estudiar la contribución de estas vesículas a la inducción de senescencia paracrina. Para seguir caracterizando el papel de estas vesículas, separándolas del resto de componentes del SASP, hemos empleado distintas metodologías de aislamiento como ultracentrifugación diferencial (dUC) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Tras esto, hemos modulado la expresión de genes implicados en la biogénesis de las EVs, como *RAB27A* y *mTOR*, además del empleo de inhibidores farmacológicos con el mismo propósito. Con el fin de estudiar si la internalización es un factor importante en este proceso, hemos inhibido las rutas de endocitosis mediante una aproximación farmacológica. Finalmente, hemos modulado la expresión de los genes *cGAS*, *STING* y *RELA* en células A549 para comprobar si estas rutas de señalización contribuyen al establecimiento de la senescencia paracrina.

En definitiva, nuestros datos sugieren que las EVs derivadas de células senescentes son importantes mediadoras de la inducción de senescencia paracrina en células A549 tras quimioterapia.

RESUMO

A senescencia celular defínese como unha parada estable do ciclo celular en resposta a múltiples tipos de estrés. Durante esta parada estable, numerosos factores son secretados polas células senescentes, o que constitúe un fenotipo secretor propio coñecido como fenotipo secretor asociado á senescencia (SASP). Dentro deste conxunto de factores, podemos distinguir unha fracción soluble, así como unha fracción formada por vesículas extracelulares (EVs). Durante a senescencia, describiuse un aumento significativo na produción e liberación de EVs, o que suxire que poden desempeñar un papel relevante durante este estado celular.

No contexto do cancro, ao SASP describíronlle tanto funcións antitumorais como protumorais. Unha das funcións antitumorais descritas é a indución de senescencia paracrina, o que permite limitar a progresión tumoral. A pesar da súa relevancia, a contribución relativa de cada compoñente do SASP a este proceso é contraditoria, polo que o interese desta tese é clarificar o papel de cada un deles para identificar cal é o axente causal deste proceso. Para iso, separamos os compoñentes do SASP con distintas metodoloxías, tratamentos farmacolóxicos e modificacións xenéticas.

En primeiro lugar, caracterizamos a indución de senescencia paracrina mediada polo medio condicionado de células A549 senescentes. Tras isto, modulamos a bióxénese das EVs co inhibidor GW4869 para estudar a contribución destas vesículas á indución de senescencia paracrina. Para continuar caracterizando o papel destas vesículas, separándoas do resto de compoñentes do SASP, empregamos distintas metodoloxías de illamento como ultracentrifugación diferencial (dUC) e cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Ademais, modulamos a expresión de xenes implicados na bióxénese das EVs, como *RAB27A* e *mTOR*, así como o uso de inhibidores farmacolóxicos co mesmo propósito. Co obxectivo de estudar se a internalización é un factor importante neste proceso, inhibimos as rutas de endocitose mediante unha aproximación farmacolóxica. Finalmente, modulamos a expresión dos xenes *cGAS*, *STING* e *RELA* en células A549 para comprobar se estas rutas de sinalización contribúen ao establecemento da senescencia paracrina.

En definitiva, os nosos datos suxiren que as EVs derivadas de células senescentes son importantes mediadoras da indución de senescencia paracrina en células A549 tras quimioterapia.

ABSTRACT

Cellular senescence is defined as a stable arrest of the cell cycle triggered by multiple types of stress. During this stable arrest, numerous factors are secreted by senescent cells, constituting a distinct secretory phenotype known as senescence-associated secretory phenotype (SASP). Within this set of factors, we can distinguish a soluble fraction as well as a fraction composed of extracellular vesicles (EVs). During senescence, a significant increase in the production and release of EVs has been described, suggesting that they may play a relevant role in this cellular state.

In the context of cancer, both antitumoral and protumoral functions have been attributed to the SASP. One of the described antitumoral functions is the induction of paracrine senescence, which limits tumor progression. Despite its relevance, the relative contribution of each SASP component to this process remains contradictory. Therefore, this thesis aims to clarify the role of each component to identify the causal agent of this process. To achieve this, we dissected the SASP using several methodologies, pharmacological treatments, and genetic modifications.

First, we characterized the induction of paracrine senescence mediated by the conditioned medium of senescent A549 cells. Following this, we modulated the biogenesis of EVs using the inhibitor GW4869 to study the contribution of these vesicles to the induction of paracrine senescence. To further characterize the role of these vesicles, separating them from other SASP components, we used different isolation methodologies, such as differential ultracentrifugation (dUC) and size-exclusion chromatography (SEC). Additionally, we modulated the expression of genes involved in the biogenesis of EVs, such as *RAB27A* and *mTOR*, along with the use of pharmacological inhibitors for the same purpose. To determine whether internalization is a key factor in this process, we inhibited endocytosis pathways using a pharmacological approach. Finally, we modulated the expression of the genes *cGAS*, *STING*, and *RELA* in A549 cells to verify whether these signalling pathways contribute to the establishment of paracrine senescence.

In summary, our data suggest that EVs derived from senescent cells are important mediators of the induction of paracrine senescence in A549 cells upon chemotherapy.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 SENESCENCIA CELULAR

La senescencia celular se define como una parada estable en el ciclo celular. Este proceso fue descrito en la década de los sesenta, con los trabajos de Hayflick, cuando demostró que los fibroblastos en cultivo tenían una capacidad de proliferación limitada (Hayflick & Moorhead, 1961). En este sentido, Hayflick definió lo que se conoce como senescencia replicativa, es decir, la inducción de senescencia celular por el acortamiento telomérico que se produce tras sucesivas divisiones celulares, lo que induce daño en el ADN (Bodnar et al., 1998; d'Adda di Fagagna, 2008; Harley et al., 1990). La senescencia celular ha sido caracterizada en un amplio abanico de grupos animales, así como en contextos fisiológicos y patológicos (Muñoz-Espín & Serrano, 2014). Durante el desarrollo, se han identificado células senescentes en distintas estructuras, lo que contribuye al desarrollo normal de los tejidos (Muñoz-Espín et al., 2013). Durante el envejecimiento, la acumulación de células senescentes supone el declive de los tejidos, y, en este contexto, su eliminación se ha relacionado con una mejoría en la función de tejidos y órganos, además de reducir las enfermedades asociadas al envejecimiento y extender la esperanza de vida máxima en modelos animales (Baker et al., 2016).

Además del estrés replicativo, otros muchos agentes pueden causar senescencia celular. Numerosos estudios han relacionado la activación oncogénica (Collado & Serrano, 2010; Serrano et al., 1997) o bien la pérdida de genes supresores de tumores (Alimonti et al., 2010; Young et al., 2008) como inductores de senescencia celular, lo que evita la proliferación de células dañadas y supone un potente mecanismo de supresión tumoral *in vivo*. Además, otros agentes como la exposición a especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species* o ROS), las radiaciones ionizantes, el reordenamiento epigenético, la disfunción mitocondrial o los agentes quimioterápicos han sido caracterizados como inductores de senescencia celular (d'Adda di Fagagna, 2008; Hernandez-Segura et al., 2018).

Todos estos trabajos subrayan la relevancia de las células senescentes en múltiples contextos. Este estado celular se ha definido como un mecanismo de defensa que evita la proliferación de células dañadas, junto con la apoptosis. Además, el papel señalizador de las células senescentes en el desarrollo y su acumulación en el envejecimiento les confiere una relevancia fundamental en la formación de tejidos y en su declive.

1.1.1 Tipos de senescencia celular

Los estímulos de inducción de senescencia celular son muy variados y dependientes del contexto celular y el estado fisiológico. Aun así, la mayoría de estos estímulos desencadena la activación de la ruta de p53/p21 y la ruta de *INK4/ARF*.

1.1.1.1 Senescencia replicativa

La senescencia replicativa fue el primer tipo de senescencia en ser descrito (Hayflick & Moorhead, 1961). Es inducida por un acortamiento telomérico tras sucesivas divisiones celulares, que conduce a un daño persistente en el ADN, lo que activa la ruta de p53 y desencadena la parada del ciclo celular (Harley et al., 1990; Takai et al., 2003).

1.1.1.2 Senescencia inducida por oncogenes

La activación oncogénica también ha sido descrita como un potente inductor de senescencia. Esta activación induce senescencia celular y evita la proliferación de células dañadas, por lo

que actúa como un claro supresor tumoral (Lowe et al., 2004; Serrano et al., 1997). Varios estudios han caracterizado la presencia de células senescentes en muestras de lesiones preneoplásicas de ratón y humano (Braig et al., 2005; Chen et al., 2005; Collado et al., 2005; Michaloglou et al., 2005).

1.1.1.3 Senescencia por estrés oxidativo

La producción de ROS, debido a las alteraciones mitocondriales relacionadas con el daño o bien la sobreproducción de ROS por otros mecanismos, ha sido descrita como un inductor de senescencia. Esta producción de ROS daña al ADN e induce senescencia (Passos et al., 2007).

1.1.1.4 Senescencia inducida por terapia

El uso de fármacos quimioterápicos y la irradiación son potentes herramientas que limitan la progresión tumoral al eliminar células tumorales. Ambas estrategias también han sido descritas como inductores de senescencia, debido a que provocan roturas de cadena sencilla o doble, lo que desencadena la respuesta al daño en el ADN (*DNA damage response* o DDR) (Ewald et al., 2010; Schmitt et al., 2002; Shao et al., 2014). Como ejemplo relevante en esta tesis, el uso de bleomicina, un agente antitumoral usado para el tratamiento de carcinoma de células escamosas, linfomas y carcinoma testicular, induce senescencia celular, ya que causa DDR y una notable secreción de factores solubles (Aoshiba et al., 2003, 2013).

1.1.2 Características y detección de la senescencia celular

La detección de células senescentes supone uno de los principales retos en este campo de investigación. Dado que no existe un marcador universal de senescencia, su caracterización se realiza mediante un panel de múltiples marcadores que definen este estado (Childs et al., 2015). Para la detección de las células senescentes, el marcador más empleado es la detección de la actividad beta-galactosidasa asociada a senescencia (*senescence-associated beta-galactosidase* o SA- β -GAL) (Dimri et al., 1995).

1.1.2.1 Rutas moleculares de control de senescencia celular

La parada estable y permanente durante la senescencia celular se produce en la fase G1 del ciclo y es la característica más visible de este estado. En este sentido, se han definido dos rutas principales que controlan esta parada. La primera de ellas se relaciona con la activación de la vía de supresión tumoral p53/p21. En ausencia de daño en el ADN, el gen *TP53* se expresa en niveles muy bajos y la proteína p53 se encuentra en el citoplasma. En presencia de daño leve, las células activan los mecanismos de reparación del ADN y las células vuelven a entrar en ciclo, por lo que esta parada es transitoria. En presencia de daño persistente, se activa la DDR, que fomenta la expresión de ATM y ATR, las cuales inducen la fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX) en los lugares de daño. Así mismo, ATM/ATR activan a las quinasas CHK1/2, que inducen la fosforilación de p53, lo que lleva a su liberación del represor MDM2 y a su estabilización. Al mismo tiempo, la fosforilación múltiple de p53 por ATM/ATR también puede desencadenar su activación. Una vez activada, p53 se transloca al núcleo y promueve la transcripción de su principal diana, p21 (codificada por el gen *CDKN1A* en humanos). Esta proteína es inhibidora de quinasas dependientes de ciclinas (*cyclin-dependent kinases inhibitor* o CDKi), por lo que su activación inhibe a estas quinasas y fomenta el estado hipofosforilado de Rb. La hipofosforilación de Rb la mantiene unida al factor de transcripción E2F lo que impide la transcripción de genes asociados al ciclo celular (d'Adda di Fagagna, 2008; Kasthuber & Lowe, 2017). Por otra parte, la ruta de *INK4/ARF* es también una vía importante de inducción de senescencia celular. El locus *INK4/ARF* codifica para las proteínas p14, p15 y

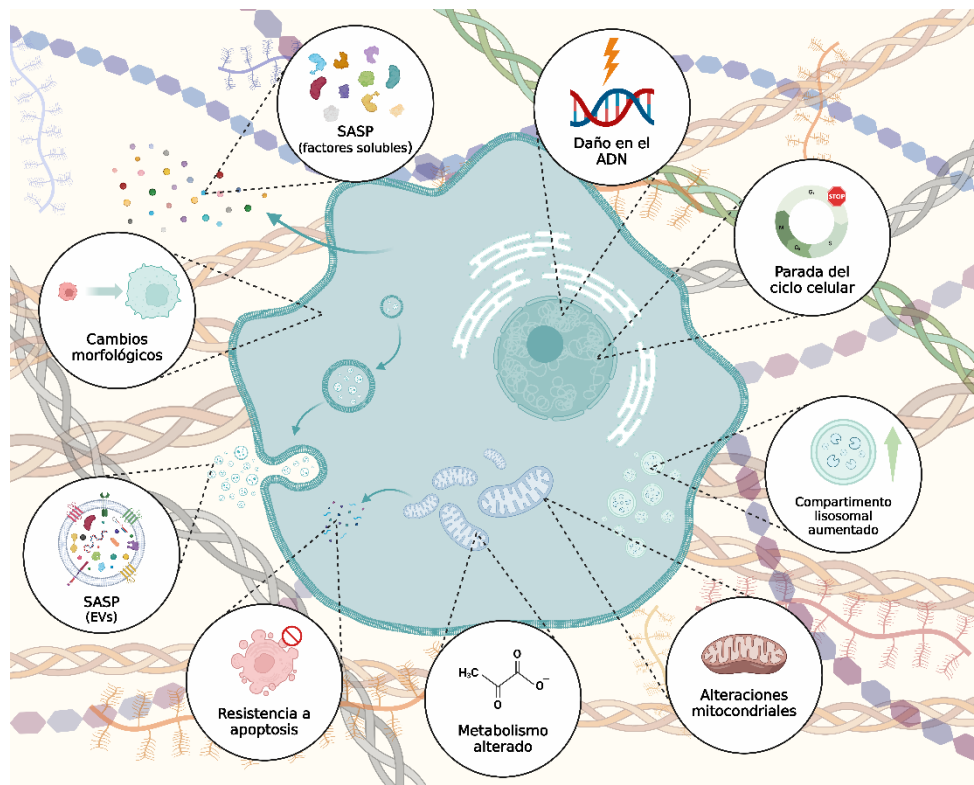


Figura 1. Características de las células senescentes. La figura representa las características más destacables de las células senescentes. Durante senescencia, la presencia de daño en el ADN, la parada en el ciclo celular en G1, el aumento del compartimento lisosomal, las alteraciones mitocondriales y metabólicas, el incremento en las rutas antiapoptóticas, los cambios morfológicos y la presencia del SASP soluble y vesicular, son las características más notables de este estado celular. Imagen creada con *Biorender*.

p16 que son importantes supresores tumorales comúnmente mutados en cáncer (Sharpless, 2005). El efecto combinado de la degradación de MDM2 mediante p14 y la inhibición de CDK4/6 mediada por p16 conlleva la hipofosforilación de Rb y la detención del ciclo celular (Pomerantz et al., 1998; Russo et al., 1998). En procesos de estés oncogénico y durante el envejecimiento, este locus está fuertemente expresado (Burd et al., 2013; Krishnamurthy et al., 2004; Yamakoshi et al., 2009).

1.1.2.2 Cambios morfológicos

Una de las características más visibles de las células senescentes es el aumento de su tamaño. Comparadas con otros estados celulares, las células senescentes tienen un citoplasma agrandado, aplanado, granular y con presencia de múltiples vacuolas al ser observadas en microscopía de campo claro (Sharpless & Sherr, 2015). A pesar de lo que se pensaba antes, las células senescentes son más grandes tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que se observó en tejidos de ratones envejecidos (Biran et al., 2017). Las razones de este aumento de tamaño son diversas, aunque algunos autores apuntan a que se puede deber al mantenimiento de la proporción de tamaño núcleo-citoplasma (Manohar & Neurohr, 2024; Neurohr et al., 2019).

Al mismo tiempo, la morfología nuclear se ve fuertemente alterada en senescencia. Las células senescentes pueden presentar envueltas nucleares irregulares, son multinucleadas y presentan pérdida de la proteína de la lámina nuclear B1 (LMNB1) (Freund et al., 2012). La formación de focos de heterocromatina asociada a senescencia (*senescence-associated heterocromatin*

foci o SAHF), cuya formación depende de la condensación de la cromatina durante esta parada estable, también puede ser usada como marcador de senescencia. Estos SAHF se observan como condensaciones de ADN que pueden estar asociados, además, a la presencia de modificaciones en histonas como H3K9me3 y H4K20me3 (Braig et al., 2005; Sharpless & Sherr, 2015).

En conjunto, se puede afirmar que los cambios morfológicos que exhiben las células senescentes, como el aumento significativo de su tamaño, así como la morfología nuclear alterada, pueden ser marcadores fiables de este estado celular.

1.1.2.3 Daño macromolecular asociado a senescencia

Entre los daños que exhiben las células senescentes cabe destacar el daño en el ADN, que desencadena este proceso dependiente de la ruta de p53/p21. Este daño puede tener varios orígenes. Por ejemplo, el acortamiento de los telómeros fomenta que la DDR los reconozca, lo que conduce a la activación del programa senescente (Shay & Wright, 2019). También se puede generar daño en el ADN por agentes externos como los fármacos quimioterápicos y la irradiación (tanto ultravioleta como ionizante) (Gorgoulis et al., 2019).

Las células senescentes presentan una serie de focos asociados a daño en el ADN que se conocen como DNA-SCARSs (*DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence*). Estos focos son distintos de los focos transitorios y se encuentran asociados a cuerpos nucleares PML (*promyelocytic leukemia*), presentan ausencia de proteínas reparadoras del ADN como RPA y RAD51, así como ADN de cadena sencilla. También se pueden encontrar asociados a mediadores de DDR como CHK2 y p53 (Gorgoulis et al., 2019). Desde un punto de vista funcional estos DNA-SCARSs pueden modular algunos aspectos del fenotipo senescente como la parada estable del ciclo y el SASP (Rodier et al., 2011). Por último, existen fragmentos de cromatina citoplasmáticos (*cytoplasmic chromatin fragments* o CCFs) que son visibles en células senescentes y contribuyen a la cascada de señalización de cGAS-STING. La presencia de estos fragmentos es considerada un marcador de senescencia (Ivanov et al., 2013; Li & Chen, 2018).

En este contexto, las proteínas también se encuentran altamente dañadas (Kaushik & Cuervo, 2015). La producción de ROS mediada por el daño en las mitocondrias es la principal fuente oxidante de residuos de metionina y cisteína de las proteínas, lo que altera su plegamiento y funcionalidad (Höhn et al., 2017). Estos ROS también pueden dañar proteínas mediante la carbonilación de algunos de sus residuos, lo que provoca plegamientos incorrectos y agregados (Nyström, 2005).

1.1.2.4 Expansión del compartimento lisosomal

Durante este estado celular, se ha descrito que el compartimento lisosomal está muy incrementado, tanto por el mayor número de lisosomas como por el aumento de su tamaño comparado con células no senescentes (Robbins et al., 1970). El aumento del número de lisosomas podría estar desencadenado por un intento de la célula de reponer lisosomas disfuncionales por otros nuevos con funcionalidad íntegra (Salama et al., 2014). Del mismo modo, el aumento del número de lisosomas no parece estar relacionado con aumento de su actividad. De hecho, durante senescencia celular, la actividad degradativa de los lisosomas en el contexto del flujo autofágico se ve reducida (Park et al., 2018). La expansión de este compartimento lisosomal conlleva que la actividad beta-galactosidasa asociada a senescencia

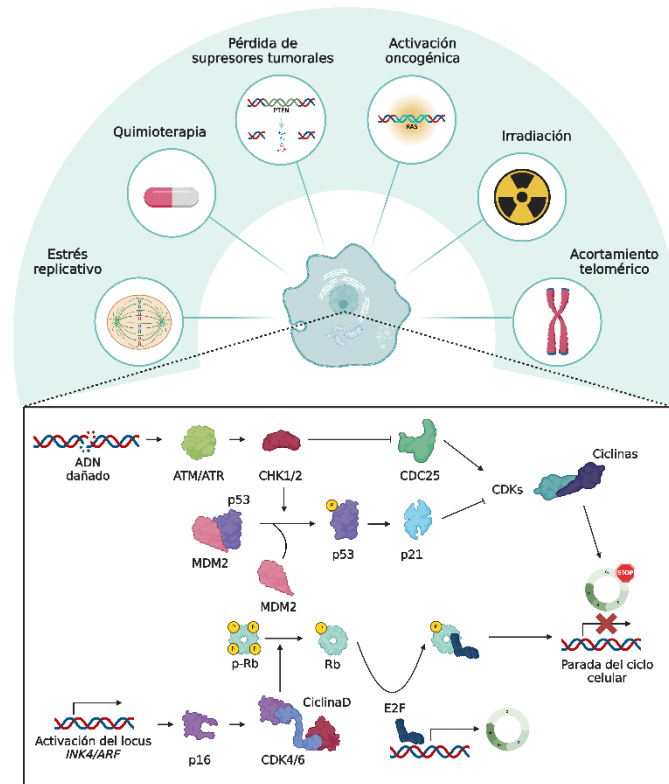


Figura 2. Inductores de senescencia y rutas de control. La imagen representa los estímulos más comunes en la inducción de senescencia celular. Además, también se muestran las dos rutas de control de senescencia más importantes, p53/p21 e *INK4/ARF*. Imagen creada con *Biorender*.

SA- β -GAL se encuentre muy aumentada con respecto a células no senescentes (Hernandez-Segura et al., 2018). Esta enzima es una hidrolasa ácida presente en los lisosomas, donde el pH es muy bajo, lo que implica que su actividad sea máxima al pH lisosomal (pH = 4.0-4.5). El aumento de la actividad SA- β -GAL en senescencia permite detectar la actividad de esta enzima a niveles subóptimos de pH (pH = 6), lo que permite emplear tinciones que detectan esta actividad y discriminan las células proliferativas de las senescentes (Dimri et al., 1995; Lee et al., 2006).

1.1.2.5 Resistencia a la apoptosis

Tanto la senescencia celular como la apoptosis son mecanismos de respuesta al daño. Si bien la ruta que se activa en la célula depende de la intensidad y la duración del daño, las células senescentes expresan de manera aumentada componentes de la familia de proteínas antiapoptóticas, como BCL-2 (E. Wang, 1995), BCL-XL (J. Chang et al., 2016) y BCL-W (Yosef et al., 2016). Al mismo tiempo, esta resistencia a la apoptosis ha sido utilizada como diana para la eliminación selectiva de células senescentes. El fármaco ABT-263 (también conocido como Navitoclax) es un inhibidor de esta familia de proteínas, y su uso en células senescentes conduce a la muerte de estas por apoptosis (J. Chang et al., 2016).

1.1.2.6 Alteraciones mitocondriales

Durante senescencia celular, las mitocondrias sufren importantes cambios en función, dinámica y morfología. Se ha descrito que la masa mitocondrial en células senescentes se encuentra aumentada, pero estas mitocondrias son menos funcionales, lo que se aprecia midiendo el potencial de membrana, estudiando los procesos de fusión-fisión mitocondrial y analizando los

metabolitos derivados del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (*tricarboxylic acid cycle* o TCA) (Kaplon et al., 2013; Passos et al., 2010). A pesar de que la masa mitocondrial se encuentra aumentada, la producción de ATP se ve comprometida, lo que se observa al analizar los ratios AMP:ATP y ADP:ATP, y contribuye a la parada en el ciclo celular mediante la activación de AMPK (Birch & Passos, 2017). La desregulación mitocondrial durante senescencia también puede modular el fenotipo secretor asociado a senescencia (*senescence-associated secretory phenotype* o SASP), mientras que su reciclaje mediante mitofagia lo suprime (Correia-Melo et al., 2016). El análisis de las proporciones de NAD⁺/NADH en células senescentes demostró su reducción, lo que altera la actividad de PARP1 y es fundamental para la activación de NF- κ B (Birch & Passos, 2017; Wiley et al., 2016). La liberación de ADN mitocondrial (ADNmt) y ARN bicatenario son los principales mediadores del SASP mediante la activación de cGAS y STING (López-Polo et al., 2024; Victorelli et al., 2023). Es por esto por lo que el papel de la mitocondria en senescencia es fundamental.

1.1.3 El fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP)

Una de las características más destacables de la senescencia celular es la capacidad que tienen estas células de producir y liberar un fenotipo secretor muy complejo y variado, único de este estado celular que se conoce como fenotipo secretor asociado a senescencia (*senescence-associated secretory phenotype* o SASP) (Acosta et al., 2008; Coppé et al., 2008; Kuilman et al., 2008). El SASP puede modular el ambiente extracelular y facilitar la comunicación intercelular (Faget et al., 2019; Schmitt et al., 2022), al mismo tiempo que representa una potente fuente de biomarcadores que permiten identificar a las células senescentes (Di Mitri & Alimonti, 2016). En cuanto a su composición, se distingue una fracción soluble, formada por proteínas como citoquinas, quimioquinas, metaloproteasas y factores de crecimiento, además de una fracción vesicular que está compuesta por poblaciones heterogéneas de vesículas extracelulares (*extracellular vesicles* o EVs). El programa que desencadena la producción del SASP depende del tipo celular, del inductor de senescencia y del contexto celular, por lo que algunos autores han propuesto crear una base de datos (SASPatlas) recopilando la información de sus componentes utilizando distintos tipos celulares y con diferentes inductores de senescencia (Basisty et al., 2020).

En cuanto al tipo de inducción de senescencia, por ejemplo, el tratamiento con fármacos que inducen daño en el ADN desencadenó un SASP más proinflamatorio comparado con el observado en células que fueron tratadas con inhibidores de CDK4/6, ya que estos inhibidores no activan la vía dependiente de NF- κ B (B. Wang et al., 2022). Tras senescencia inducida por disfunción mitocondrial (*mitochondrial dysfunction-associated senescence* o MiDAS), los niveles de p53 y AMPK fueron elevados, lo que suprime el SASP proinflamatorio mediado por NF- κ B (Wiley et al., 2016). Estudios comparativos en células mesenquimales con distintos inductores como estrés oxidativo, irradiación, tratamiento con doxorubicina o senescencia replicativa, mostraron cambios significativos en la composición del SASP (Özcan et al., 2016). El tipo celular que produce el SASP es una variable relevante que afecta drásticamente a su composición. La inducción de senescencia con los mismos estímulos, pero en distintos tipos celulares demostró que los fenotipos secretores cambiaban significativamente. Por ejemplo, las células epiteliales senescentes secretaron IL-1 α de manera específica, mientras que en fibroblastos senescentes se secretó el factor HGF (Coppé et al., 2008). Estudiando los niveles de factores del SASP entre fibroblastos WI-38 y endoteliales HUVECs, se ha demostrado que los patrones de expresión son completamente diferentes (Casella et al., 2019). Incluso entre células del mismo tejido pancreático algunos factores, como CXCL1 y IGFBP3, se encuentran

expresados de manera diferencial (P. Xu et al., 2022). En conjunto, todos estos trabajos demuestran la relevancia del tipo celular en la composición del SASP.

Por último, el contexto celular es una variable adicional que puede modular la secreción de factores del SASP. En ambiente hipóxico o mediante el uso de fármacos que imitan este estado, la secreción de SASP proinflamatorio, tras la inducción de senescencia mediante OIS y TIS, se ve fuertemente reducida (van Vliet et al., 2021). La dieta también puede influir en la composición del SASP. En un modelo tratado con dieta alta en grasas se observó que el hígado de estos ratones produjo un SASP más proinflamatorio (Nehme et al., 2023).

En definitiva, la heterogeneidad del SASP está influida por todos estos factores, lo que puede explicar, en parte, las funciones contradictorias de este fenotipo, lo que se describirá con más detalle en los siguientes apartados.

1.1.3.1 Regulación del SASP

La regulación del SASP es un proceso en el que intervienen varias rutas moleculares. Una de las vías clave en esta regulación está mediada por p53. De hecho, la reexpresión de p53 en un modelo de desarrollo de tumores por su ausencia produjo la inducción de senescencia celular y el fenotipo secretor de estas células estimuló el reclutamiento y la activación del sistema inmune que culminó en el control de los tumores (Xue et al., 2007). Además, la pérdida de p53 amplifica los factores proinflamatorios del SASP en fibroblastos inducidos a senescencia mediante TIS, OIS y senescencia replicativa. En TIS, el tratamiento con nutlin-3a, que fomenta la estabilización de p53 en células senescentes atenuó el SASP. En línea con estos resultados, en MiDAS, la depleción de p53 desencadenó la secreción de factores proinflamatorios del SASP, como IL-1 α y IL-1 β , (Coppé et al., 2008; Wiley et al., 2018). Finalmente, el tratamiento a largo plazo con nutlin-3a indujo senescencia, pero con ausencia de SASP proinflamatorio (Efeyan et al., 2007; B. Wang et al., 2022).

De modo similar, la sobreexpresión de p16 o el tratamiento con inhibidores de CDK4/6 induce senescencia sin SASP proinflamatorio, pero con un fenotipo único dependiente de p53 que se compone, entre otros, de algunos factores como IGFBP3 y componentes de la ruta del interferón como ISG15 (Coppé et al., 2011; B. Wang et al., 2022). Durante la DDR, la señalización de NF- κ B ha sido caracterizada como una ruta de biogénesis clave para algunos factores del SASP (Chien et al., 2011; Crescenzi et al., 2011). Otros factores asociados a DDR como GATA4, ATM, CHK2 y ATR se han descritos como promotores del SASP proinflamatorio (Chien et al., 2011; Kang et al., 2015; Rodier et al., 2009).

La regulación del SASP mediada por p38MAPK y mTOR también es relevante en este sentido. En el contexto del cáncer, la activación oncogénica de RAS activa a p38MAPK y a MEK, la principal proteína activada por RAS, que indujo senescencia de manera prematura al activar a p53 y p16 (Lin et al., 1998). p38MAPK se ha descrito como un activador de NF- κ B de manera independiente a DDR. Esta proteína también estabiliza diversos transcritos del SASP en fibroblastos senescentes residentes en el microambiente tumoral, lo que fomenta la tumorogénesis (Alspach et al., 2014; Freund et al., 2011).

Con respecto a mTOR, esta ruta promueve la producción de SASP proinflamatorio mediante dos mecanismos. Por una parte, mTOR promueve la traducción de IL-1 α , a la vez que fomenta la traducción de MK2, lo que inhibe a ZFP36L1. Esto permite la estabilización de múltiples

transcritos del SASP, entre los que se incluye IL-1 α . Además, el uso del inhibidor de mTOR, rapamicina, redujo los niveles del SASP proinflamatorio (Herranz et al., 2015; Laberge et al., 2015). En condiciones de hipoxia AMPK inhibe a mTOR, lo que suprime la secreción de factores del SASP. En este mismo estudio, el uso de compuestos que mimetizan la hipoxia reveló una disminución de los factores del SASP y una mejoría en animales envejecidos por tratamiento con quimioterapia o de manera natural (van Vliet et al., 2021). Por el contrario, la ruta de JAK-STAT, que modula las rutas de p38MAPK y mTOR, promueve la secreción de factores proinflamatorios del SASP (M. Xu et al., 2015). En ratones deficientes para Nrf2, la rapamicina inhibe el SASP de manera dependiente de STAT3 (R. Wang et al., 2017).

El reconocimiento de ADN citoplasmático mediante la ruta de cGAS-STING ha sido definido como una fuente importante de producción de factores del SASP mediado por la señalización del interferón (Dou et al., 2017; Glück et al., 2017; H. Yang et al., 2017). La reducción de DNASE2 y TREX1 durante senescencia induce la acumulación de ADN citoplasmático, lo que activa esta ruta (Takahashi et al., 2018). En este contexto, TOP1cc y G3BP1 desempeñan un papel importante en el reconocimiento de CCFs mediante cGAS, lo que también es clave para la regulación del SASP. La inhibición de cGAS o STING reduce la activación de NF- κ B en TIS, lo que apunta a que NF- κ B también es un actor clave en este proceso (Dou et al., 2017; Omer et al., 2020; Zhao et al., 2020). Mediante senescencia inducida por radiación en un modelo de fibroblastos deficientes para cGAS, se pudo comprobar que la expresión del SASP se veía fuertemente reducida en comparación con los controles, lo que también se comprobó *in vivo* (Glück et al., 2017; H. Yang et al., 2017). La razón de la acumulación de ADN citoplasmático en células senescentes no está clara. Sin embargo, se ha reportado que la transcripción del elemento retrotransponible L1 se ve muy incrementado en células senescentes. El ARNm de L1 se convierte en ADNc mediante las retrotranscriptasas reversas de L1, lo que provoca su acumulación en el citoplasma debido a la reducción de TREX1. Este ADNc es reconocido por cGAS y activa la ruta (De Cecco et al., 2019). La inhibición de STING en ratones envejecidos demostró una disminución de los niveles de los factores del SASP IL-1 β , IL-6, TNF, CXCL9 y CXCL10 en riñón e hígado (Gulen et al., 2023).

Para finalizar, la sobreexpresión del dominio intracelular de NOTCH1 (NICD) implica la producción de un perfil único de producción de SASP, que depende en parte de la señalización de TGF β . En este mismo artículo, los autores proponen que la regulación de NOTCH1 genera dos oleadas de SASP, en las que los componentes de este fenotipo cambian significativamente. Esto pone de relevancia que el SASP no es un fenotipo estático, sino que, en el tiempo, sus componentes y funciones pueden variar notablemente (Hoare et al., 2016). En síntesis, la regulación del SASP es muy compleja e intervienen distintas rutas moleculares. La modulación genética y farmacológica de dichas rutas es una estrategia muy exitosa en el estudio de las funciones de los distintos componentes del SASP, que se expondrán en el siguiente apartado.

En el contexto del cáncer, el SASP ha sido descrito tanto como un factor antitumoral como protumoral (Di Mitri & Alimonti, 2016). Esta aparente contradicción se debe a la alta heterogeneidad del SASP, que está influida por los factores que se explicaron en el apartado anterior. Tanto la fracción soluble como la vesicular pueden ejercer sus efectos sobre células bastante alejadas de las células productoras, por lo que ambos componentes tienen un papel fundamental a nivel local y sistémico (Takasugi et al., 2017). En el siguiente apartado se tratarán las funciones antitumorales y protumorales de este fenotipo secretor.

1.1.3.2 Funciones del SASP. Efectos antitumorales

1.1.3.2.1 *Modulación autocrina y paracrina*

Los factores del SASP son potentes mediadores y moduladores de manera autocrina y paracrina. Usando como modelo fibroblastos humanos senescentes mediante estrés replicativo se pudo comprobar que la actividad autocrina de los factores del SASP reforzó el estado senescente de estas células. Este efecto está mediado por los factores del SASP IL-1 α , IL-6, CXCL1 y CXCL2, que modulan a NF- κ B (Acosta et al., 2008, 2013; Kuilman et al., 2008). La expresión de IL-1 α unido a la superficie de fibroblastos senescentes reforzó este estado de manera autocrina (Orjalo et al., 2009), lo que también se comprobó en células musculares lisas vasculares (*vascular smooth muscle cells* o VSMCs) senescentes, donde la expresión de IL-1 α reforzó la expresión de algunos componentes del SASP (Gardner et al., 2015).

La inducción de senescencia paracrina mediante los factores del SASP ha sido demostrada en varios estudios. En respuesta a OIS, los fibroblastos humanos secretan TGF β que induce senescencia paracrina en células vecinas (Acosta et al., 2013). Otra citoquina, IL-6, puede inducir senescencia de manera paracrina mediante la producción de ROS en células de su alrededor (Nelson et al., 2018).

En el contexto del sistema inmune, la inactivación oncogénica en un modelo de linfoma linfoblástico agudo de células T impulsado por la proteína protooncogénica Myc (Myc) indujo una regresión tumoral. Esta regresión se debe a la actividad de células T CD4 $^+$, la inducción de senescencia y la disminución de la angiogénesis, lo que implica que el reclutamiento de estas células fomentó la expresión de factores del SASP que indujeron senescencia en el tumor (Rakhra et al., 2010). Además, La secreción de IFN γ y TNF mediante células T CD4 $^+$ indujo senescencia paracrina en células tumorales de páncreas y mama (Braumüller et al., 2013).

Finalmente, la señalización mediante NOTCH1 es esencial en el establecimiento de la senescencia paracrina y debilita el SASP producido por células inducidas a senescencia mediante senescencia paracrina (senescencia paracrina secundaria), lo que ayuda a limitar la expansión de este fenotipo (Teo et al., 2019).

1.1.3.2.2 *Modulación del sistema inmune*

Una de las funciones más relevantes del SASP es su capacidad para establecer un diálogo entre las células senescentes y el sistema inmune. La inducción de fibrosis en el hígado se ha descrito como el paso previo a la aparición de cáncer hepático. En este sentido, empleando un modelo de fibrosis hepática inducida mediante CCl $_4$, se ha caracterizado el papel de las células senescentes evitando dicha fibrosis. Esto se consigue mediante el diálogo con las células NK (*natural killers*), que son reclutadas mediante la producción del ligando de NK, NKG2D, con células estrelladas hepáticas inducidas a senescencia mediante CCl $_4$. La expresión de este ligando desencadena la interacción de las células NK con las células senescentes, lo que promueve su eliminación en el hígado (Sagiv et al., 2016). En un modelo de carcinoma hepático mediado por fibrosis, la inducción de senescencia en células estrelladas hepáticas mediada por p53 indujo la expresión de citoquinas y quimioquinas que fomentó la polarización de los macrófagos a M1, reduciendo el crecimiento tumoral (Lujambio et al., 2013). La reactivación de p53 en modelos de desarrollo tumoral hepático producido en ausencia de este supresor de tumores indujo senescencia celular, y el SASP producido fue capaz de reclutar a células del sistema inmune que mediaron la regresión tumoral (Xue et al., 2007).

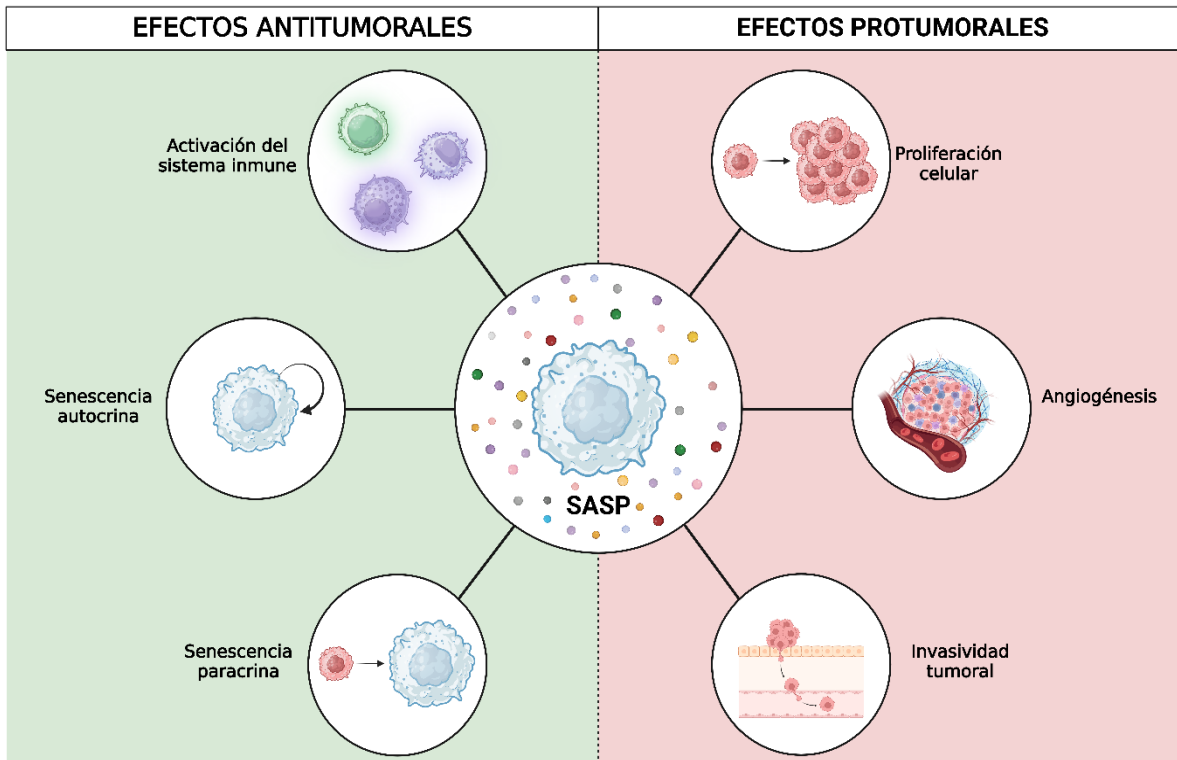


Figura 3. Papel dual del SASP en cáncer. La figura representa los papeles antitumorales y protumorales del SASP en cáncer. Por una parte, la activación del sistema inmune, el refuerzo del estado senescente y la inducción de senescencia paracrina permiten frenar la progresión tumoral. Por otra parte, el SASP también puede inducir un aumento en proliferación celular, promueve la angiogénesis y fomenta la invasividad y metástasis, lo que se asocia a una peor prognosis. Imagen creada con *Biorender*. Figura adaptada de Di Mitri & Alimonti, 2016, con el permiso de Elsevier.

Este papel del SASP no es exclusivo del hígado, ya que en células de mieloma múltiple (MM) el tratamiento con dosis bajas de quimioterapia indujo senescencia celular y desencadenó la liberación de CD226, otro ligando de células NK, lo que eliminó de manera selectiva estas células senescentes (Soriani et al., 2009). El tratamiento combinado de inhibidores de CDK4/6 y MEK indujo senescencia en un modelo de cáncer pulmonar murino *Kras^{G12D/+}* y *Trp53^{-/-}*, lo que indujo la expresión de factores del SASP como ICAM-1 y ligandos NKG2D, ULBP2 y MICA, lo que llevó a la regresión tumoral dependiente de la actividad de células NK (Ruscetti et al., 2018). El papel del SASP como modulador del sistema inmune contribuye a la regresión tumoral en múltiples tejidos y órganos, lo que le confiere importantes propiedades antitumorales.

1.1.3.3 Funciones del SASP. Efectos protumorales

1.1.3.3.1 Efectos en la proliferación tumoral

A pesar de los efectos antitumorales atribuidos al SASP, algunos estudios también han caracterizado que este fenotipo secretor puede ser un importante agente protumoral. El cocultivo de fibroblastos senescentes con células neoplásicas puede incrementar la proliferación de estas últimas de manera paracrina, ya que el medio condicionado de estos fibroblastos contiene una amplia gama de factores de crecimiento (Coppé et al., 2008; Krtolica et al., 2001; Lawrenson et al., 2010). IL-6, uno de los factores más habituales en el SASP, ha sido descrito como un promotor del crecimiento de algunos tipos de cáncer como mama, piel,

próstata y pulmón (Di et al., 2014; Hartman et al., 2013; Lederle et al., 2011; Rojas et al., 2011; L. Song et al., 2011). Del mismo modo, la secreción de osteopontina (OPN) por fibroblastos senescentes modula la actividad de las MAPK en queratinocitos preneoplásicos, lo que promueve su proliferación *in vitro* e *in vivo* (Luo et al., 2011; Pazolli et al., 2009). Otro ejemplo es el del factor del SASP CXCL1 que también ha sido descrito como un promotor de la proliferación en cáncer esofágico (D. Wang et al., 2006). En xenoinjertos derivados de células tumorales de mama, la exposición a metaloproteasas secretadas por fibroblastos senescentes promueve el crecimiento inicial del tumor al remodelar el tejido y permite a diversas citoquinas y mitógenos ser más accesibles a estos xenoinjertos (Liu & Hornsby, 2007). En un contexto de senescencia inducida por tratamiento con inhibidores de CDK4/6, los fibroblastos senescentes indujeron la proliferación de células de melanoma tanto *in vivo* como *in vitro* (Guan et al., 2017). En un modelo de obesidad, se ha demostrado que el SASP liberado por células estrelladas hepáticas senescentes es capaz de aumentar la proliferación de hepatocitos vecinos, lo que promueve el desarrollo de carcinoma hepatocelular cuando los ratones son tratados con carcinogénicos (Yoshimoto et al., 2013). La senescencia inducida mediante OIS o TIS demostró la contribución clave de este proceso al crecimiento e invasividad de tumores de tiroides, glioblastoma y mama (Fletcher-Sananikone et al., 2021; Kim et al., 2017; Liu & Hornsby, 2007).

Todos estos estudios demuestran el papel del SASP como promotor de la proliferación celular, aunque estos efectos son muy dependientes del contexto, subrayan un claro efecto protumoral derivado de este fenotipo.

1.1.3.3.2 Efectos sobre la angiogénesis

La angiogénesis, el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes, tiene un papel fundamental en la progresión del cáncer. Esto permite a las células tumorales obtener nutrientes y oxígeno que son esenciales para su proliferación (Hanahan & Weinberg, 2011). La contribución del SASP a la angiogénesis se debe a la secreción de factores que estimulan este proceso como CXCL1, AREG y VEGF. Estos factores son capaces de estimular la angiogénesis en células epiteliales premalignas *in vitro* e *in vivo* (Bavik et al., 2006; Coppé et al., 2006). Los fibroblastos senescentes liberan VEGF que es capaz de estimular la vascularización de las células epiteliales. Además, son capaces de aumentar la vascularización tumoral de células EpH4 en modelos *in vivo* (Coppé et al., 2006). Del mismo modo, la producción del factor CTFG es capaz de aumentar la angiogénesis y la tumorigénesis de células de cáncer de próstata murino (F. Yang et al., 2005).

1.1.3.3.3 Efectos sobre la invasividad y la metástasis

El SASP también se ha definido como fuente de múltiples componentes que fomentan la invasividad y metástasis. Por ejemplo, los fibroblastos senescentes mediante estrés replicativo muestran una secreción aumentada de ciertas metaloproteasas, como MMP1 y MMP2, que activan PAR-1 en queratinocitos tumorigénicos, dotándolos de una mayor capacidad invasiva (Malaquin et al., 2013). Al expresar de manera constitutiva HER2 en células de cáncer de mama, se observó una inducción de senescencia celular y el fenotipo secretor de estas células senescentes promovió la capacidad metastásica de las células de cáncer de mama (Angelini et al., 2013). No solo el SASP puede contribuir al proceso de invasividad y metástasis, sino que también es capaz de contribuir a la formación del nicho premetastásico. La expresión y liberación de IL-6 en osteoblastos senescentes promovió la osteoclastogénesis, lo que facilitó la metástasis de células tumorales de mama a hueso. Esto es particularmente relevante, ya que

los osteoblastos senescentes pueden preparar el terreno para el asentamiento de células tumorales aun cuando estas no se encuentran presentes (Luo et al., 2016). Las citoquinas del SASP IL-6 e IL-8, que se encuentran bajo la regulación de NF- κ B, han sido asociadas también al aumento de la capacidad metastásica (Schmitt et al., 2022). Del mismo modo, la modulación del SASP mediante TIMP1 le confiere mayor capacidad metastásica en un modelo de cáncer prostático inducido a senescencia mediante la pérdida del supresor tumoral PTEN (Guccini et al., 2021). Por último, la expresión de NOTCH1 indujo senescencia celular en células endoteliales pulmonares de ratones portadores de tumores. Estas células expresaron la proteína VCAM1 lo que facilitó la metástasis en pulmón de células de melanoma B16F10 (Wieland et al., 2017).

Todos estos estudios apoyan la relevancia del SASP en el contexto de la metástasis e invasividad, lo que supone una característica protumoral mediada por este fenotipo. Si bien en estos apartados solo nos hemos centrado en el papel de los factores solubles del SASP, las EVs son otra fuente importante de componentes clave en la funcionalidad del SASP, que discutiremos en el siguiente apartado.

1.2 LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Las vesículas extracelulares (*extracellular vesicles* o EVs) son un heterogéneo conjunto de estructuras membranosas liberadas por una amplia gama de tipos celulares. Se ha descrito la producción y liberación de EVs en células animales, vegetales e incluso bacterias. Estas vesículas tienen en común entre sí que se componen de bicapas lipídicas de forma esférica liberadas al espacio extracelular e incapaces de replicarse a sí mismas (Welsh et al., 2024). Desde su descubrimiento en reticulocitos de conejo (Johnstone et al., 1987), las EVs han emergido como uno de los principales mecanismos de comunicación intercelular (Colombo et al., 2013; Yáñez-Mó et al., 2015). Se componen de varias poblaciones y subpoblaciones con grandes diferencias en origen, composición y tamaño, que puede oscilar entre 50-1000 nm, aunque no hay un consenso definido sobre los límites inferior y superior (Welsh et al., 2024).

1.2.1 Nomenclatura y diversidad

Como ya se ha mencionado, las EVs presentan una alta heterogeneidad que se debe a las variadas rutas de biogénesis y liberación. En el pasado, los términos de vesícula extracelular grande (*large extracellular vesicles* o lEVs) o vesícula extracelular pequeña (*small extracellular vesicles* o sEVs) fueron ampliamente utilizados, ya que algunas metodologías como la ultracentrifugación diferencial (*differential ultracentrifugation* o dUC) conseguían separar las vesículas en función de su tamaño. Aunque esto es cierto, no hay un consenso en lo que es “grande” o “pequeño”, tomando como referencia que las vesículas de <200 nm serían las sEVs. Hoy se sabe que algunas metodologías son capaces de aislar poblaciones de EVs que solapan, por lo que esa nomenclatura debe tomarse con precaución (Welsh et al., 2024). También en el pasado se utilizó el término “exosoma” para referirse a las vesículas originadas por biogénesis endosomal, distinguiéndolas de los “ectosomas” (microvesículas), cuyo origen es la evaginación de la membrana plasmática. Otros términos como “migrasomas”, “oncosomas” o “cuerpos apoptóticos” también se han empleado para designar vesículas generadas en contextos muy definidos. De nuevo, la gran limitación con esta nomenclatura radica en el hecho de que muchos de los métodos de separación de EVs no aíslan una población concreta, sino que existen poblaciones solapantes en las preparaciones. Tampoco existen marcadores universales para ectosomas, exosomas u otros subtipos de EVs, lo que complica todavía más esta nomenclatura (Welsh et al., 2024). En definitiva, siguiendo las indicaciones del MISEV 2023, los términos

que más se ajustan a la realidad biológica son: EVs (recomendado para todas aquellas partículas liberadas por células, delimitadas por una bicapa lipídica y sin capacidad de replicarse a sí mismas), sEVs (partículas delimitadas por una bicapa lipídica, cuyo tamaño es inferior a 200 nm) y lEVs (partículas delimitadas por una bicapa lipídica, cuyo tamaño es superior a 200 nm). Aun con todo, estas dos últimas nomenclaturas deben usarse con mucha precaución (Welsh et al., 2024).

En cuanto a su diversidad, las EVs se distinguen del resto de partículas por la delimitación de una bicapa lipídica. Otras partículas, que se conocen como partículas extracelulares no vesiculares (*non-vesicular extracellular particles* o NVEPs) han emergido en los últimos años como demostración de la alta diversidad de estas partículas. Las NVEPs se componen de acúmulos de proteínas, ácidos nucleicos y otros, además de que pueden aislarse junto a las EVs, aunque su tamaño es muy pequeño (Welsh et al., 2024). Los ejemplos más relevantes de estas NVEPs son los exómeros y supérmeros. Aunque aún no está bien definida la ruta de biogénesis de estas partículas, su composición se basa en acúmulos de proteínas sin bicapa lipídica. Su tamaño medio oscila entre 45 nm, en el caso de los exómeros, y 35 nm en el caso de los supérmeros. Estudios comparativos de los perfiles proteómicos muestran las grandes diferencias entre las NVEPs y las EVs (H. Zhang et al., 2018; Q. Zhang et al., 2021). Desde el punto de vista funcional, los exómeros derivados de células MDCK modulan el tráfico de EGFR en organoides intestinales (Q. Zhang et al., 2019), mientras que los supérmeros liberados por células de cáncer colorrectal han sido descritas como mediadores de la secreción de lactato y de transferencia de resistencia a fármacos a células no resistentes (Q. Zhang et al., 2021).

Para los intereses de este trabajo, de aquí en adelante nos centraremos en el papel de las EVs sin caracterizar ni estudiar la funcionalidad de otras partículas presentes en nuestras preparaciones.

1.2.2 Biogénesis

1.2.2.1 Rutas de biogénesis de EVs

A grandes rasgos, la biogénesis de EVs se puede clasificar en dos rutas principales: la biogénesis mediante la evaginación de la membrana plasmática y la ruta de biogénesis endosomal.

Por una parte, la evaginación de la membrana plasmática permite la liberación de EVs enriquecidas en marcadores como CD9 y CD81 (Kowal et al., 2016; Mathieu et al., 2021). La ruta de biogénesis endosomal requiere de una maquinaria molecular mucho más variada. Estas EVs se originan por la maduración de endosomas generados mediante varias rutas de endocitosis. El endosoma temprano madura hasta convertirse en un endosoma tardío también llamado cuerpo multivesicular (*multivesicular body* o MVB), donde se forman las vesículas intraluminales (*intraluminal vesicles* o ILVs). La maquinaria de generación de las ILVs depende, de manera fundamental, del complejo ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), y fue uno de los descubrimientos clave en el estudio de la biogénesis de las ILVs (Hurley, 2008). Esta maquinaria actúa de manera secuencial, donde los complejos ESCRT-0 y ESCRT-I agrupan los cargos transmembrana ubiquitinados en microdomios de la membrana de los MVB. Posteriormente, estos reclutan a los complejos ESCRT-II y ESCRT-III que promueven la gemación y fisión de las ILVs. El papel clave de estos complejos en este proceso se ha visto tras su inactivación. Tras esta inactivación, la eficiencia de la secreción y la

composición de las vesículas secretadas se vio alterada. Esto apunta a que ciertos componentes de ESCRT podrían actuar de manera selectiva sobre subpoblaciones de MVB e ILVs cuyo destino es la secreción (Colombo et al., 2013). Algunos marcadores de EVs son proteínas importantes en su biogénesis. Este es el caso de sintenina y ALIX (Baietti et al., 2012).

De manera independiente a la acción del complejo ESCRT, otras rutas de biogénesis han sido caracterizadas en la generación de ILVs. Esto se descubrió al eliminar estos complejos y comprobar que los MVB se seguían formando (Stuffers et al., 2009). Una de estas rutas requiere de ceramida, la cual es sintetizada a partir de esfingomielina por la esfingomielinasa neutra (*neutral sphingomyelinase* o N-SMase) (Trajkovic et al., 2008). La ceramida es clave en la generación de las ILVs y en el proceso de clasificación del cargo (Goñi & Alonso, 2009; Kajimoto et al., 2013). De hecho, la inhibición de esta enzima con el compuesto GW4869 reduce la biogénesis de EVs (Catalano & O'Driscoll, 2020).

Además, las proteínas de la familia de las tetraspaninas también han sido descritas como clave en esta biogénesis independiente de ESCRT. La tetraspanina CD63 ha sido descrita como moduladora de la clasificación del cargo en melanocitos (Theos et al., 2006; van Niel et al., 2011). Además, otras tetraspaninas como CD9 y CD81 también cumplen funciones importantes (Buschow et al., 2009; Chairoungdua et al., 2010).

En cuanto a los ácidos nucleicos, su presencia en el cargo ha sido demostrada en numerosos artículos (Kahlert et al., 2014; Nolte-t Hoen et al., 2012; Thakur et al., 2014; Valadi et al., 2007). De manera relevante, la selección de los miARNs que van a ser cargados depende de motivos específicos en su secuencia (Villarroya-Beltri et al., 2014), lo que indica una selección precisa de los miARNs que componen el cargo. Además, se ha propuesto que algunos complejos de ESCRT pueden actuar como mediadores de la carga de ARN (Irion & St Johnston, 2007). Aun así, los mecanismos que regulan la carga de los ácidos nucleicos en las EVs están por esclarecer (van Niel et al., 2018).

1.2.2.2 Transporte y liberación

Una vez formado, el MVB se puede fusionar con los lisosomas para su degradación o con la membrana plasmática para liberar las ILVs. Esto requiere de la maquinaria de transporte celular en ambos casos, aunque los elementos que las coordinan son muy distintos. Los filamentos de actina, los microtúbulos, las proteínas motoras, entre las que se encuentran las dineínas, quinesinas y miosinas, así como las proteínas de la familia de las GTPasas pequeñas modulan este transporte (Bonifacino & Glick, 2004; Cai et al., 2007). El transporte retrógrado, es decir hacia el extremo negativo de los microtúbulos, está coordinado por la proteína RAB7 y fomenta la fusión de los MVB con los lisosomas (Rocha et al., 2009). También se ha caracterizado un papel de esta proteína en la secreción de EVs (Baietti et al., 2012). Este papel dual puede deberse al estado de ubiquitinación de RAB7, que se ha demostrado que induce el reclutamiento de la maquinaria involucrada en la orientación de los MVB hacia los lisosomas, donde son degradados, y no a su secreción (P. Song et al., 2016). En los endosomas, el reclutamiento de RAB7 hacia los lisosomas se ve estimulado por el colesterol en la membrana limitante. Al mismo tiempo, se ha visto que los MVB que contienen ILVs ricas en colesterol se secretan de manera preferente (Möbius et al., 2003). La modulación de RAB7 es, por tanto, una estrategia muy prometedora para la regulación de la biogénesis de EVs. Por otra parte, la proteína RAB27A y RAB27B son esenciales para la secreción de los MVB. Estas proteínas median la fusión del MVB con la membrana plasmática (Ostrowski et al., 2010; Sinha et al., 2016).

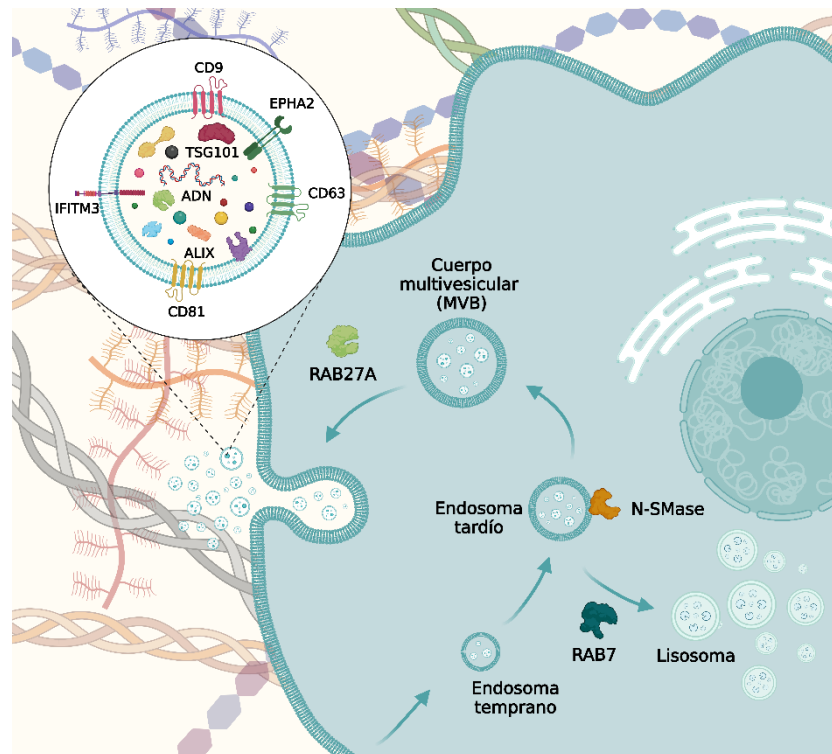


Figura 4. Biogénesis y composición molecular de las EVs. Representación gráfica de la biogénesis de EVs con los marcadores de membrana de la familia de las tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81), así como las proteínas IFITM3 y EPHA2. En el interior de la vesícula se representan los componentes más característicos del cargo como ALIX, TSG101 y ADN. Imagen generada con *Biorender*.

Además, RAB27A modula el reordenamiento del citoesqueleto de actina en los sitios de fusión con la membrana plasmática mediante proteínas de unión a actina (Sinha et al., 2016). La fusión con la membrana plasmática es el último de los pasos para la liberación de las ILVs. Este proceso está mediado por miembros de la familia de la sinaptotagmina y proteínas SNARE (Jahn & Scheller, 2006). El proceso de exocitosis en algunos tipos celulares se ha relacionado con la regulación por Ca^{2+} , que puede tener un papel fundamental en la activación de los complejos SNARE (Savina et al., 2003). Un punto importante en el estudio de la regulación de la exocitosis de EVs se basa en que todos los estudios que se han realizado provienen del análisis de aislados de EVs a partir de sobrenadantes de cultivo celular tratados con inhibidores, lo que ignora por completo la complejidad de los procesos intracelulares que pueden estar siendo afectados por el tratamiento con los inhibidores (van Niel et al., 2018). Por último, estos estudios solo tienen en cuenta las EVs que han sido exocitadas, sin preocuparse por la fracción de vesículas que sigue quedando dentro de las células, o aquellas que han sido reinternalizadas en las células productoras (Edgar et al., 2016; Matsumoto et al., 2017).

1.2.3 Interacciones con otras células

Tras su liberación, las EVs pueden interactuar de distintas formas con las células receptoras. Esto ha sido demostrado en varios estudios. La transferencia de ARNm y miARN desde células de ratón a células humanas se demostró analizando la presencia de proteínas de ratón en las células diana humanas (Valadi et al., 2007). También, el transporte de luciferina en EVs a células que expresaban luciferasa, consiguió detectar bioluminiscencia en células diana, lo que apoya la idea de que las EVs pueden internalizarse y liberar el cargo en las células receptoras (Montecalvo et al., 2012). La forma más común de estudiar la internalización de las EVs es

mediante el marcaje de estas con agentes intercalantes de membrana plasmática fluorescentes. Algunos de estos marcajes son PKH67, PKH26, rodamina B, DiI y DiD (Atay et al., 2011; Barrès et al., 2010; Christianson et al., 2013; Feng et al., 2010; Fitzner et al., 2011; Morelli et al., 2004; Näslund et al., 2014; Svensson et al., 2013; Tian et al., 2013). Para el análisis de la internalización con estos compuestos, la microscopia confocal y la citometría de flujo son dos buenas opciones. Además, para discriminar si las EVs han sido internalizadas o se encuentran pegadas a la membrana plasmática, el tratamiento de EVs con agentes ácidos o tripsina puede desnaturalizar o romper las proteínas de membrana e interrumpir la interacción de estas con sus receptores (Feng et al., 2010; Fitzner et al., 2011; Franzen et al., 2014; Morelli et al., 2004; Näslund et al., 2014; Yuyama et al., 2012). La unión con receptores de membrana implica que las vesículas no necesitan ser internalizadas para producir un efecto en la célula diana. Aun así, las vesículas pueden ser internalizadas mediante dos procedimientos principales: la fusión de la vesícula con la membrana plasmática y su internalización mediante procesos de endocitosis (Mulcahy et al., 2014). La internalización de las vesículas puede ser muy baja en algunos tipos celulares, lo que implica que se necesita una alta proporción de EVs para desencadenar un proceso funcional (Bonsargent et al., 2021; Jurgielewicz et al., 2020; Ragni et al., 2019; Somiya & Kuroda, 2021, 2022). La internalización de las EVs puede ser muy rápida, solo necesitando alrededor de 15 minutos después del tratamiento (Fabbri et al., 2012; Feng et al., 2010), aunque en algunos casos se ha reportado que si las células son incubadas a 4 °C la internalización se reduce, lo que sugiere que esta internalización requiere de procesos energéticos (Christianson et al., 2013; Escrevente et al., 2011; Temchura et al., 2008; Tian et al., 2013). Por otra parte, cuando las células son fijadas con paraformaldehído, estas no son internalizadas, lo que sugiere que la internalización no es un proceso pasivo (Fitzner et al., 2011; Pan et al., 2012). La interacción de las EVs con la membrana plasmática implica la interacción entre proteínas. Un punto importante en este sentido es que la célula productora de las EVs puede ser la diana, lo que implica señales autocrinas (Matsumoto et al., 2017). Estas uniones están mediadas por tetraspaninas, integrinas, lípidos, lectinas, proteoglicanos heparán sulfato y componentes de la matriz extracelular (van Niel et al., 2018). Se ha demostrado que las integrinas en las EVs son capaces de interactuar con proteínas ICAMs (Morelli et al., 2004). Además, la interacción de las integrinas con proteínas de la matriz extracelular tiene papeles clave en el contacto entre las EVs y la célula diana. En modelos *in vivo*, se ha demostrado que heterodímeros de integrinas pueden conducir a las EVs hacia órganos específicos. En la formación del nicho premetastásico mediante la liberación de EVs por las células tumorales, se ha descrito el papel de las integrinas en la interacción de las EVs con órganos específicos como el pulmón y el hígado (Hoshino et al., 2015). El papel de las tetraspaninas también ha sido estudiado en profundidad como proteínas que interactúan con integrinas y que fomentan la unión e internalización de las EVs (Nazarenko et al., 2010; Rana et al., 2011, 2012).

En cuanto a la internalización de las EVs, este proceso ocurre, principalmente, mediante mecanismos de endocitosis como la macropinocitosis, la fagocitosis y la endocitosis dependiente de balsas lipídicas y caveolina (Feng et al., 2010; Kamekar et al., 2017; Laulagnier et al., 2018; Tian et al., 2013). En cuanto son internalizadas, la composición de las EVs determina, en parte, su destino celular (van Niel et al., 2018).

La endocitosis es un término general que define una serie de rutas de internalización (Doherty & McMahon, 2009). Estas rutas pueden ser inhibidas específicamente de manera genética y farmacológica, lo que permite estudiar el impacto de cada una de ellas en este proceso (Mulcahy et al., 2014). Una de estas rutas está mediada por vesículas recubiertas de clatrina. Este proceso

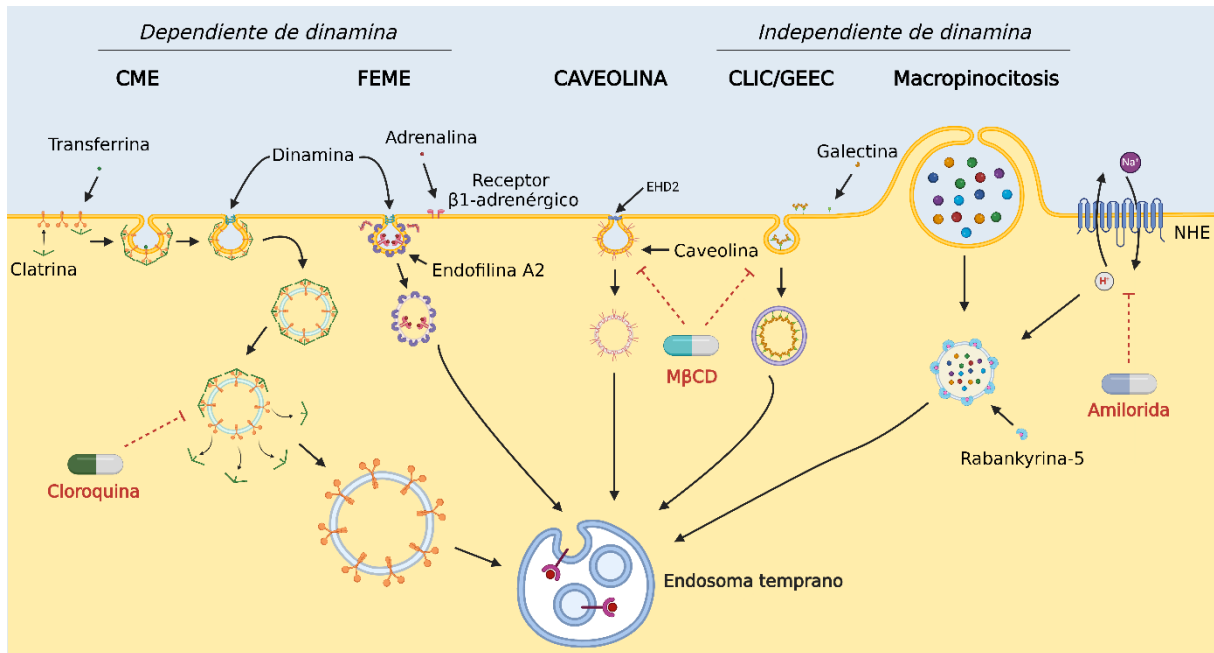


Figura 5. Rutas de endocitosis e inhibidores. Representación gráfica de las rutas de endocitosis y de los inhibidores usados en esta tesis. Imagen creada con *Biorender*

requiere la invaginación de la membrana, que se internaliza y se encuentra recubierta de clatrina (Kirchhausen, 2000). El uso del inhibidor clorpromazina previene la formación de estas vesículas, lo que reduce la internalización de EVs en un modelo de cáncer de ovario (Escrevente et al., 2011). El uso de otros inhibidores farmacológicos, como la cloroquina, también redujo la internalización (Dutta & Donaldson, 2012; Rennick et al., 2021). Estos datos apuntan a que la ruta mediada por clatrina es relevante en este proceso.

Además de esta ruta mediada por clatrina, otras rutas independientes de este proceso se han caracterizado en los últimos años (Doherty & McMahon, 2009). La ruta dependiente de caveolina, que forma pequeñas invaginaciones en la membrana plasmática conocidas como caveolas, permite la internalización de componentes extracelulares al interior celular. Estas caveolas contienen balsas lipídicas ricas en colesterol, esfingolípidos y caveolinas. Es por esto por lo que el secuestro del colesterol de la membrana mediante el uso de la metil- β -ciclodextrina (*methyl- β -cyclodextrin* o M β CD) modula este proceso (Anderson, 1998; Kurzchalia & Partan, 1999; Nabi & Le, 2003; Parton & Simons, 2007). Otras aproximaciones como la reducción de CAV1, que codifica para caveolina, reduce la internalización de EVs (Nanbo et al., 2013). Estos datos sugieren un papel relevante de la ruta dependiente de caveolina en la internalización de EVs.

En cuanto a la macropinocitosis, este proceso es muy similar a la fagocitosis, pero no es necesario el contacto con los componentes a internalizar. La macropinocitosis internaliza vesículas que portan fluido extracelular y componentes de los alrededores de la zona de formación de la vesícula endocítica (Doherty & McMahon, 2009). Este mecanismo es dependiente de actina, colesterol y el intercambio Na^+/H^+ (Kerr & Teasdale, 2009). La inhibición de este intercambio redujo los niveles de EVs internalizadas derivadas de oligodendrocitos en la microglía (Fitzner et al., 2011). Esto se puede conseguir mediante el tratamiento con amilorida, un potente inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ (Gu et al., 2010).

Mediante el tratamiento con bafilomicina A1, se pudo comprobar que este fármaco inhibe la internalización de EVs en microglía, lo que apunta al papel clave de la acidificación de las vacuolas en macropinocitosis (Fitzner et al., 2011). Aunque estos datos apuntan a un papel relevante de la macropinocitosis en la internalización de EVs, otros estudios han concluido que el tratamiento con inhibidores de esta ruta no tenía un efecto claro en su internalización (Christianson et al., 2013; Feng et al., 2010; Nanbo et al., 2013). Es posible que la macropinocitosis sea un mecanismo particular de internalización de EVs en tipos celulares concretos (Mulcahy et al., 2014). En este sentido, por ejemplo, se ha reportado que en la línea celular A549, de adenocarcinoma de epitelio basal alveolar, la macropinocitosis se encuentra aumentada (Yoon et al., 2010).

Una pregunta que surge al estudiar todos estos procesos es cuan específica es la internalización de las EVs entre tipos celulares. En este sentido, hay estudios que afirman que las EVs pueden ser internalizadas por cualquier tipo celular (Svensson et al., 2013; Zech et al., 2012), mientras que otros apuntan a que este proceso es muy específico y requiere de una compatibilidad entre las EVs y los receptores de las células diana (Atay et al., 2011; Fitzner et al., 2011; Näslund et al., 2014; Rana et al., 2012).

1.2.4 Aislamiento

El método de aislamiento o separación se debe realizar teniendo en cuenta las características biofísicas de las EVs como el tamaño, la densidad, la carga y la composición de la superficie (Welsh et al., 2024). Existen muchos métodos de separación, aislamiento y purificación de EVs disponibles, pero para concretar, solo se van a describir los métodos utilizados en este trabajo

1.2.4.1 Ultracentrifugación diferencial (*differential ultracentrifugation*)

La ultracentrifugación diferencial (dUC) se basa en la aplicación secuencial de fuerzas centrífugas relativas cada vez más altas, lo que permite el aislamiento de partículas según su tamaño. Siguiendo la ley de Stokes, la velocidad de sedimentación de una esfera es proporcional al cuadrado de su diámetro y al contraste de densidad partícula/medio, por lo que las partículas más grandes y/o densas sedimentan en las primeras centrifugaciones y las más pequeñas sedimentan a mayores velocidades y tiempos de centrifugación. Sin embargo, en el caso de las EVs, la separación no es perfecta debido a las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las vesículas (Welsh et al., 2024). También es relevante que la densidad de los medios de cultivo es distinta a la del agua, por lo que la separación mediante dUC no aísla una población concreta de EVs, sino poblaciones solapantes (Welsh et al., 2024). Las partículas con un coeficiente de sedimentación de 15-150 se pueden asociar con IEVs, mientras que aquellas con un rango de 2 a 5 se podrían considerar sEVs. En el caso de los medios de cultivo, especialmente el medio de cultivo condicionado, el aislamiento de las sEVs puede no ser tan eficiente como se espera, debido a la complejidad de los componentes del medio y a la presencia de proteínas solubles, algo que no se puede resolver aumentando el tiempo o la velocidad de centrifugación (Driedonks et al., 2019; X. Zhang et al., 2020). Finalmente, se ha descrito que la alta velocidad de centrifugación de esta metodología puede inducir agregación de distintas poblaciones de EVs (Linares et al., 2015).

1.2.4.2 Cromatografía de exclusión por tamaño (*size exclusion chromatography*)

Esta metodología separa EVs dependiendo de su tamaño, ya que la muestra pasa por columnas que contienen *beads* de tamaño de poro definido. Las variables en este sentido son las de la composición de la matriz, el tamaño de poro, el volumen de muestra y el tipo de fuerza ejercida

(bien por fuerza gravitatoria o mediante fuerza centrífuga) (Karimi et al., 2018; Welsh et al., 2024). En los últimos años se han comercializado kits específicos para el aislamiento de EVs con tamaños de poro definidos para aislar exclusivamente las vesículas a partir de multitud de biofluidos.

1.2.4.3 Asymmetric Flow Field Flow Fractionation (AF4)

En cuanto al fraccionamiento por flujo de campo (*Flow Field Fractionation* o FFF), la técnica más empleada en los estudios de EVs se basa en el fraccionamiento por flujo de campo asimétrico (*Asymmetric Flow Field Flow Fractionation* o AF4) (Sitar et al., 2015). En este método, las partículas son transportadas por un flujo de fluido con un patrón parabólico a través de un delgado canal, al mismo tiempo que un campo perpendicular a la dirección de transporte concentra las partículas en el fondo. Las partículas más pequeñas, al difundir más rápido, se desplazan hacia las regiones de mayor velocidad de flujo en el centro del canal, lo que permite su separación en función de su tamaño hidrodinámico. Esta metodología puede separar con precisión poblaciones de partículas con pequeñas diferencias de tamaño, aunque no es específico de EVs en su configuración estándar, lo que implica la optimización de los protocolos para cada caso concreto (Hood et al., 2014; Welsh et al., 2024; H. Zhang et al., 2018).

1.2.5 Estructura molecular

El estado y el tipo de la célula productora de las EVs explica su heterogeneidad y complejidad. Con el fin de ordenar la gran diversidad de componentes de las EVs, se han clasificado según su localización en las mismas. Es por esto por lo que se distinguen componentes asociados a la membrana plasmática de aquellos que se encuentran en su interior.

1.2.5.1 Componentes asociados a membrana

Entre los componentes asociados a la membrana de la vesícula destacan proteínas de la familia de las tetraspaninas como CD9, CD81, CD63, TSPAN8, CD151, CD37, CD53, Flotilin1 y 2; proteínas de adhesión celular como integrinas e ICAMs; proteínas implicadas en el tráfico intracelular como las GTPasas RAB y anexinas; Por último, proteínas específicas del tipo celular que originó las EVs como MHC-I y II, TCR, CD86, FasL, WNT y HSPG (van Niel et al., 2018).

1.2.5.2 Componentes asociados al interior de las vesículas

En el interior de las vesículas también se encuentran importantes componentes entre los que destacan enzimas como peroxidasas, piruvato quinasas y GAPDH; proteínas de transducción de señal como proteínas quinasas y β -catenina; algunos factores implicados en la biogénesis de EVs como ALIX, TSG101, sintenina, clatrina, VSPS32 y VPS4; proteínas chaperonas como HSP70 y HSP90; Finalmente, ácidos nucleicos como miARNs, ARNm y ADN (van Niel et al., 2018).

Si bien estos componentes se encuentran en la mayoría de EVs, es imposible establecer un listado exhaustivo de todos los componentes asociados a las vesículas, ya que pueden cambiar drásticamente según el estado y tipo celular. Para los intereses de esta tesis, en el siguiente apartado se discutirá la relación de cambios que presentan estas vesículas durante senescencia celular y sus implicaciones funcionales.

1.2.6 Vesículas extracelulares en senescencia

Durante senescencia celular, numerosos estudios han reportado cambios profundos en los componentes moleculares de las EVs, lo que puede explicar los efectos que producen en las células diana.

1.2.6.1 Cambios en la biogénesis y composición durante senescencia

1.2.6.1.1 Aumento de la biogénesis

Durante senescencia, la biogénesis y liberación de EVs está aumentada (Lehmann et al., 2008). Esto parece que es una respuesta general en la senescencia celular, ya que múltiples estímulos inductores de senescencia desencadenan este efecto (Lehmann et al., 2008; Takahashi et al., 2017; Takasugi et al., 2017). El aumento en la expresión proteica de p53 induce la activación de uno de sus genes diana, TSAP6, lo que se ha relacionado con esta biogénesis aumentada, aunque el mecanismo de regulación de p53 sobre TSAP6 no se conoce bien (Lehmann et al., 2008; Lespagnol et al., 2008; Yu et al., 2006). Además, el aumento de p53 durante senescencia modula la expresión de diversos genes implicados en la regulación de los endosomas como caveolina y subunidades del complejo ESCRT-III (Yu et al., 2009). Estudiando fibroblastos senescentes, se encontró que la proteína RAB27B se ve aumentada en este caso (Fujii et al., 2006). Finalmente, durante senescencia se ha demostrado el aumento de la proteína RAB5B, lo que fomenta la maduración de los endosomas (Wells et al., 2003).

1.2.6.1.2 ARNs

Entre los ácidos nucleicos que pueden transportar las EVs, se encuentra una amplia gama de ARNs como miARNs y ARNm. Estos últimos presentan cambios relevantes bajo senescencia en EVs. En un modelo de miofibroblastos primarios humanos senescentes, el estudio de las EVs que secretan demostró que las células endoteliales tratadas, vieron su proliferación reducida y mostraron un aumento en los marcadores de senescencia. Esto se puede deber al aumento en los niveles de ARNm de TGF β y MMP2 en estas vesículas, dos factores del SASP. El papel de TGF β en la inducción de senescencia paracrina ya había sido caracterizado con anterioridad, pero en este estudio se ha propuesto que el ARNm de TGF β indujo senescencia paracrina cuando se encapsula en EVs y se libera en las células diana (Acosta et al., 2013; Hettinger et al., 2021).

En cuanto a los miARNs, se ha descrito que el perfil de estos tras senescencia se ve fuertemente alterado. Tras sobreexpresar miR-433 las células entran en senescencia y, además, estas EVs son capaces de expandir el fenotipo senescente a células proliferativas (Weiner-Gorzal et al., 2015). De la misma manera, durante senescencia paracrina, se ha descrito el aumento de miR-21-5p y miR-217 en EVs derivadas de células endoteliales de cordón umbilical humano. Del mismo modo, estas EVs inducen senescencia en células proliferativas mediante la modulación de SIRT1 y DNMT1 por estos miARNs (Mensà et al., 2020). En el contexto del envejecimiento, las EVs de plasma de ratón muestran niveles reducidos de miR-146a, miR-21, miR-223 y let-7a, lo que correlaciona bien con una función inmune alterada. En este mismo artículo, los autores observaron que fibroblastos humanos (HDFs) senescentes mediante irradiación mostraban niveles reducidos de estos mismos miARNs. Por el contrario, en un modelo de estrés oxidativo, las MSCs mostraban niveles reducidos de miR-146a y estos niveles reducidos correlacionaban con una peor capacidad de cierre de heridas (Alibhai et al., 2020; M. Xu et al., 2021). Las EVs derivadas de células senescentes también se han asociado con funciones antiapoptóticas. Las EVs derivadas de HDFs inducidas a senescencia mediante estrés oxidativo

vieron alteradas el cargo de miARNs comparadas con EVs derivadas de fibroblastos quiescentes normales. Estas alteraciones en el patrón de miARNs se han asociado con actividades antiapoptóticas (Terlecki-Zaniewicz et al., 2018). El miARN miR-34a se ha asociado a la reducción de Sirt1 en BMSCs, lo que induce senescencia. *In vitro*, estudiando las EVs derivadas de mioblastos murinos C2C12 tratados con peróxido de hidrogeno, se ha encontrado que estas vesículas se enriquecen en miR-34a y son capaces de inducir senescencia paracrina en BMSCs. En este mismo estudio encontraron que la expresión de este miARN está modulada, en parte, por p53, que se encuentra muy aumentado en senescencia (T.-C. Chang et al., 2007; Fulzele et al., 2019; Raver-Shapira et al., 2007).

1.2.6.1.3 Proteínas

En cuanto a las proteínas, se conocen cambios importantes en composición durante senescencia. En células senescentes inducidas por terapia, se observaron profundos cambios en la composición de proteínas en EVs derivadas de células de cáncer de mama triple negativo. Estos cambios se asociaron a proliferación celular, apoptosis y SASP. En este mismo estudio se ha propuesto que las EVs pueden jugar un papel clave en la resistencia a terapia, lo que podría suponer una estrategia muy relevante de las TNBC a la terapia (Kavanagh et al., 2017). Otro ejemplo de cambios en las proteínas de EVs durante senescencia es la proteína EPHA2. En células primarias inducidas a senescencia mediante estrés replicativo o tratamiento con doxorubicina, se observaron cambios en la composición molecular de las EVs. No solo esto, sino que el medio condicionado derivado de estas células indujo proliferación en células MCF7. En este mismo estudio los autores describieron que esto se puede deber a la modulación de ERK mediante EPHA2 (Takasugi et al., 2017). Otro ejemplo en este sentido es el del aumento en EVs de la proteína IFITM3. Tras OIS, las células HFFF2 produjeron EVs con niveles aumentados en esta proteína y, además, el medio condicionado tras esto indujo senescencia paracrina de manera dependiente de IFITM3 (Borghesan et al., 2019). La colangitis primaria esclerosante humana o PSC es rica en colangiocitos senescentes que secretan más EVs que los colangiocitos no senescentes. Empleando un modelo murino de PSC, se encontraron más EVs en el plasma de los ratones enfermos comparados con los sanos, lo que puso de relevancia el papel de estas vesículas derivadas de colangiocitos senescentes en la liberación de múltiples factores de crecimiento, entre los que se incluye EGF. La exposición de colangiocitos normales y malignos a EVs derivadas de colangiocitos senescentes, aumentó la expresión de NRAS y la activación de la vía de ERK en los colangiocitos malignos, dependiente de la acción de EGF. Esto promovió la proliferación y la malignidad. además, estas EVs senescentes promovieron la expresión de IL-1 β y TNF, de manera dependiente de EGF, lo que indujo la activación y migración de monocitos (Al Suraih et al., 2020).

1.2.6.1.4 ADN

La primera función que se le atribuyó a las EVs derivadas de células senescentes fue la de un mecanismo crucial para mantener la homeostasis celular al servir como vía de eliminación de ADN dañado. Estos trabajos pusieron de relevancia la presencia de ADN dañado en estas vesículas. Al reducir la biogénesis o la liberación de EVs, las células senescentes presentaban niveles muy aumentados de daño en el ADN. En última instancia, esta acumulación de ADN dañado en el citoplasma desencadena la activación de la ruta de cGAS-STING. También este ADN dañado desechado por las células senescentes mediante las EVs puede desencadenar la inducción de senescencia paracrina en células vecinas mediante la activación de DDR (Takahashi et al., 2017).

En definitiva, aunque las EVs se han descrito como una manera de mantener la homeostasis celular mediante la secreción de componentes dañados (Takahashi et al., 2017), sus papeles en comunicación intercelular en el contexto de la senescencia son variados y relevantes. La potencialidad de las EVs en este proceso está lejos de ser completamente entendida y explotada.

2 OBJETIVOS

Dada la alta heterogeneidad de los componentes del SASP, así como las funciones protumorales y antitumorales que se le han atribuido, la funcionalidad y la contribución relativa de cada uno de sus componentes no está bien definida (Di Mitri & Alimonti, 2016). Dentro de las funciones antitumorales se encuentra la inducción de senescencia paracrina, que supone una prometedora vía de control de la progresión tumoral. Si bien este proceso ya había sido descrito en la década pasada (Acosta et al., 2008, 2013; Kuilman et al., 2008), desconocemos los principales mediadores de esta actividad. Uno de los componentes del SASP que podrían mediar esta función son las EVs, cuya biogénesis y liberación se encuentra aumentada durante senescencia.

En este sentido, nuestra hipótesis es que las EVs podrían ser las principales mediadoras de la inducción de senescencia paracrina.

Comprender mejor este proceso puede suponer un avance en el control de la progresión tumoral y por ello nos hemos propuesto en esta tesis, como objetivo principal, clarificar el papel de las EVs en el contexto de la senescencia inducida por terapia en un modelo tumoral. Para esto, planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar la inducción de senescencia paracrina en células A549.
- Estudiar el efecto de la modulación de la biogénesis de EVs por GW4869 y su impacto en senescencia paracrina.
- Comparar los distintos métodos de aislamiento y purificación de EVs y la contribución relativa de los distintos componentes del SASP a la senescencia paracrina.
- Modular genéticamente la biogénesis de EVs y estudiar su impacto en senescencia paracrina.
- Modular farmacológicamente las rutas de biogénesis de EVs y estudiar su efecto en senescencia paracrina.
- Modular el proceso de endocitosis y estudiar su efecto en senescencia paracrina.
- Modular el sistema inmune innato y estudiar su efecto en senescencia paracrina.

3 METODOLOGÍA

3.1 CULTIVOS CELULARES

3.1.1 Líneas celulares

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio alto en glucosa (4500 mg/L) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS, Sigma-Aldrich), penicilina/estreptomicina al 1% (P/S, Sigma-Aldrich) y glutamina al 1% (Sigma-Aldrich). Las líneas celulares se cultivaron en incubador húmedo a 37 °C y con una atmósfera de 20% O₂ y 5% CO₂. Para su conservación, las líneas se congelaron en tanque de nitrógeno líquido y en FBS suplementado con un 10% de DMSO (Sigma-Aldrich) como agente criopreservante. Para el mantenimiento y amplificación de las líneas celulares, cada 3 días se realizó un pase celular mediante la tripsinización y replaqueado de las líneas. Para esto, las células se lavaron con PBS y se incubaron con tripsina al 0,25% (Sigma) durante 10-15 minutos en incubador. Tras esto, las células se subcultivaron en placas adherentes (Corning). Las líneas celulares fueron testadas periódicamente para contaminaciones por *Mycoplasma sp.* con el kit *AmpFLSTR Identifier PCR Amplification Kit* (Thermo Fisher Scientific).

3.1.1.1 Células HEK-293T

Las células HEK-293T (Human Embryonic Kidney) son células de crecimiento adherente y de morfología epitelial que fueron aisladas a partir de riñón fetal humano. Fueron depositadas en ATCC (CRL-3216) por la Universidad de Stanford. Estas células están transformadas con el antígeno T del virus SV40 y han sido descritas como células fácilmente transfectables (Graham et al., 1977).

3.1.1.2 Células A549

Las células A549 son células de adenocarcinoma de epitelio alveolar basal humano. Esta línea celular fue aislada por primera vez en 1972 por D.J. Giard a partir de un explante de un hombre caucásico de 58 años. Fueron depositadas por primera vez en el repositorio ATCC (CCL-185) por M. Lieber en 1972. Las células A549 son hipotriploides con una dotación cromosómica de 66, lo que ocurre en un 24% de las células, aunque otras dotaciones cromosómicas son bastante comunes en esta línea. Las mutaciones más relevantes en esta línea celular en el contexto de la senescencia celular se basan en la delección del locus *INK4/ARF*, lo que conlleva a que la proteína p16 no se exprese. Esta línea celular dobla su población cada 22 horas aproximadamente.

3.1.2 Tratamientos

3.1.2.1 Tratamientos de inducción de senescencia

Para la inducción de senescencia celular las células A549 fueron tratadas durante 5 días sin cambio de medio con bleomicina (Mylan), agente quimioterápico que causa roturas de cadena simple o doble a una concentración de 20 µM. La preparación de la bleomicina se realizó diluyendo el fármaco en polvo en suero salino para realizar un stock a 20 mM con el que se trató a las células a la concentración deseada.

3.1.2.2 Otros tratamientos

- **Puromicina dihidrocloruro (Millipore):** antibiótico que inhibe la transferencia peptídica en ribosomas, utilizado para la selección de las células transducidas con los vectores PLKO.1 Scr, PLKO.1 shRAB27A #313, PLKO.1 shRAB27A #735, PLKO.1

shmTOR, pTRIPZ shcGAS, pTRIPZ shSTING y MLP30-shRELA. La dosis de puromicina utilizada fue de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cada 3 días.

- **Doxiciclina (Sigma):** antibiótico de la familia de las tetraciclinas que activa la expresión de construcciones reguladas bajo un promotor dependiente de tetraciclina. Se utilizó para inducir la expresión de pTRIPZ shcGAS y pTRIPZ shSTING a una concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 72 horas antes del inicio de los experimentos y durante los experimentos con medios condicionados, donde las células dianas fueron modificadas con estas construcciones inducibles.
- **GW4869 (Sigma):** inhibidor de la enzima esfingomielinasa neutra (N-SMase) utilizado para inhibir la producción de ceramida y la biogénesis de EVs. Utilizado a 10 μM durante 24 horas.
- **Rapamicina (Calbiochem):** inhibidor de mTORC1 utilizado a una concentración de 25 nM durante 24 horas.
- **Bafilomicina A1 (MedChem):** Inhibidor de la V-ATPasa utilizado a una concentración de 100 nM durante 24 horas.
- **ML-098 (MedChem):** activador de RAB7 utilizado a una concentración de 1 μM durante 24 horas.
- **Cloroquina (MedChem):** inhibidor de endocitosis utilizado a una concentración de 100 μM durante un pretratamiento de 1 hora y durante 8 horas con medio condicionado.
- **Metil- β -ciclodextrina (Merck):** inhibidor de endocitosis utilizado a una concentración de 1 μM durante un pretratamiento de 1 hora y durante 8 horas con medio condicionado.
- **Amilorida (Selleckchem):** inhibidor de endocitosis utilizado a una concentración de 25 μM durante un pretratamiento de 1 hora y durante 8 horas con medio condicionado.

3.2 VECTORES PLASMÍDICOS

3.2.1 Cepas empleadas

Para la amplificación del ADN plasmídico se han empleado bacterias *Escherichia coli* competentes de la cepa competente *DH5 α* para los vectores retrovirales y *Stbl3* para los vectores lentivirales.

3.2.2 Medios de cultivo bacteriano

Para el cultivo y selección bacteriana se han empleado dos tipos de medio. Por una parte, medio sólido en placa formado por caldo de lisogenia (*Lysogeny Broth* o LB) formado por triptona al 1% (Becton Dickinson, BD), NaCl 0,5% (Sigma-Aldrich), extracto de levadura al 0,5% (BD) y 1,5% de agar (Sigma-Aldrich) en agua destilada mezclado a temperatura ambiente y ampicilina (Sigma-Aldrich) a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la selección.

Por otra parte, el crecimiento y selección en medio líquido se realizó empleando caldo de lisogenia (*Lysogeny Broth* o LB) formado por triptona al 1% (Becton Dickinson, BD), NaCl 0,5% (Sigma-Aldrich) y extracto de levadura al 0,5% (BD) en agua destilada mezclado a temperatura ambiente. La selección con antibiótico se realizó suplementando el medio LB con ampicilina (Sigma-Aldrich) a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Todos estos protocolos se realizaron a la llama para evitar contaminaciones.

3.2.3 Transformación bacteriana

Para la transformación bacteriana, las distintas cepas fueron sometidas al mismo protocolo. Las cepas fueron descongeladas sobre hielo y se añadieron 5 μL del plásmido de interés, tras lo que

se incubó la suspensión bacteriana durante 20 minutos en hielo. Posteriormente, se realizó un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos. Tras el choque térmico, la suspensión fue incubada 5 minutos en hielo. Terminada la incubación se añaden 800 µL de medio LB a la suspensión y se incubó a 37 °C durante 1 hora en agitación moderada de 300 rpm. Finalmente, la suspensión bacteriana fue sembrada en placas LB-agar con ampicilina e incubadas 16 horas en estufa a 37 °C.

3.2.4 Obtención de ADN plasmídico

Para la obtención del ADN plasmídico se realizó un paso previo de precrecimiento de las colonias obtenidas en la transformación bacteriana. Para ello se hizo un protocolo de *mini-prep*, incubando entre 3 y 5 colonias obtenidas en 5 mL de medio LB líquido con ampicilina. Los precrecimientos se dejaron incubando toda la noche a 37 °C en el orbital *Forma Orbital Shaker* (Thermo Electron Corporation). Con las colonias que consiguieron crecer en estas condiciones se realizó una extracción de ADN plasmídico siguiendo los pasos del kit comercial *Monarch Plasmid Miniprep* (BioLabs). Tras medir la concentración de ADN en *Nanodrop 2000c Spectrophotometer* (Thermo Scientific), usando como referencia la relación de absorbancia 260nm/280nm de alrededor de 2.0 como indicador de alta pureza, se enviaron las muestras a la casa comercial STABVIDA para su secuenciación. Tras comprobar la integridad de la construcción en el plásmido de interés, se continuó con el protocolo de *midi-prep*.

Para llevar a cabo el protocolo de *midi-prep*, se tomó una alícuota de las colonias crecidas en la *mini-prep* con la construcción íntegra y se creció en 250 mL de medio LB con ampicilina incubando toda la noche a 37 °C en el orbital *Forma Orbital Shaker* (Thermo Electron Corporation). Al día siguiente, los cultivos se sometieron a la extracción de ADN plasmídico según los pasos del kit *Plasmid DNA purification NucleoBond Xtra Midi* (Macherey-Nagel). Finalmente, la concentración se midió en *Nanodrop 2000c Spectrophotometer* (Thermo Scientific) y se ajustó a 1 µg/µL, concentración de stock.

3.2.5 Plásmidos utilizados

Los vectores plasmídicos retrovirales utilizados en este trabajo se detallan en la **Tabla 1** y los lentivirales en la **Tabla 2**:

Tabla 1: plásmidos retrovirales utilizados

Plásmido	Referencia
pCL-ECO	Addgene #12371 (Naviaux R K et al., 1996)
pBabe-puro-IRES-EGFP (pBP-GFP)	Addgene #14430 (L. Miguel Martins, no publicado)
MLP30-shRELA	(Tasdemir et al., 2016)
MLP30-REN.713	(Tasdemir et al., 2016)

Tabla 2: plásmidos lentivirales utilizados

Plásmido	Referencia
psPAX2	Addgene #12260 (Didier Trono, no publicado)
pMD2	Addgene #12259 (Didier Trono, no publicado)
FUGW	Addgene #14883 (Lois et al., 2002)
pLP1	ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen)
pLP2	ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen)
pLP-VSVG	ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen)
pLKO.1 Scr	(Fraile-Ramos et al., 2010)

pLKO.1 shRAB27A #313	(Fraile-Ramos et al., 2010)
pLKO.1 shRAB27A #735	(Fraile-Ramos et al., 2010)
pLKO.1 shmTOR	Addgene #1855 (Sarbasov et al., 2005)
pTRIPZ shcGAS	Addgene #128175 (Vanpouille-Box et al., 2017)
pTRIPZ shSTING	Addgene #128158 (Vanpouille-Box et al., 2017)

3.3 TRANSDUCCIÓN RETROVIRAL Y LENTIVIRAL

Para la generación de las partículas lentivirales y retrovirales se utilizó la línea HEK-293T donde se cotransfectaron los empaquetadores virales correspondientes y el plásmido de interés. Para los vectores retrovirales MLP30-shRELA (control) y MLP30-shRELA se utilizaron los plásmidos empaquetadores retrovirales pLP-VSVG y pCL-ECO. En el caso de los vectores lentivirales se utilizaron los plásmidos empaquetadores lentivirales de tercera generación pLP1, pLP2 y pLP-VSVG para las construcciones pLKO.1 Scr (control), pLKO.1 shRAB27A #313, pLKO.1 shRAB27A #735, pLKO.1 shmTOR y los plásmidos empaquetadores lentivirales de segunda generación psPAX2 y pMD2 para las construcciones pTRIPZ shcGAS y pTRIPZ shSTING.

3.3.1 Transfección retroviral y lentiviral

La transfección celular en células HEK-293T se realizó con el agente transfectante polietilenimina (PEI, Polysciences) a 1 mg/mL concentración stock. Previamente, 24 horas antes de la transfección se plaquearon $5 \cdot 10^6$ células en placas de 100 mm (Corning). La mezcla de plásmidos se realizó en proporción 1:1, diluyéndolos en medio DMEM (Sigma-Aldrich) sin suplementar. En el caso de los vectores retrovirales se utilizaron los plásmidos pLP-VSVG, pCL-ECO y plásmido de interés (1:1:1). En el caso de vectores lentivirales se utilizaron plásmidos pLP1, pLP2, pLP-VSVG y plásmido de interés (1:1:1:1). La cantidad total de ADN plasmídico en ambas condiciones fueron 5 μ g. Además, se realizó una mezcla de PEI en medio DMEM (Sigma-Aldrich) sin suplementar en proporción 1:6 (ADN: PEI). En todos los experimentos de este trabajo se utilizaron placas de 100 mm (Corning) con 5 μ g de ADN plasmídico y 30 μ L de PEI en un volumen de 250 μ L por mezcla. Finalmente, ambas condiciones se mezclan para obtener un volumen de 500 μ L con todos los componentes y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente para facilitar la unión del PEI (catiónico) con el ADN (aniónico). Tras la incubación, la mezcla se añadió a las células HEK-293T y se dejó por un tiempo de 8-16 horas. Tras esto, las células fueron lavadas con PBS y el medio de cultivo se cambió por medio fresco para enriquecerlo con las partículas virales.

3.3.2 Transducción retroviral y lentiviral

Después de 36 horas, se recogió el medio cargado de partículas retrovirales o lentivirales y se filtró a través de filtros de 0,45 μ m (Jet Biofil) para eliminar los restos celulares. Para facilitar la incorporación de las partículas virales en las células receptoras A549 se utilizó el agente *Polybrene* (Hexadimethrine bromide) (Sigma-Aldrich) a 8 μ g/mL. En este punto se añadió medio fresco a las HEK-293T para producir más partículas virales. Esto se repitió en 3 rondas de infección. Como control de eficiencia del proceso de transfección y transducción retroviral y lentiviral se utilizaron los plásmidos pBP-GFP y FUGW respectivamente.

3.3.3 Selección de células transducidas

Tras las rondas, se les cambió el medio de cultivo a las células A549 receptoras y, al día siguiente, las células se seleccionaron con el antibiótico puromicina a distintas concentraciones para realizar una curva de supervivencia. Como control negativo se utilizaron células sin transducir. Finalmente, se seleccionó la concentración de 1 μ g/mL como óptima. Se realizaron

dos tratamientos de 48 horas para la selección y periódicamente se añadió más antibiótico a las líneas para conservar la selección.

3.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

3.4.1 Extracción y purificación de ARN

La obtención de ARN se realizó a partir de extractos celulares. Para ello, las células se individualizaron con tripsina 1x durante 10 minutos en el incubador. Tras esta individualización, se añadió medio DMEM suplementado para inactivar la acción de la tripsina y la suspensión celular fue transferida a tubos de centrífuga para centrifugar las suspensiones a 900 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente en la centrífuga *SL16R Centrifuge* (Thermo Scientific). El extracto celular se resuspendió en PBS 1x y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos y a 4 °C en la centrífuga 5415r (Eppendorf). Tras esto, se retiró el sobrenadante y los extractos se congelaron hasta su uso. Para la extracción se siguieron los pasos del kit comercial de extracción de ARN *NucleoSpin RNA plus* (Macherey-Nagel). Tras esto, la concentración y pureza del ARN se midieron en *Nanodrop 2000c Spectrophotometer* (Thermo Scientific), determinando su pureza con la referencia de absorbancia 260nm/280nm igual a 2.

3.4.2 Retrotranscripción de ARN

Para la obtención de ADN complementario se siguieron los pasos del kit comercial *High-Capacity cDNA ReverseTranscription* (Applied Biosystems) con el termociclador *MultiGene Optimax* (Labnet). La reacción de retrotranscripción se realizó a partir de 2 µg de ARN cuantificado en el paso anterior.

3.4.3 qRT-PCR

El análisis de los niveles de expresión génica se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) con el reactivo *NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2X), ROX* (NZYTech) en los termocicladores *AriaMX Real-Time PCR System* (Agilent Technologies) o *QuantStudio 3* (Thermo Fisher Scientific). Para cada reacción de qRT-PCR se utilizaron 33 ng de ADNc, los oligonucleótidos correspondientes a 0,25 µM y 5 µL del reactivo *NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2X), ROX* (NZYTech).

El programa de qRT-PCR utilizado se detalla en la **Tabla 3** y las secuencias de los oligonucleótidos en la **Tabla 4**:

Tabla 3: programa de qRT-PCR

	Start	Amplificación (40 ciclos)			Melting		
Temperatura	95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	95 °C	55 °C	95 °C
Tiempo	3'	30''	30''	1'	1'	30''	30''

Tabla 4: secuencias de los oligonucleótidos utilizados

GEN DE INTERÉS	SECUENCIA 5'→3'	SECUENCIA 3'→5'
<i>GAPDH</i>	TCCATGACAACCTTTGGCATCGTGG	GTTGCTGTTGAAGTCACAGGAGAC
<i>CDKN1A</i>	CCTGTAACCTGTCTTGTACCCT	GCGTTTGGAGTGGTAGAAATCT
<i>CCL2</i>	AGCTCGCACTCTCGCCTCCAG	GGCATTGATTGCATCTGGCTGAGC
<i>CXCL1</i>	GAAAGCTTGCCTCAATCCTG	CACCAGTGAGCTTCCTCCTC

<i>GDF15</i>	GACCCTCAGAGTTGCACTCC	GCCTGGTTAGCAGGTCCTC
<i>PDGFA</i>	CAGCGACTCCTGGAGATAGACT	CGATGCTTCTCTTCTCCGAATG
<i>SERPINE1</i>	CTCATCAGCCACTGGAAAGGCA	GACTCGTGAAGTCAGCCTGAAAC
<i>RAB27A</i>	GCTTTGGGAGACTCTGGTGTA	TCAATGCCCACTGTTGTGATAAA
<i>mTOR</i>	TCGCTGAAGTCACACAGACC	CTTTGGCATATGCTCGGCAC
<i>MMP3</i>	TGTTTCGTTTTCTCCTGCCTGT	CAGCAGCCCATTTGAATGCC
<i>NFKB1</i>	GCAGCACTACTTCTTGACCACC	TCTGCTCCTGAGCATTGACGTC

3.5 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA

3.5.1 Extracción de proteína total

La extracción de proteína total se realizó a partir de extractos celulares. Para esto, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS 1x (Sigma-Aldrich). Tras esto, se retiró el PBS 1x y se individualizaron las células con tripsina 1x (Sigma-Aldrich), incubando 10 minutos a 37 °C en incubador. Al finalizar la incubación, la tripsina se neutralizó con DMEM suplementado y la mezcla fue transferida a tubos de centrifuga para centrifugar las células a 900 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente en la centrifuga *SL16R Centrifuge* (Thermo Scientific). El extracto celular se resuspendió en PBS 1x y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C en la centrifuga 5415r (Eppendorf). Los extractos se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento.

Para la extracción de proteína, los extractos celulares se lisaron con buffer RIPA 1x (*Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer*) formado por 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1% SDS, 1% Tritón X-100, 5 mM EDTA (pH 8,0), 1% deoxicolato de sodio, suplementado con inhibidores de proteasas compuesto por 1 mM ortovanadato sódico, 1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), 1mM DTT (ditiotreitól), 4 mM de NaF y 1x cóctel de inhibidores proteicos P8340 (Sigma). El volumen de RIPA 1x utilizado se calculó en función del tamaño del extracto celular. Los extractos celulares con RIPA 1x se incubaron 20 minutos en hielo. Finalmente, se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos a 4 °C en la centrifuga 5415r (Eppendorf) para recoger el sobrenadante con las proteínas.

3.5.2 Cuantificación de proteína

La cuantificación de la proteína extraída se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) siguiendo los pasos del kit comercial *DC Protein Assay* (BIO-RAD). Como recta patrón de calibrado se utilizó BSA (*bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich) en concentraciones crecientes conocidas. Todas las medidas se realizaron por triplicado técnico. La absorbancia se midió en el espectrofotómetro de microplacas *Epoch2* (Bio Tek) a 750 nm.

3.5.3 Western blot

Para el análisis de la expresión proteica por Western blot se utilizaron 30 µg del extracto cuantificado con tampón de carga Laemmli (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0,004% de azul de bromofenol y 125 mM Tris-HCl (pH 6,8)) a una concentración de 1x en agua destilada. Las muestras se hirvieron previamente a su carga a 95 °C durante 5 minutos en thermoblock *Thermomixer Compact* (Eppendorf). La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida NuPAGE en gradiente del 4 al 12 % (Invitrogen) y con el sistema *XCell SureLock* (Invitrogen). Como marcador de peso molecular se utilizó el *Pageruler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher).

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF de 0,45 μm (Merck-Millipore), previamente activada con metanol, usando transferencia húmeda en el equipo *XCell SureLock* (Invitrogen) a 30 voltios durante 1 hora. Finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon con una solución de leche al 5% en TTBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 150 mM y 0,05 % Tween-20) durante 1 hora. Tras el bloqueo, se incubaron los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C y en agitación moderada. La relación de anticuerpos primarios utilizados en esta tesis se detalla en la **Tabla 5**. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TTBS y las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente en leche al 5% en TTBS durante 45 minutos. La relación de anticuerpos secundarios utilizados se detalla en la **Tabla 6**. Tras esta incubación, se repitieron los 3 lavados de 10 minutos y se incubaron las membranas con el sustrato *SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher) para su inmunodetección en el equipo *ChemiDoc MP Image System* (BIO-RAD).

Tabla 5: lista de anticuerpos primarios utilizados

ANTICUERPO	REFERENCIA	HUÉSPED	DILUCIÓN
B-ACTINA	Santa Cruz Biotechnology, sc-32233	Ratón	1:1000
VINCULINA	Santa Cruz Biotechnology, sc-76314	Ratón	1:2000
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology, sc-32233	Ratón	1:1000
p21	Cell Signaling #2947	Conejo	1:1000
TUBULINA	Cell Signaling #2146	Conejo	1:1000
RAB27A	Cell Signaling #69295	Conejo	1:1000
ALIX	Abcam #88743	Ratón	1:1000
mTOR	Cell Signaling #2983	Conejo	1:1000
LC3B	Cell Signaling #2775	Conejo	1:1000
p62	Cell Signaling #5114	Conejo	1:1000
p53	Santa Cruz Biotechnology, sc-6243	Conejo	1:1000
γ H2AX	Cell Signaling #9718	Conejo	1:200
p21	Santa Cruz Biotechnology, sc-6246	Ratón	1:200

Tabla 6: lista de anticuerpos secundarios utilizados

ANTICUERPO	REFERENCIA	DILUCIÓN
α -ratón IgG-HRP	Invitrogen, #31430	1:5000
α -conejo IgG-HRP	Invitrogen, #31460	1:5000
Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	1:500
Alexa Fluor 647	Thermo Fisher Scientific	1:500

3.6 ANÁLISIS MEDIANTE ARRAY DE CITOQUINAS

Para la caracterización de los factores solubles liberados por células senescentes se utilizó *array* de citoquinas siguiendo los pasos del kit *Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit* (Biotechne). Para la caracterización de los factores solubles en los medios condicionados se tomaron 500 μL de medio y se diluyeron hasta 1,5 mL en el buffer indicado. Para la caracterización de factores solubles en los aislados de EVs, se aislaron las vesículas a partir de 8 mL de CM con ultracentrifugación diferencial (dUC) o cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y se concentraron hasta un volumen de 500 μL . Tras esto se diluyeron hasta 1,5 mL en el buffer indicado y se incubaron con las membranas del kit. Para su inmunodetección se utilizó el equipo *ChemiDoc MP Image System* (BIO-RAD).

3.7 DETECCIÓN DE MARCADORES DE SENESCENCIA

3.7.1 Tinción SA- β -GAL cromogénica

Para la detección de la actividad beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -GAL) en cultivo se retiró el medio y se lavaron las células con PBS 1x dos veces. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído al 2% (Electron Microscopy Sciences) y glutaraldehído (Fisher) al 0,2% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, las células se lavaron tres veces con PBS 1x. La solución de tinción se preparó mezclando ácido cítrico/fosfato sódico (pH 6,0) a 40 mM, NaCl a 150 mM, K₃Fe (CN)₆ a 5 mM, K₄Fe(CN)₆ a 5mM, MgCl₂ a 2 mM y X-gal (*5-bromo-4chloro-3-indolyl β -D-galactose*) a 1 mg/mL en agua destilada. Tras preparar la solución de tinción, las células fueron teñidas toda la noche a 37 °C y en ausencia de CO₂. Tras la tinción, las células se lavaron con PBS 1x. El porcentaje de células positivas se obtuvo por contaje a partir de 10 fotografías a 10x aumentos en el microscopio *Axio Vert.A1* (Zeiss).

3.7.2 Detección de actividad SA- β -GAL por citometría

Para la detección de la actividad SA- β -GAL por citometría, las células fueron tripsinizadas con tripsina al 1x (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos a 37 °C en incubador. Tras la incubación con la tripsina, la actividad de esta enzima se neutralizó con medio DMEM suplementado (Sigma-Aldrich). Tras esto, las células fueron centrifugadas a 900 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente en la centrífuga *SL16R Centrifuge* (Thermo Scientific). Después, los extractos celulares se resuspendieron en PBS 1x y se centrifugaron en la centrífuga *SL16R Centrifuge* (Thermo Scientific). Después, el sobrenadante se retiró y las células fueron fijadas con paraformaldehído al 3,7% durante 15 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Tras esto, se siguieron los pasos del kit comercial *CellEvent™ Senescence Green Flow Cytometry Assay* (Invitrogen).

Para la detección de células positivas, las muestras fueron analizadas en el citómetro *BD Accuri™ C6 Plus* (BD) o *Cytoflex S Flow Cytometer* (Beckman Coulter) recogiendo 10000 eventos. En todas las medidas se utilizó un control sin teñir para evaluar la positividad basal.

3.7.3 Contaje celular

Para llevar a cabo el contaje celular, las células fueron tripsinizadas con el mismo protocolo descrito anteriormente y contadas con el contador automático de células *LUNA II* (Logos Biosystems). Para ello, 10 μ L de la suspensión celular fueron cargados en cámaras de Neubauer desechables (Logos Biosystems).

3.7.4 Tamaño celular

Para cuantificar el tamaño medio de las células, se utilizó de nuevo el contador automático de células *LUNA II* (Logos Biosystems) con las cámaras de Neubauer desechables (Logos Biosystems) cargando 10 μ L de suspensión celular.

3.8 TINCIONES

3.8.1 EdU

Para analizar la incorporación de EdU mediante inmunofluorescencia, las células se sembraron en *chamber slides* (Lab-Tek) y se siguió los pasos del kit *Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging* (Invitrogen), usando DAPI (D9542, Sigma) como tinción nuclear. En el caso de la línea celular

A549, estas células se incubaron con EdU 10 μ M durante 2 horas a 37 °C en el incubador. Finalmente, se utilizó como medio de montaje *ProLong* (Thermo Fisher Scientific) y las muestras se fotografiaron con microscopio *Axio Vert.A1 Microscope* (Zeiss).

3.8.2 Cristal violeta

Para evaluar la formación de colonias, las células proliferativas y senescentes fueron plaqueadas a baja densidad (1000 células por pocillo de P6 o P12) y se dejaron proliferar durante 14 días. Al finalizar estos 14 días, las células fueron fijadas con paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences) al 4% y se tiñeron con una solución de cristal violeta (Sigma) al 0,05%. Tras 30 minutos de incubación con el cristal violeta, este se retiró, las células fueron lavadas dos veces con agua destilada y las muestras se dejaron secar hasta su escaneado con el escáner *CanoScan LiDE 210* (Canon). Para cuantificar esta tinción, se eluyó el cristal violeta con una solución de ácido acético al 4% durante 15 minutos se cuantificó la absorbancia a 590 nm en el espectrofotómetro *Epoch2* (BioTek).

3.8.3 Naranja de acridina

Para evaluar la acidificación de los lisosomas se utilizó la tinción de naranja de acridina (AO). Las células fueron sembradas e incubadas con bafilomicina A1, rapamicina y ML-098 durante 24 horas. Tras este tratamiento, las células fueron incubadas con una solución de DMEM suplementado y AO a 1 μ g/mL durante 1 hora, tras lo que se lavó las células con PBS 1x. Las fotografías se realizaron con el microscopio confocal *Leica SP8* (Leica) y se mantuvieron en PBS 1x suplementado con un 2% de FBS durante este proceso.

3.9 INMUNOFLUORESCENCIA

Para la detección de p21 y γ H2AX en las células diana, las células fueron plaqueadas en *chamber slides* (Lab-Tek). Una vez adheridas, fueron lavadas con PBS 1x y fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS durante 15 minutos. Después de la fijación, las células fueron lavadas con PBS 1x y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,25% (Merck) en PBS durante 30 minutos. Tras la permeabilización, las células fueron bloqueadas con BSA al 2% en PBS durante 20 minutos y lavadas con PBS 1x. Después, las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios (γ H2AX Cell Signaling y p21 Santa Cruz Biotechnology) a 1:200 en BSA al 2% PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas tras la incubación con los primarios e incubadas con los anticuerpos secundarios (Alexa Fluor 488 Thermo Fisher Scientific y Alexa Fluor 647 Thermo Fisher Scientific, respectivamente) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras esto, las células fueron lavadas e incubadas con DAPI (D9542, Sigma) a una concentración de 1 μ g/mL como tinción nuclear. Finalmente, se utilizó el medio de montaje *ProLong Diamond Antifade Mountant* (Invitrogen) y las muestras se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente. Las fotografías se realizaron con el microscopio confocal *Leica SP8* (Leica).

3.10 OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS Y VESÍCULAS EXTRACELULARES

3.10.1 Obtención de medio condicionado

Después de la inducción de senescencia se sembraron las células proliferativas a la misma densidad que las células senescentes. Pasadas 24 horas, se les cambió el medio a ambas condiciones lavando las células con PBS 1x (Sigma-Aldrich) y añadiendo DMEM sin FBS para evitar la contaminación por EVs presentes en el FBS en los experimentos de caracterización o

DMEM suplementado para los ensayos funcionales durante 24 horas para su condicionado. Tras el condicionado, los medios se transfirieron a tubos de centrifuga y se centrifugaron a 500g durante 10 minutos en la centrífuga *SL16R Centrifuge* (Thermo Scientific) para separar los desechos celulares y cuerpos apoptóticos del resto de componentes del medio condicionado (CM). Tras la centrifugación, el CM se transfirió a tubos de centrifuga nuevos y se almacenó a 4 °C para su procesamiento posterior.

3.10.2 Ultrafiltrado

Para el ultrafiltrado de los medios condicionados, 15 mL de medio condicionado como máximo se cargaron en tubos de ultrafiltrado *Amicon MWCO 3 kDa* (Merck). Los medios condicionados cargados en tubos de ultrafiltrado se centrifugaron durante 15 minutos a 3000g, tras lo que se recuperó la fracción superior y se almacenó hasta su procesamiento posterior.

3.10.3 Aislamiento mediante ultracentrifugación diferencial

Para la disección del CM mediante ultracentrifugación diferencial (dUC) se realizaron tres ultracentrifugaciones seriadas en la ultracentrifuga *Optima L 100XP* (Beckman-Coulter) con el rotor (SW-32Ti, Beckman-Coulter). En la primera ultracentrifugación, el CM se sometió a 12000g durante 20 minutos a 4 °C para aislar las microvesículas del resto de componentes. Después, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de ultracentrifuga y se sometió a 100000g durante 70 minutos a 4 °C para aislar las sEVs. El sobrenadante ahora libre del componente vesicular (SN) donde se encuentran los factores solubles se almacenó a 4 °C hasta su uso. El pellet, donde obtenemos las sEVs, fue resuspendido en PBS 1x estéril para su lavado y se centrifugaron a 100000g durante 70 minutos a 4 °C. Tras esto, el PBS 1x fue retirado y las vesículas fueron resuspendidas en el medio adecuado dependiendo su destino.

Para ensayos funcionales, las vesículas fueron resuspendidas en DMEM suplementado y para los ensayos de caracterización las sEVs fueron resuspendidas en PBS 1x. En las figuras principales se muestra la cuantificación de la citometría y en el apartado Anexos los gráficos.

3.10.4 Aislamiento y purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño

Para el aislamiento de las EVs mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se siguieron los pasos del kit *Smart SEC™ Single for EV Isolation* (System Biosciences). Muy brevemente, se cargaron 4 mL de CM en cada columna de cromatografía y se incubó durante 30 minutos en rotación moderada. Tras esta incubación, las columnas se centrifugaron a 500g durante 1 minuto insertadas en tubos de centrifuga de 15 mL para recoger las EVs. Las EVs aisladas fueron almacenadas a 4 °C hasta su procesado.

Para los ensayos de caracterización, las EVs se mantuvieron en el propio eluido de la columna de cromatografía, mientras que para los ensayos funcionales el eluido se resuspendió en DMEM suplementado con 40% FBS, y 4% de penicilina/estreptomicina en proporción 3:1 (EVs:DMEM) para adecuarlo a las proporciones del DMEM suplementado estándar.

3.11 CARACTERIZACIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS Y VESÍCULAS EXTRACELULARES

3.11.1 Marcaje de vesículas extracelulares con DiO

Para el marcaje de las vesículas extracelulares se utilizó el marcador DiO, siguiendo los pasos del kit *Vybrant Multicolor Cell Labeling* (ThermoFisher). Para ello, las vesículas extracelulares se aislaron mediante dUC y se resuspendieron en 1 mL de PBS con 8 µL de colorante. Esta

mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación, se añadió PBS hasta completar el volumen mínimo de tubo de ultracentrífuga y se centrifugó durante 70 minutos a 4 °C. Las EVs marcadas se resuspendieron en DMEM suplementado para los ensayos de internalización (apartado 2.12.1).

3.11.2 Caracterización mediante NTA

Para la caracterización del tamaño hidrodinámico y la concentración mediante NTA, los CM fueron diluidos en PBS 1x en relación 1:10 (para el análisis de EVs en el CM) y 1:100 (en el caso de EVs aisladas por dUC y SEC) para su inyección en el equipo *Nanosight NTA v2.3* (Malvern Instruments). Cada muestra se analizó 5 veces durante 60 segundos de registro con un umbral de detección de 11 y el nivel de la cámara en 15.

3.11.3 Detección mediante cuantificación de proteína

Para la cuantificación de proteína de EVs purificadas, se siguieron los pasos del kit *Micro BCA™ Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific). La absorbancia se midió a 562 nm en el espectrofotómetro *Epoch2* (BioTech) usando como recta patrón de calibrado concentraciones conocidas de BSA.

3.11.4 Caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para la caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión, las EVs purificadas por SEC se resuspendieron en PBS 1x y se enviaron a analizar al departamento de Estructuras Macromoleculares (CNB-CSIC).

3.11.5 Caracterización mediante AF4

Para la caracterización de las EVs mediante la tecnología de AF4, se generaron 100 mL de CM- y CM+ y se ultrafiltraron como se describió en el apartado 2.10.2 hasta un volumen de 2 mL. Estos CM ultrafiltrados se analizaron mediante el equipo *AF2000 System* (Postnova Analytics), equipado con desgasificador, bombas TIP y de enfoque, sistema automático de procesado de muestras y un colector de fracciones (*Waters Fraction Collector III*). El canal de separación contiene un separador de 500 µm y una membrana de celulosa regenerada (RC) con un *cut-off* de 10 kDa. Como detectores se utilizaron un detector UV a 280 nm y un detector de dispersión de luz de ángulo múltiple (*MALS*). Para el análisis de las muestras, 52 µL de la misma fueron inyectados con un flujo de 2 mL/minuto.

3.12 ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD

3.12.1 Internalización

Los ensayos de internalización se realizaron con el marcador DiO. Tras el marcaje de las EVs, estas vesículas se incubaron con las células diana, plaqueadas el día anterior, durante 16 horas. Después de esta incubación, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS durante 15 minutos. Tras esta fijación, las células fueron lavadas con PBS 1x y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,25% (Merck) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se realizaron tres lavados con BSA al 2% en PBS y se bloquearon con una solución de BSA al 2% en TBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, las células fueron teñidas con faloidina (*Phalloidin–Tetramethylrhodamine B isothiocyanate*, P1951, Sigma) diluida 1:100 en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente, tras lo que se realizaron de nuevo tres lavados con PBS. Tras este proceso, las células se tiñeron con (D9542, Sigma) a una concentración de 1 µg/mL durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por último,

las células se lavaron tres veces con PBS 1x, tras lo que se utilizó el medio de montaje *ProLong Diamond Antifade Mountant* (Invitrogen). Las muestras se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Después del secado, las muestras se conservaron a 4 °C hasta la obtención de las fotografías con el microscopio confocal *Leica SP8* (Leica).

3.12.2 Inducción de senescencia paracrina con medios condicionados

Para los ensayos de funcionalidad con los medios condicionados, estos se generaron como se ha descrito en el apartado 2.10. En el caso de los ensayos con CM-, CM+, CM+ GW4869+, CM+ BAFA1+, CM+RAPA+, CM+ML-098+, CM+ shRAB27A #313, CM+ shRAB27A #735 y CM+shmTOR, la obtención del medio condicionado se realizó incubando las células productoras con DMEM suplementado durante 24 horas. Este medio condicionado se centrifugó a 500g durante 10 minutos en la centrífuga *SL16R Centrifuge* (Thermo Scientific) para separar los desechos celulares y cuerpos apoptóticos del resto de componentes. Se realizaron dos tratamientos de 3 días. Al finalizar el primer tratamiento, las células fueron tripsinizadas, contadas y replaqueadas al número inicial para un segundo tratamiento, tras lo que se midieron los marcadores de senescencia. En el caso del tratamiento con las EVs purificadas, el SN, las vesículas aisladas por dUC y las vesículas aisladas por SEC se obtuvieron como se ha descrito en el apartado 2.10. Para estos ensayos de funcionalidad, las vesículas aisladas por dUC se resuspendieron en DMEM suplementado y las vesículas aisladas por SEC se resuspendieron en DMEM suplementado con 40% FBS, y 4% de penicilina/estreptomicina en proporción 3:1 (EVs:DMEM). Los volúmenes de resuspensión para ambas condiciones fueron equivalentes. En el caso de los tratamientos con los inhibidores de endocitosis, las células diana fueron pretratadas con los inhibidores durante 1 hora para inhibir la ruta, tras lo cual las células fueron lavadas con PBS e incubadas con CM+ en presencia de los inhibidores durante 8 horas, tras lo que se volvieron a lavar con PBS e incubadas con CM+ hasta el fin del tratamiento de 3 días. Esto se repitió para un segundo tratamiento. En el caso de los tratamientos con CM+ en células shcGAS y shSTING, al medio condicionado se le añadió doxiciclina a 4 µg/mL durante los dos tratamientos para mantener activa la expresión de la construcción inducible.

3.13 MICROSCOPIA

Para la observación periódica de las células se utilizó el microscopio *Primo Vert Microscope* (Zeiss). Para la adquisición de imágenes de campo claro o de fluorescencia, se utilizó el microscopio *Axio Vert.A1 Microscope* (Zeiss).

3.14 SOFTWARES UTILIZADOS

Para el análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo se ha utilizado el software *FlowJo V10*. Para el análisis estadístico de los datos y las representaciones gráficas se ha utilizado el software *Graphpad PRISM 9.4.1*. Las figuras ilustrativas de esta tesis se crearon con *Biorender*.

3.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tras la comprobación de la normalidad de los residuos de cada conjunto de datos mediante el test de Shapiro-Wilk, se ha ejecutado test t de Student para la comparativa de una misma variable en dos grupos. En el caso de más grupos, se ha empleado la prueba ANOVA con el test post-hoc de Tukey y corrección de los p valores. La significancia estadística representa con el valor exacto del p valor obtenido, considerando la significancia estadística como igual o inferior a 0,05.

4 RESULTADOS

En el contexto del cáncer, la inducción de senescencia celular tras quimioterapia se ha descrito como una prometedora vía de control de la progresión tumoral (Ewald et al., 2010; Schmitt et al., 2022; Shao et al., 2014). Aunque estos fármacos consiguen frenar la progresión tumoral, la presencia del SASP y su papel dual pueden ser perjudiciales. El SASP, como ya se ha descrito, es muy heterogéneo y modula activamente el microambiente tumoral (Di Mitri & Alimonti, 2016). Dado que, como ya se ha mencionado en los objetivos, el estudio de la contribución de los distintos factores del SASP es un campo lleno de contradicciones que es necesario aclarar, nos propusimos en esta tesis estudiar la contribución relativa de los componentes del SASP a la inducción de senescencia paracrina.

4.1 CARACTERIZACIÓN DE SENESCENCIA POR ESTRÉS QUIMIOTERÁPICO EN A549

En primer lugar, resultados previos de nuestro laboratorio han caracterizado el papel de la bleomicina como un potente agente inductor de senescencia en la línea celular A549 de adenocarcinoma de epitelio alveolar basal humano.

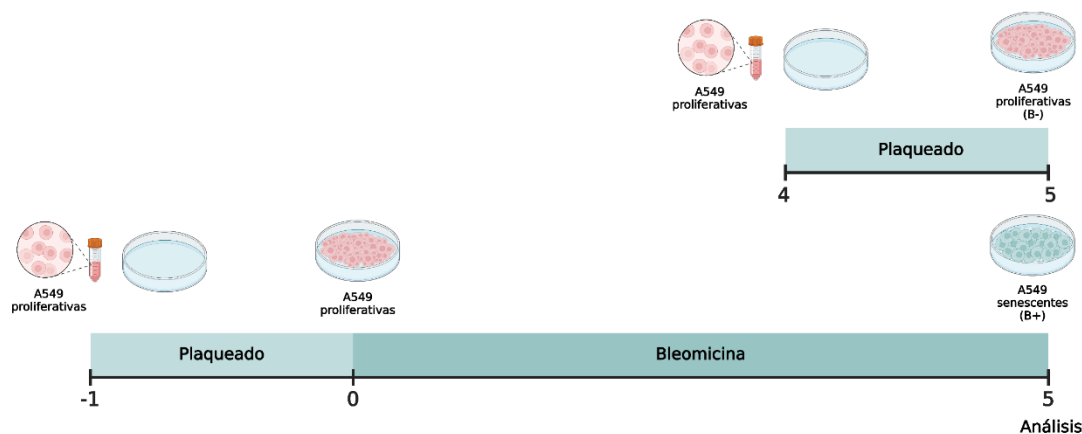


Figura 6. Inducción de senescencia celular con bleomicina. Representación esquemática del tratamiento con bleomicina. Las células A549 plaqueadas fueron tratadas con el fármaco durante 5 días sin cambio de medio, tras lo cual se analizaron los marcadores de senescencia. Imagen generada con *Biorender*.

La bleomicina se ha utilizado ampliamente en clínica para el tratamiento de carcinoma de células escamosas, linfomas y carcinoma prostático. La inducción de senescencia mediada por este fármaco se debe a la rotura de cadena simple o doble que ocasiona, lo que dispara la entrada en senescencia y la producción de SASP (Aoshiba et al., 2003, 2013). En la línea celular A549, el modelo estándar que se ha empleado en este trabajo, las células fueron tratadas con bleomicina a una concentración de 20 μM durante 5 días sin cambio de medio. Tras este tratamiento, evaluamos la inducción de senescencia celular (**Figura 6**).

Como se puede observar, tras el tratamiento con bleomicina (B+), las células sufren cambios morfológicos drásticos, comparadas con el control proliferativo (B-), como el aumento del tamaño citoplasmático, que también se vacuola y se aplatina (**Figura 7A**). Al mismo tiempo, tras el tratamiento el porcentaje de células positivas para la tinción SA- β -GAL cromogénica (X-gal) aumenta de manera estadísticamente significativa (**Figura 7A**). Del mismo modo, el análisis por citometría de flujo usando el sustrato C_{12}FDG mostró un incremento de las células positivas para esta tinción (**Figura 7B**).

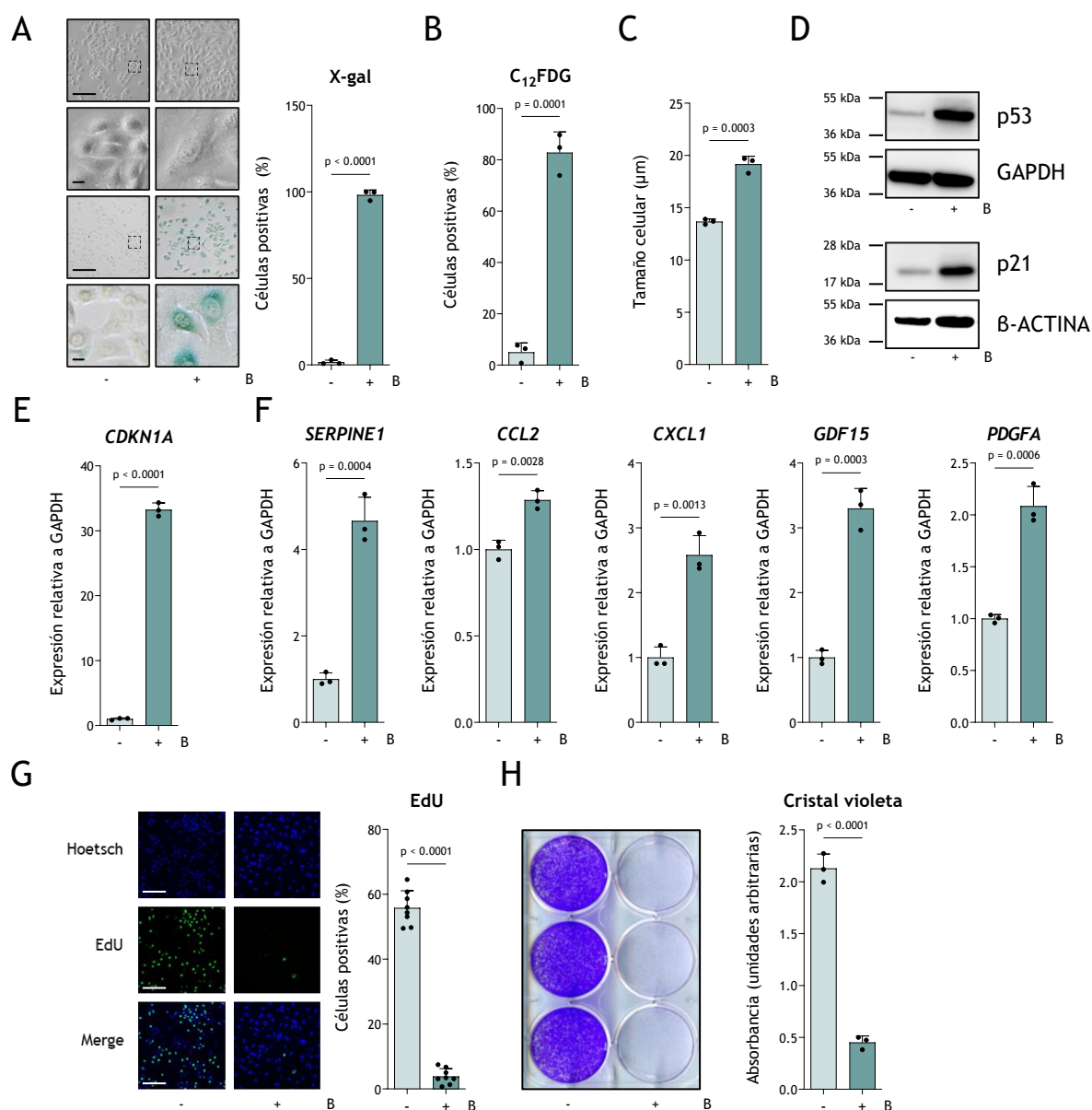


Figura 7. Caracterización de senescencia celular en A549 tras bleomicina. (A) Imágenes representativas del cambio morfológico y tinción SA-β-GAL en células A549 proliferativas (B-), senescentes tras bleomicina (B+) y la cuantificación de la tinción. La escala de mayor tamaño representa 200 μm y la de menor tamaño 15 μm. (B) Análisis de la actividad beta-galactosidasa mediante la detección de células positivas para C₁₂FDG mediante citometría de flujo. (C) Medición del tamaño celular. (D) Análisis de la expresión proteica de p53 y p21 mediante Western blot. Control de carga GAPDH y B-ACTINA respectivamente. (E) Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR de *CDKN1A*. Los valores se relativizaron frente al gen de mantenimiento *GAPDH*. (F) Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR de los genes del SASP *SERPINE1*, *CCL2*, *CXCL1*, *GDF15* y *PDGFA*. Los valores se relativizaron frente al gen de mantenimiento *GAPDH*. (G) Análisis de la incorporación de EdU y su cuantificación. Se utilizó la tinción Hoestch como tinción nuclear. La escala representa 200 μm. (H) Ensayo de formación de colonias teñidas con cristal violeta y su cuantificación. La significancia estadística se obtuvo con la prueba t de Student. A-F y H (n=3); G (n=1).

También observamos un aumento del tamaño celular tras el tratamiento (**Figura 7C**), además de que el análisis mediante Western blot de las proteínas p53 y p21, consideradas marcadores de senescencia celular, así como los niveles de ARNm de *CDKN1A* (que codifica para p21) y de los genes del SASP (*SERPINE1*, *CCL2*, *CXCL1*, *GDF15* y *PDGFA*) demostró que todos estos marcadores se encuentran aumentados tras el tratamiento (**Figura 7D, E y F**). Del mismo modo, las células dejan de incorporar EdU, lo que apunta a que la síntesis de ADN está comprometida (**Figura 7G**). Finalmente, el ensayo de formación de colonias demuestra que la proliferación se detiene tras el tratamiento de manera significativa (**Figura 7H**).

En conclusión, el modelo celular de inducción de senescencia con bleomicina a 20 μM en células A549 consigue establecer un fuerte fenotipo senescente, lo que concuerda con los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio.

4.2 CARACTERIZACIÓN DE SENESCENCIA PARACRINA MEDIADA POR MEDIOS CONDICIONADOS DE CÉLULAS A549 SENESCENTES TRAS QUIMIOTERAPIA

Tras el establecimiento del fenotipo senescente con bleomicina, decidimos evaluar la inducción de senescencia paracrina mediada por los medios condicionados (*conditioned media* o CM) derivados de las células A549 proliferativas (CM-) y senescentes (CM+) sobre A549 proliferativas. Para ello se condicionó el medio durante 24 horas tras la inducción de senescencia celular para que el CM se enriquezca con los factores solubles del SASP y las vesículas extracelulares (*extracellular vesicles* o EVs) y se centrifugó a 500g durante 10 minutos para eliminar restos celulares. Las células A549 proliferativas con este medio condicionado fueron cultivadas durante 3 días sin cambio de medio. Tras el primer tratamiento, las células fueron tripsinizadas, contadas y replaqueadas al número inicial para un segundo tratamiento de 3 días, tras el cual se evaluó la inducción de senescencia paracrina (**Figura 8**).

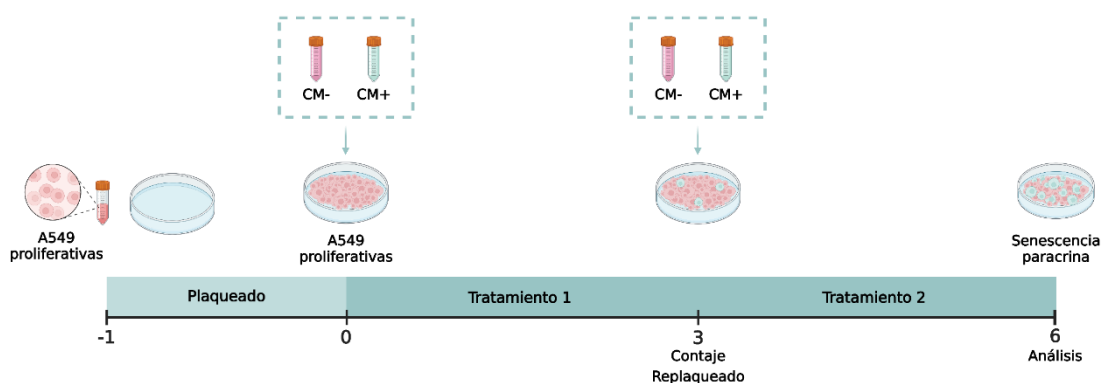


Figura 8. Protocolo de inducción de senescencia paracrina. Imagen representativa del protocolo de inducción de senescencia paracrina mediante dos tratamientos de 3 días con los CM proliferativo y senescente (CM- y CM+ respectivamente). Tras el primer tratamiento las células se contaron y replaquearon al número inicial. Imagen creada con *Biorender*.

Tras los dos tratamientos sucesivos con el CM, las células exhibieron un cambio morfológico que se puede asociar a la entrada en senescencia, al mismo tiempo que las células positivas para la tinción SA- β -GAL cromogénica en la condición CM+ aumentaron de manera estadísticamente significativa. Al mismo tiempo, las células positivas para la tinción con el sustrato C₁₂FDG analizado mediante citometría de flujo aumentaron de manera significativa tras el tratamiento con CM+ (**Figura 9A y B**). Al comprobar el tamaño celular, observamos

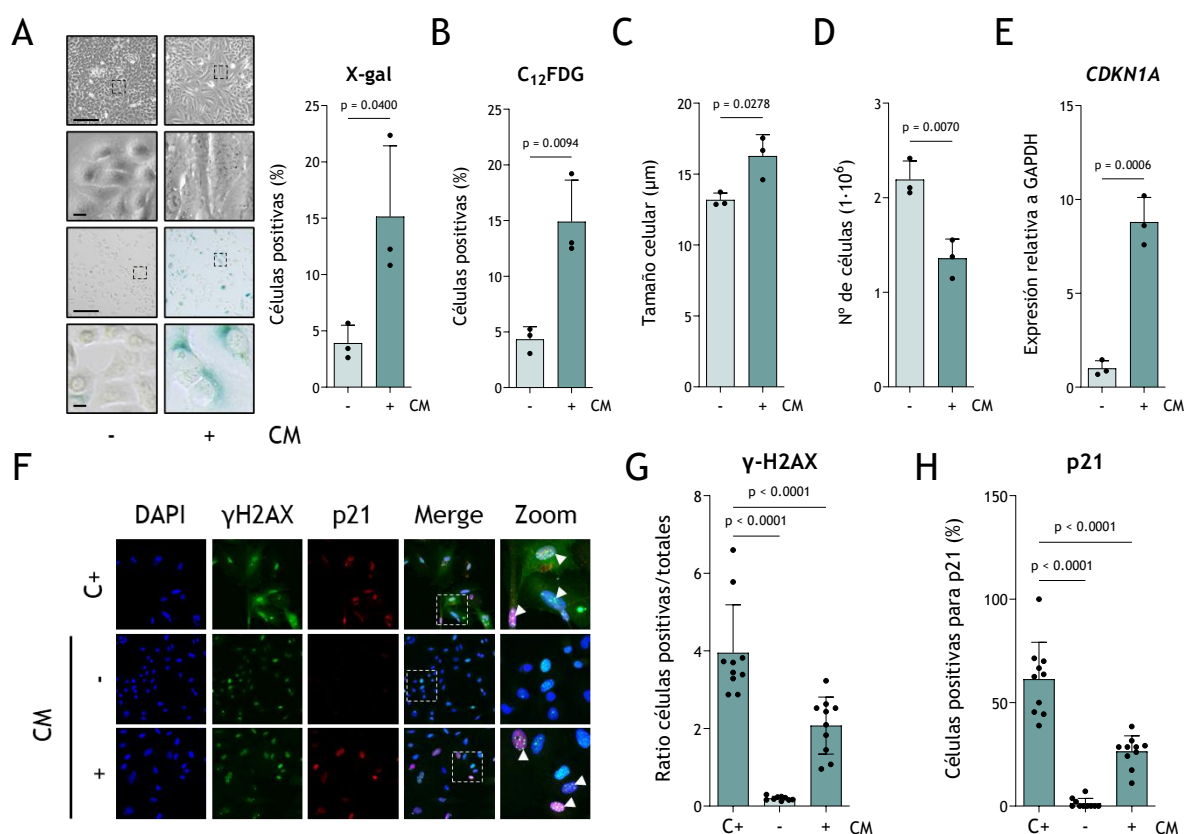


Figura 9. Caracterización de la inducción de senescencia paracrina. (A) Imágenes representativas del cambio morfológico y tinción SA-B-GAL cromogénica tras el tratamiento con el CM proliferativo (CM-) y senescente (CM+) y cuantificación de la tinción. La escala de mayor tamaño representa 200 μm y la de menor tamaño 15 μm . (B) Análisis de la actividad beta-galactosidasa mediante la detección de células positivas para C₁₂FDG mediante citometría de flujo. (D) Medición del tamaño celular. (E) Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR de *CDKN1A*. Los valores se relativizaron con respecto al gen de mantenimiento *GAPDH*. (F) Imágenes representativas de la tinción inmunofluorescente para los marcadores γH2AX y p21. Se utilizó DAPI como marcador nuclear. La primera escala representa 200 μm y la segunda escala 30 μm . (G) Cuantificación de las células positivas para el marcador γH2AX . (H) Cuantificación de las células positivas para el marcador p21. La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba t de Student. A-E (n=3). La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba ANOVA con el test post-hoc de Tukey. F, G y H (n=1).

que estaba aumentando en las células tratadas con CM+ en comparación con el control CM- (**Figura 9C**). Así mismo, el número total de células tras el tratamiento con CM+ se vio significativamente reducido en comparación con CM- y, además, estas células mostraron niveles de expresión génica aumentados del marcador *CDKN1A* por qRT-PCR (**Figura 9D y E**). Finalmente, evaluamos el daño en las células diana tras el tratamiento. Observamos un aumento de focos del marcador de daño γH2AX y del marcador p21 en la condición tratada con CM+ (**Figura 9F**). La cuantificación de este ensayo mostró un aumento significativo en células positivas para estos marcadores de daño y senescencia, respectivamente (**Figura 9G y H**).

En conclusión, hemos caracterizado la inducción de senescencia celular mediada por el CM de las células A549 senescentes tras el tratamiento con bleomicina. Además, hemos observado que el CM senescente induce daño en las células diana, lo que se demuestra con la positividad para los marcadores γH2AX y p21.

4.3 EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA BIOGÉNESIS DE EVs TRAS GW4869

Tras comprobar la inducción de senescencia paracrina mediada por el CM de células A549 senescentes, nos planteamos diseccionarlo en sus constituyentes para evaluar qué componente o componentes del mismo son los principales mediadores de este efecto. Nos decidimos a modular la biogénesis de EVs mediante el uso del inhibidor GW4869, un inhibidor no competitivo de la esfingomielinasa neutra (*neutral sphingomyelinase* o N-SMase), que cataliza el paso de esfingomielina a ceramida. La ceramida es necesaria para la fluidez de las membranas de los cuerpos multivesiculares (*multivesicular bodies* o MVB), lo que permite su invaginación y la formación de las vesículas intraluminales (*intraluminal vesicles* o ILVs) que serán exocitadas y formarán las EVs. La inhibición de esta enzima ha sido descrita como un potente inhibidor de la biogénesis de EVs (Catalano & O'Driscoll, 2020).

4.3.1 Efecto de GW4869 en células senescentes

En primer lugar, caracterizamos el efecto del inhibidor GW4869 sobre el fenotipo senescente. Para ello, las células A549 senescentes fueron tratadas con el inhibidor durante 24 horas a una concentración de 10 μ M tras la inducción de senescencia con bleomicina. Esta concentración fue puesta a punto en experimentos previos de nuestro laboratorio tras evaluar que no tenía efectos citotóxicos en las células.

Primero, evaluamos el efecto del inhibidor (GW4869+) sobre la morfología de las células senescentes, no apreciando cambios significativos tras el tratamiento (**Figura 10A**). Además, medimos la actividad SA- β -GAL mediante tinción cromogénica y no encontramos diferencias entre la condición no tratada (GW4869-), y la condición GW4869+. De manera complementaria, el análisis mediante citometría de flujo de la actividad beta-galactosidasa con el sustrato C₁₂FDG no mostró cambios significativos (**Figura 10A y B**). La evaluación del tamaño celular tras el tratamiento demostró que no hay cambios con respecto al control sin tratar (**Figura 10C**). En cuanto a la producción de factores solubles, el análisis mediante *array* de citoquinas mostró un aumento en la producción de estas en la condición B+ con respecto a B- y no se apreciaron cambios en GW4869+ comparado con B+, lo que apunta a que el inhibidor no está afectando a los factores solubles del SASP (**Figura 10D**). Tras el ensayo de formación de colonias, observamos que esta capacidad se sigue manteniendo comprometida en GW4869+ (**Figura 10E**). Por último, al analizar el número de EVs liberadas en el CM por las células tras el tratamiento con GW4869 mediante NTA, observamos una clara disminución en esta condición comparada con B+. Cabe destacar que, como ya ha sido publicado en numerosos artículos (Lehmann et al., 2008), las células senescentes tienen una biogénesis y secreción aumentada de EVs, lo que también se observa en nuestro modelo (**Figura 10F**).

Estos resultados demuestran que el tratamiento con el inhibidor GW4869 no modifica el fenotipo senescente, ya que tanto la actividad SA- β -GAL, como el tamaño celular, la producción de factores solubles y la capacidad de formación de colonias no variaron con respecto al control. Al mismo tiempo, el número de EVs en el CM se ve significativamente reducido, lo que nos permite generar CM con niveles reducidos de EVs para estudiar su contribución relativa a la senescencia paracrina.

4.3.2 Efectos en las células diana tras el uso de GW4869

Tras evaluar los efectos de GW4869 sobre las células senescentes y comparar la reducción de las EVs generamos CM con niveles reducidos de EVs para tratar células diana A549.

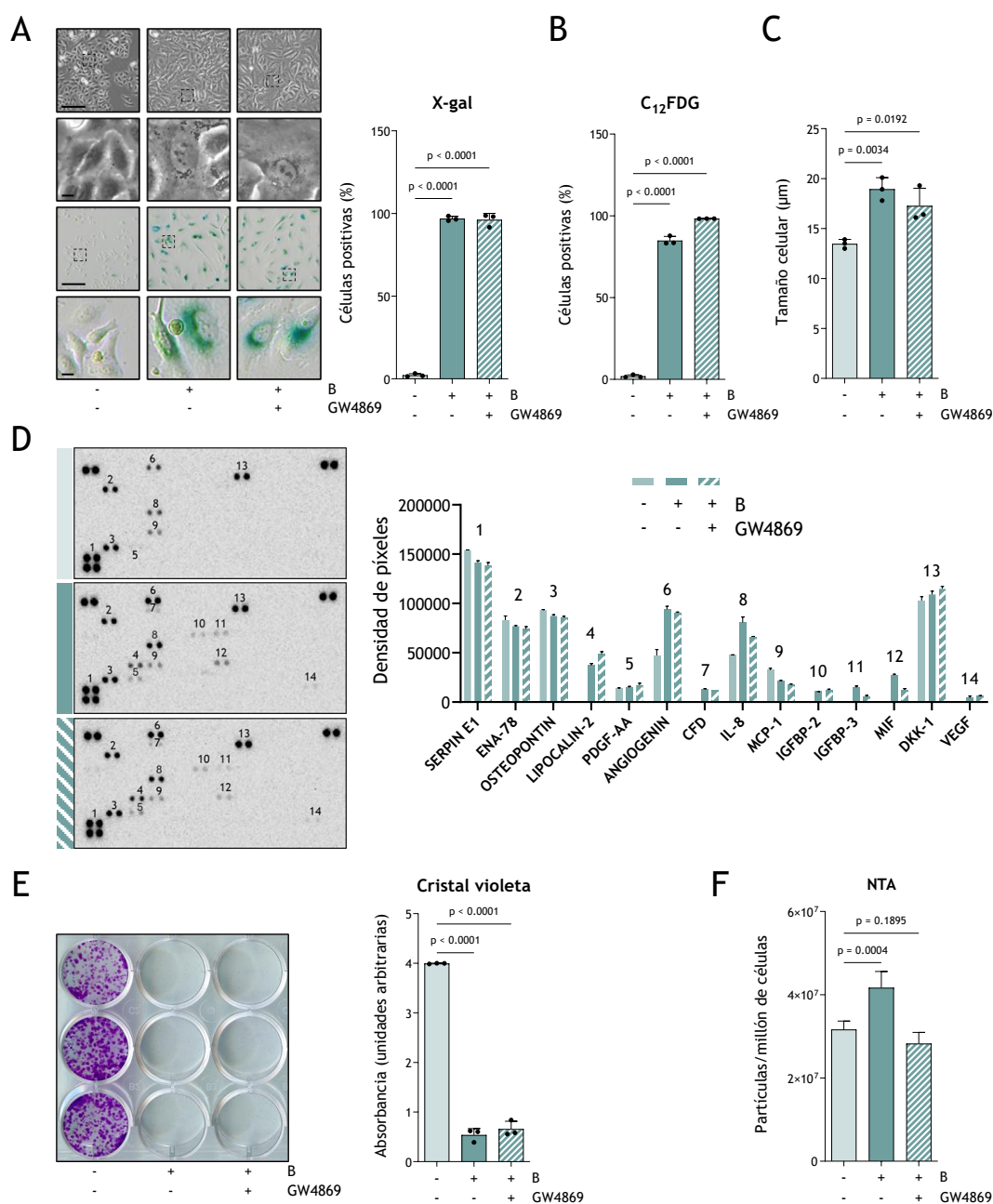


Figura 10. Efecto del tratamiento con GW4869 en células senescentes. (A) Imágenes representativas de los cambios morfológicos y tinción SA-B-GAL cromogénica. Cuantificación de la tinción. La escala de mayor tamaño representa 200 μm y la de menor tamaño 15 μm . (B) Análisis por citometría de flujo de células positivas con el sustrato C_{12}FDG . (C) Medición del tamaño celular. (D) Análisis de la producción de factores solubles mediante *array* de citoquinas tras el tratamiento con GW4869 y su cuantificación. (E) Ensayo de formación de colonias teñidas con cristal violeta. (F) Análisis mediante NTA del número de EVs secretadas. La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba ANOVA con el test post-hoc de Tukey. A, B, C, E y F (n=3). D (n=1).

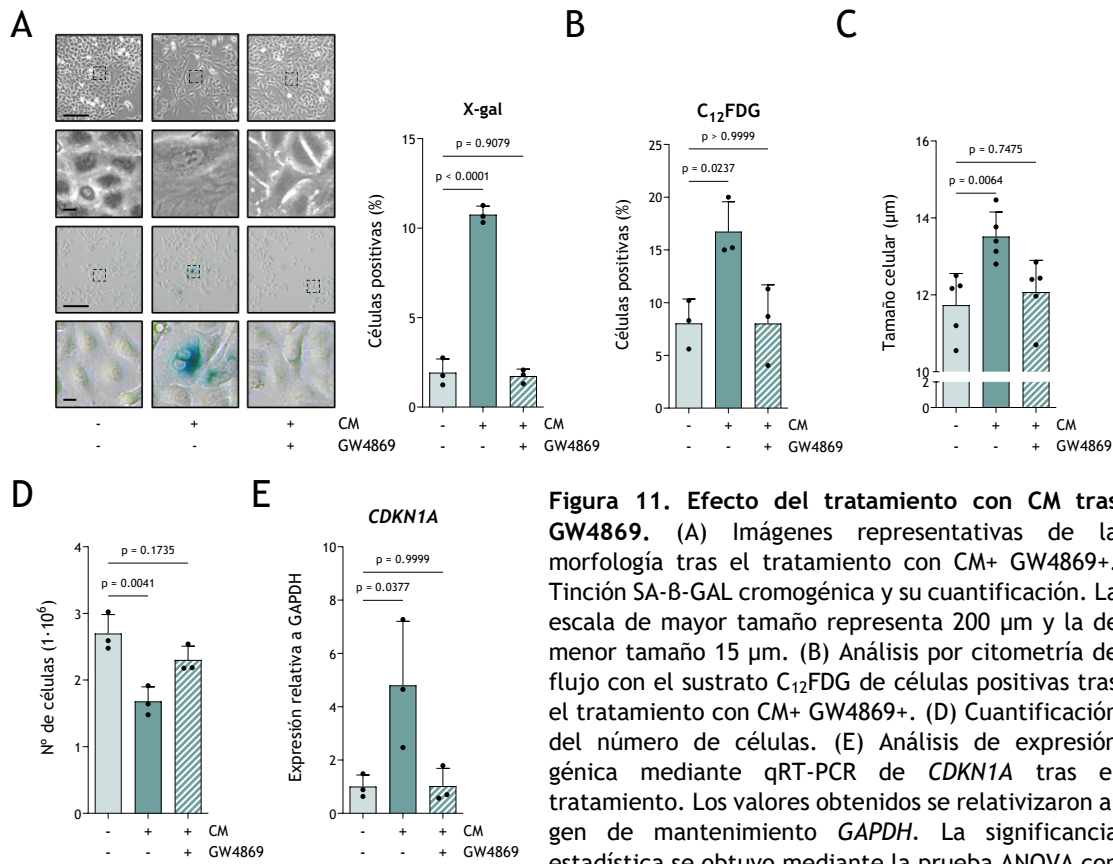


Figura 11. Efecto del tratamiento con CM tras GW4869. (A) Imágenes representativas de la morfología tras el tratamiento con CM+ GW4869+. Tinción SA-β-GAL cromogénica y su cuantificación. La escala de mayor tamaño representa 200 μm y la de menor tamaño 15 μm. (B) Análisis por citometría de flujo con el sustrato C₁₂FDG de células positivas tras el tratamiento con CM+ GW4869+. (D) Cuantificación del número de células. (E) Análisis de expresión génica mediante qRT-PCR de *CDKN1A* tras el tratamiento. Los valores obtenidos se relativizaron al gen de mantenimiento *GAPDH*. La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba ANOVA con el test post-hoc de Tukey (n=3), C (n=5).

Tras el protocolo de dos tratamientos de 3 días cada uno, tal y como ya se ha explicado, evaluamos el impacto de estos medios con niveles reducidos de EVs en la inducción de senescencia paracrina. Las células tratadas con el CM tras GW4869 (CM+ GW4869+) mostraron una morfología más parecida al control (CM-) que a las células tratadas con CM+. Además, la tinción SA-β-GAL cromogénica se vio significativamente reducida en la condición CM+ GW4869+ (**Figura 11A**). El análisis mediante citometría de flujo con el sustrato C₁₂FDG mostró una reducción de células positivas en la condición CM+ GW4869+ comparada con CM+ y la medición del tamaño celular también se vio reducida en estas condiciones (**Figura 11B y C**). La cuantificación del número de células tras este tratamiento demostró que la capacidad proliferativa tras GW4869 se vio restaurada de manera significativa comparada con el control CM+ (**Figura 11D**). Finalmente, el análisis de la expresión génica de *CDKN1A* mediante qRT-PCR reveló que este marcador de senescencia se redujo de manera estadísticamente significativa tras el tratamiento con CM+ GW4869+ (**Figura 11E**).

En conclusión, el tratamiento con CM+ GW4869+ redujo los niveles de marcadores asociados a senescencia en las células diana. Este alivio de la senescencia paracrina correlaciona bien con la reducción de las EVs en el CM tras el tratamiento con el inhibidor GW4869.

4.4 CARACTERIZACIÓN DE EVs MEDIANTE DISTINTAS METODOLOGÍAS

Al comprobar que la inhibición de la biogénesis de EVs tras el uso de GW4869 correlacionaba bien con el alivio en la senescencia paracrina y que este inhibidor afectaba solamente a la fracción vesicular del SASP sin modular la producción ni secreción de factores solubles, nos

propusimos caracterizar en profundidad el papel de las EVs derivadas de células senescentes como principales mediadores de la inducción de senescencia paracrina. Teniendo en cuenta la evidencia publicada (Welsh et al., 2024), el método de aislamiento elegido relevante para evaluar la funcionalidad de las EVs. Por esto, hemos comparado la ultracentrifugación diferencial (*differential ultracentrifugation* o dUC) y la cromatografía de exclusión por tamaño (*size exclusion chromatography* o SEC) en el aislamiento de EVs a partir de nuestros CM.

Tras generar los medios condicionados CM- y CM+ estos fueron procesados mediante ambas metodologías. Mediante dUC se generó el medio sobrenadante (SN) y EVs aisladas por ultracentrifugación (EVs-dUC). Mediante SEC se aislaron únicamente las EVs de los CM (EVs-SEC). En paralelo, los medios condicionados sin procesar (CM-, CM+, CM+ GW4869+) sirvieron como controles. El análisis mediante NTA permitió cuantificar el número de EVs aisladas por cada metodología y compararlos con los controles sin procesar. En el SN seguimos detectando EVs, y estas se encuentran en mayor número en el SN derivado de CM+ comparado con el SN derivado de CM-. Lo mismo ocurre con las EVs-dUC y con las EVs-SEC (**Figura 12A**). Mediante la misma técnica hemos podido analizar la moda de estas poblaciones de EVs. En cuanto a este parámetro, a pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas, la tendencia nos dice que las EVs en CM+ son más grandes que las EVs del CM-. Hay que señalar que, tras GW4869, este parámetro se parece más al control CM- que no a CM+. En cuanto al resto de condiciones, no hay cambios relevantes (**Figura 12B**).

Dado que, actualmente, hay un número cada vez mayor de artículos enfocados en el uso de la metodología de SEC para el aislamiento y ensayo funcional con las EVs, nos decidimos a caracterizar en profundidad estas EVs para estudiar su contribución relativa al proceso de senescencia paracrina.

Las EVs-SEC muestran una morfología típica al ser aisladas a partir de CM proliferativo y senescente y al ser caracterizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (**Figura 12C**). Con el fin de comprobar la funcionalidad de estas EVs-SEC, realizamos un ensayo de internalización con el colorante lipofílico DiO, que se intercala en las membranas plasmáticas de las vesículas. Como se puede apreciar, tanto las EVs de CM- como las de CM+ aisladas por SEC se internalizaron en las células diana. Esto se puede apreciar mejor en la imagen en 3D, donde se observa que las EVs-SEC teñidas con DiO se encuentran dentro de las células (**Figura 12D**). Por último, para evaluar la eficiencia en la eliminación de factores solubles, analizamos los aislados tras dUC y SEC mediante *array* de citoquinas. De manera global, la mayoría de los factores solubles han sido eliminados de nuestros aislados, siendo menos eficiente la dUC en comparación con el SEC. Esto coincide con lo ya publicado (Wallis et al., 2021), donde se apunta a que la dUC coaisla algunos factores solubles presentes en el CM que el SEC es capaz de eliminar, lo que aporta mayor pureza a las EVs-SEC (**Figura 12E**).

Estos resultados en conjunto demuestran que ambas metodologías son capaces de aislar EVs a partir de los CM- y CM+. Además, la eliminación de factores solubles en ambos casos es muy eficiente, aunque en el caso de SEC esta eficiencia es más alta comparada con dUC. En síntesis, ambas metodologías son eficientes a la hora de diseccionar el CM en los factores solubles y las EVs. Esto nos permite estudiar la contribución relativa de cada uno de los componentes del SASP en la inducción de senescencia paracrina, aunque, como se ha demostrado, en el SN tras dUC siguen quedando EVs que puedan enmascarar la contribución de los factores solubles a este proceso.

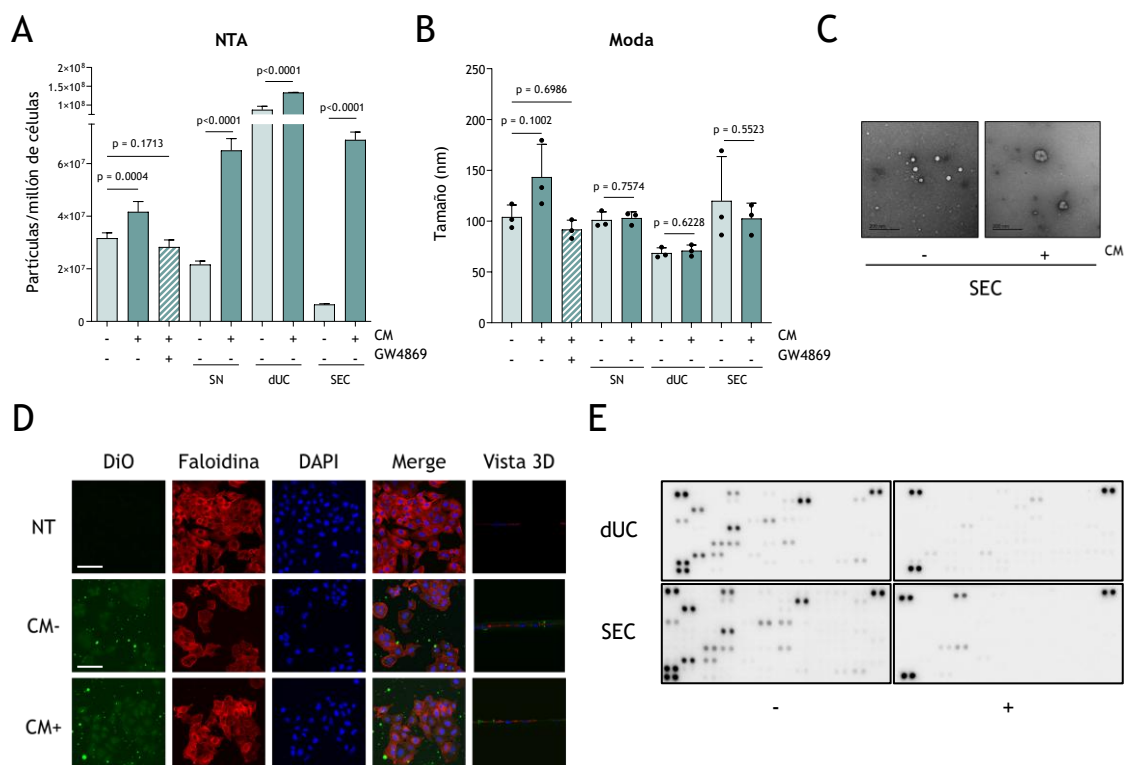


Figura 12. Caracterización de las EVs aisladas mediante distintas metodologías. (A) Análisis mediante NTA del número de EVs aisladas mediante dUC y SEC. (B) Análisis mediante NTA de la moda de las EVs aisladas mediante ambas metodologías. (C) Imágenes representativas de la morfología de las EVs-SEC realizadas mediante TEM. La escala representa 200 nm. (D) Imágenes representativas de la tinción inmunofluorescente con el colorante lipofílico DiO que marca EVs. Vista 3D de las EVs internalizadas en las células diana. (E) Análisis mediante *array* de citoquinas de la eliminación de factores solubles tras el procesamiento de los CM-/+ mediante dUC y SEC. La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba ANOVA con el test post-hoc de Tukey en los controles y con la prueba t de Student en el resto de las condiciones. A y B (n=3). C, D y E (n=1).

4.4.1 Efecto de las EVs aisladas en la inducción de senescencia paracrina

Como ya se ha demostrado, tanto dUC como SEC son capaces de aislar EVs a partir de los CM- y CM+. En este contexto, con EVs aisladas y la mayor parte de los factores solubles eliminados, nos encontramos en condiciones de estudiar la contribución relativa de cada componente del SASP en la inducción de senescencia paracrina. Para ello, tratamos las células diana con las EVs-dUC y las EVs-SEC aisladas a partir de CM+. También hemos tratado estas células con el SN (SN+). En paralelo las células también han sido tratadas con los CM sin procesar (CM-, CM+ y CM+ GW4869+).

Tras el protocolo de inducción de dos tratamientos durante 3 días, evaluamos la inducción de senescencia paracrina. Tras el tratamiento con SN+ e EVs-SEC+ se pudieron observar cambios morfológicos que pueden ser asociados a una entrada en senescencia (**Figura 13A**). También se observó un aumento en la tinción SA-β-GAL cromogénica en las mismas condiciones de manera estadísticamente significativa (**Figura 13A**). La cuantificación del número de células demostró que en las condiciones SN+ y SEC+ el número de células es significativamente inferior que en el control CM-. En este caso, el número de células en el control CM+ no es significativo, lo que puede estar debido a la dispersión de los datos (**Figura 13B**).

En síntesis, las EVs aisladas mediante SEC son capaces de inducir senescencia paracrina. Esta inducción de senescencia paracrina es en ausencia de los factores solubles que han sido eliminados mediante la metodología. Esto apunta a un papel fundamental de las EVs aisladas mediante SEC en este proceso. Como también se ha podido comprobar, las EVs aisladas por dUC no indujeron senescencia paracrina, no así el SN tras dUC, donde hemos podido observar una clara inducción de senescencia paracrina.

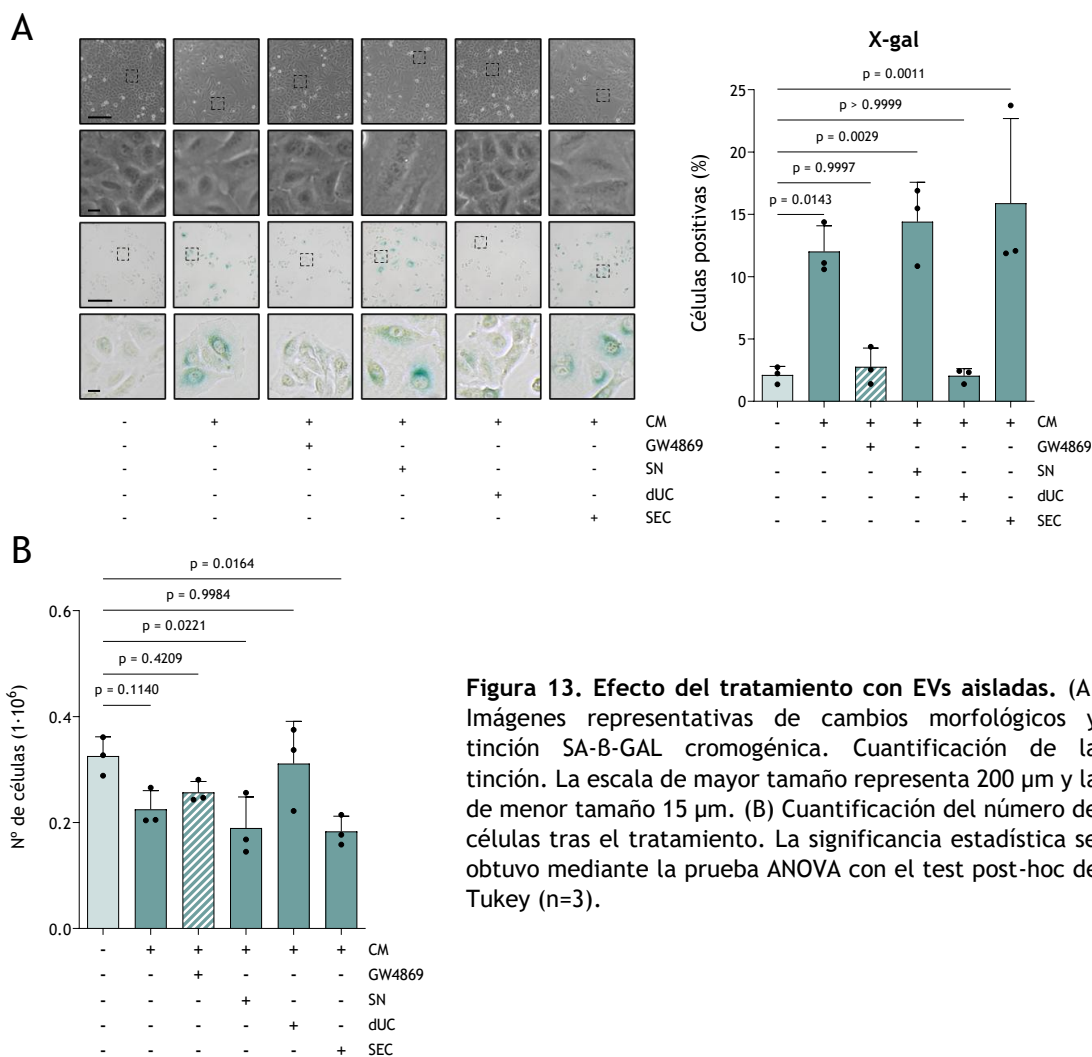


Figura 13. Efecto del tratamiento con EVs aisladas. (A) Imágenes representativas de cambios morfológicos y tinción SA-B-GAL cromogénica. Cuantificación de la tinción. La escala de mayor tamaño representa 200 μm y la de menor tamaño 15 μm . (B) Cuantificación del número de células tras el tratamiento. La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba ANOVA con el test post-hoc de Tukey ($n=3$).

4.4.2 Caracterización de EVs mediante la tecnología AF4

Al caracterizar la contribución de las EVs a la inducción de senescencia paracrina, nos planteamos fraccionar las poblaciones de estas vesículas mediante la tecnología de *Asymmetric flow field-flow fractionation* (AF4) para estudiar si este efecto está mediado por las vesículas de mayor tamaño o de menor tamaño. Para ello, ultrafiltramos 100 mL de CM- y CM+ y caracterizamos ambas condiciones. De manera muy preliminar, el análisis del tamaño de las EVs en CM+ demostró que estas vesículas son más pequeñas (40-100 nm) comparadas con las EVs en CM- (>150 nm) (**Figura 14A**). En cuanto a la complejidad, el análisis de la dimensión fractal mostró que la complejidad de las EVs en CM+ era mayor en comparación a CM-, lo que podría indicar que las EVs en CM+ presentan más componentes asociados a la membrana o que estas membranas presentan más pliegues comparadas con las EVs en CM- (**Figura 14B**). Pese

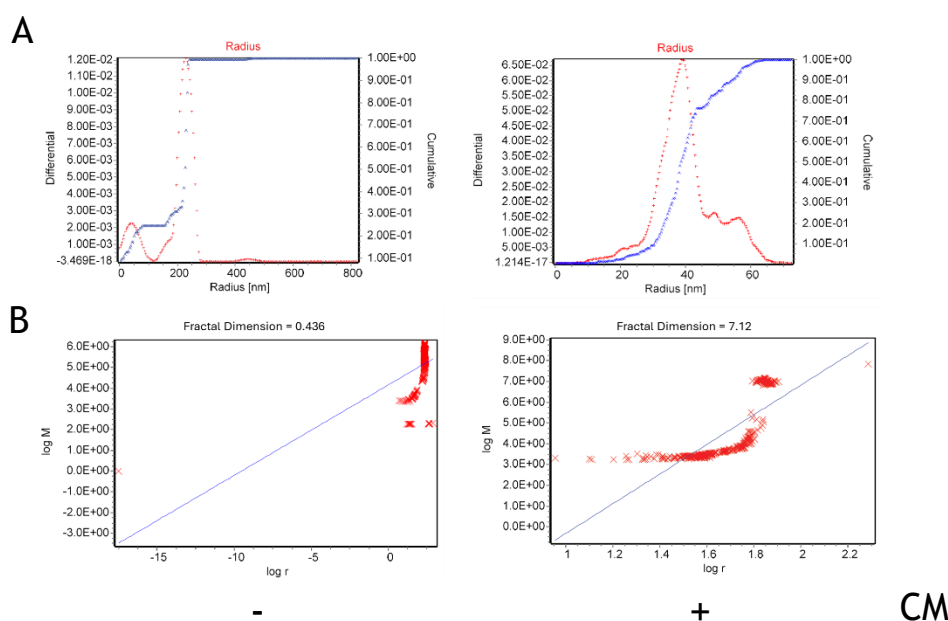


Figura 14. Caracterización de EVs mediante AF4. (A) Representación del tamaño de las EVs presentes en CM- y CM+ (B) Representación de la dimensión fractal de las EVs presentes en CM- y CM+. (n=1)

a estos resultados, nuestra intención inicial de recuperar las distintas fracciones de EVs para utilizarlas en ensayos funcionales no fue técnicamente posible.

4.5 MODULACIÓN GENÉTICA DE LA BIOGÉNESIS DE EVS

Tras evaluar los efectos de las EVs aisladas mediante SEC y su contribución a la senescencia paracrina, decidimos modular su biogénesis de manera genética para seguir caracterizando este papel clave. En este sentido, elegimos modular la biogénesis de EVs mediante la reducción de los niveles de *mTOR* y la liberación mediante la reducción de los niveles de *RAB27A*. La inhibición de la ruta molecular de mTOR induce autofagia y esta se ha relacionado con la inhibición de la liberación de EVs mediante el reciclaje de MVB (Fader et al., 2007; Ravikumar et al., 2004). Por otra parte, la liberación de EVs está mediada fundamentalmente por un miembro de la familia de las GTPasas pequeñas, *RAB27A* (Ostrowski et al., 2010). La reducción de los niveles de esta proteína ha sido relacionada con la reducción en la exocitosis de EVs al impedir que el MVB se fusione con la membrana plasmática.

4.5.1 Caracterización de las líneas celulares con niveles reducidos de *RAB27A*

En primer lugar, caracterizamos la reducción de los niveles de *RAB27A* mediante el uso de ARN de horquilla corta (*short hairping RNA* o shARN). En el caso de *RAB27A* se emplearon dos construcciones para reducir los niveles de este gen, sh*RAB27A* #313 y sh*RAB27A* #735. Como control se ha empleado un plásmido con una construcción aleatoria (*scramble* o Scr) y con el mismo vector plasmídico que el de las construcciones citadas anteriormente.

Primero evaluamos el impacto de la reducción de los niveles de *RAB27A* sobre el fenotipo senescente. Como se puede observar con construcciones, la morfología tras la inducción de senescencia sigue siendo la típica de este estado celular. De la misma manera, no hay cambios en la tinción SA- β -GAL cromogénica en las condiciones de inducción de senescencia al reducir los niveles de *RAB27A* con ambas construcciones, así como el tamaño celular tras la inducción

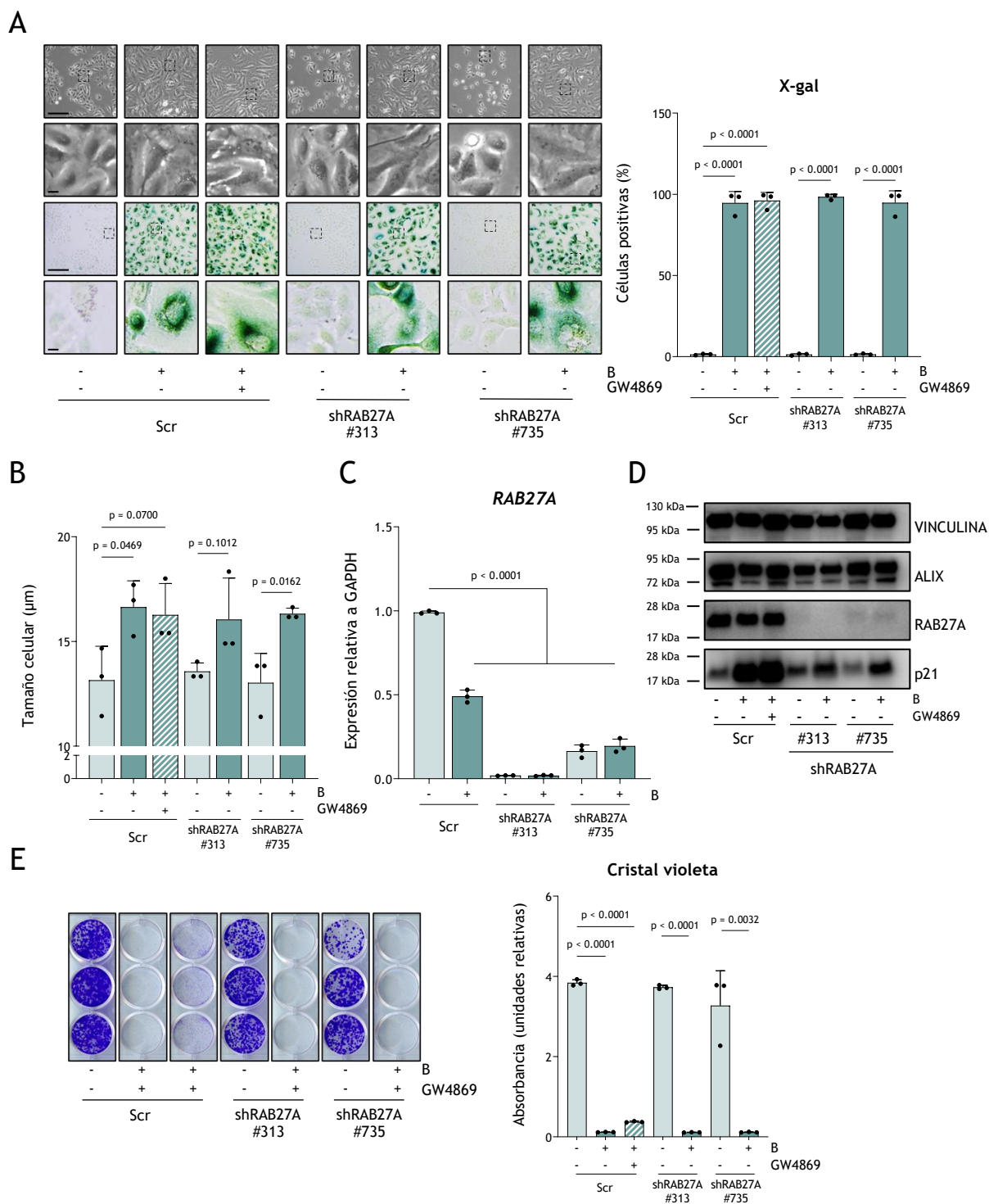


Figura 15. Caracterización de la reducción de RAB27A. (A) Imágenes representativas de los cambios morfológicos y tinción SA-B-GAL cromogénica. Cuantificación de la tinción. La escala de mayor tamaño representa 200 µm y la de menor tamaño 15 µm. (B) Medición del tamaño celular. (C) Análisis de los niveles de ARNm de RAB27A mediante qRT-PCR. Los valores obtenidos se relativizaron al gen de mantenimiento GAPDH. (D) Análisis de la expresión proteica por Western blot. Se utilizó Vinculina como control de carga. (E) Ensayo de formación de colonias teñidas con cristal violeta y su cuantificación. La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba ANOVA con el test post-hoc de Tukey para los controles y el test t de Student para el resto de las condiciones. A, B, C y E (n=3). D (n=1).

de senescencia que se encuentra aumentado en todas las condiciones, siendo estadísticamente significativo excepto en la condición de GW4869 y shRAB27A #313, aunque la tendencia es clara (**Figura 15A y B**). El análisis mediante qRT-PCR mostró que ambas construcciones reducen los niveles de ARNm de manera estadísticamente significativa, siendo la construcción shRAB27A #313 más eficiente que la construcción shRAB27A #735 (**Figura 15C**). De modo complementario, analizamos esta reducción mediante Western blot. Ambas construcciones reducen los niveles de proteína, aunque la construcción shRAB27A #735 parece de nuevo menos eficaz a nivel de proteína comparada con la construcción shRAB27A #313. Los niveles de ALIX, un marcador de EVs, solo parecen estar alterados en la banda inferior en la condición de shRAB27A #313. Además, los niveles de p21 parece estar reducidos en ambas condiciones tras la reducción de RAB27A (**Figura 15D**). Finalmente, el ensayo de formación de colonias demostró que la reducción de *RAB27A* no influye en esta capacidad (**Figura 15E**).

Estos datos demuestran que ambas construcciones reducen significativamente los niveles de *RAB27A*, aunque la construcción shRAB27A #313 es más efectiva en este sentido. En paralelo, nuestros datos demuestran que esta reducción no afecta al fenotipo senescente.

4.5.2 Reducción de los niveles de EVs tras shRAB27A

Después de comprobar que las construcciones empleadas reducen de manera eficiente los niveles de *RAB27A* y que la bajada en la expresión de *RAB27A* no afecta al fenotipo senescente, nos centramos en caracterizar la reducción de EVs secretadas por estas células. Para ello, recogimos los medios condicionados generados por las líneas shRAB27A #313 y shRAB27A #735 para analizar el número de EVs. Para el primer análisis, al comprobar que la construcción shRAB27A #313 resultaba más eficiente, decidimos recoger los CM derivados de esta línea y analizar la cantidad de proteína total de las EVs. El análisis mediante la cuantificación de esta proteína mediante el *kit MicroBCA* demostró que la construcción shRAB27A #313 presentaba niveles reducidos de proteína de EVs tanto en la condición proliferativa (shRAB27A #313 B-) como en la condición senescente (shRAB27A #313 B+) comparadas con el control Scr B+ (**Figura 16A**). Además, el análisis de estos CM mediante NTA demostró que ambas construcciones reducen de manera muy significativa el número de EVs en los CM comparados con los controles. Cabe señalar que, pese a que la construcción shRAB27A #735 parece ser menos eficiente reduciendo los niveles de *RAB27A*, la cantidad de EVs secretadas por ambas líneas celulares parece ser muy similar (**Figura 16B**).

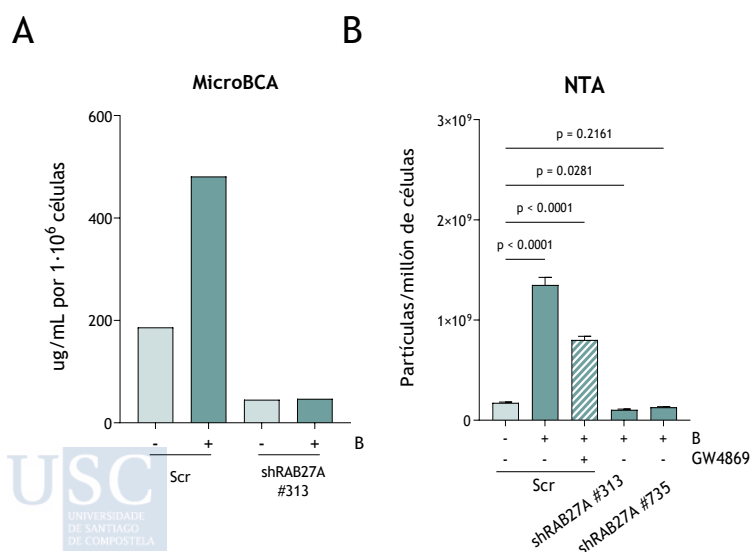


Figura 16. Reducción de los niveles de EVs tras shRAB27A. (A) Análisis de proteína total de EVs con tras la reducción de los niveles de *RAB27A* con la construcción shRAB27A #313. (B) Cuantificación del número de EVs mediante NTA tras la reducción de *RAB27A* con ambas construcciones. La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba ANOVA con el test post-hoc de Tukey. A (n=1). B (n=3).

Estos resultados ponen de manifiesto que la reducción de *RAB27A* con ambas construcciones, en células A549 sh*RAB27A* proliferativas y senescentes, correlaciona bien con niveles reducidos de EVs secretadas, lo que concuerda con lo ya publicado (Ostrowski et al., 2010). Esto nos permite generar CM con niveles reducidos en EVs sin tratamiento farmacológico para estudiar su contribución relativa en senescencia paracrina.

4.5.3 Caracterización de las líneas celulares con niveles reducidos de *mTOR*

Además de la modulación de la liberación de EVs mediante la reducción de los niveles de *RAB27A*, nos planteamos modular la expresión de *mTOR* para reducir el número de EVs en nuestros CM. Por esto, nos decidimos a reducir los niveles de *mTOR* en células A549 para producir CM con niveles reducidos de EVs.

Después de la transducción lentiviral con la construcción sh*mTOR*, nos dimos cuenta de que las células presentaban una morfología ligeramente agrandada y vacuolar, con un citoplasma aplanado. Al comprobar la actividad SA- β -GAL mediante tinción cromogénica observamos un aumento estadísticamente significativo de esta tinción en comparación con el control B- (**Figura 17A**). El análisis de estas células mediante citometría de flujo con el sustrato C₁₂FDG demostró un aumento estadísticamente significativo de las células positivas para esta tinción tras la reducción de *mTOR*, al tiempo que el análisis por qRT-PCR de los niveles de *mTOR* mostró una reducción drástica y significativa en los niveles de ARNm con la construcción sh*mTOR* (**Figura 17B y C**). Así mismo, el análisis de la expresión proteica demostró que los niveles de *mTOR* se ven reducidos en comparación con los controles. También es necesario destacar que los niveles de p21 se ven ligeramente aumentados con respecto al control B- (**Figura 17D**). El tratamiento de estas células con el senolítico ABT-263, inhibidor de la familia de proteínas BCL-2, puso de manifiesto que las células con niveles reducidos de *mTOR* son sensibles al tratamiento (**Figura 17G**). Tras esta reducción en los niveles de *mTOR*, las células presentaban una capacidad proliferativa significativamente reducida, siendo imposible observar las primeras colonias hasta 20 días post-transducción y, de manera complementaria, al analizar la incorporación de EdU en estas células, encontramos que la incorporación está reducida de manera estadísticamente significativa tras la reducción de *mTOR*, lo que apunta a una detención en la síntesis de ADN (**Figura 17F y E**). En conjunto, estos datos demuestran que la construcción sh*mTOR* es muy eficiente reduciendo los niveles de *mTOR*.

4.5.4 Efecto de la modulación genética de EVs en células diana

Tras caracterizar la modulación de la biogénesis y la secreción de EVs mediante la modulación de *RAB27A* y *mTOR*, evaluamos los efectos de estas reducciones en el contexto de la senescencia paracrina. Las células diana fueron tratadas con los medios control (Scr-, Scr+ y Scr+GW4869+), con los medios condicionados generados tras la reducción de los niveles de *RAB27A* con ambas construcciones y con los medios condicionados tras la reducción de los niveles de *mTOR*. Tras el protocolo de dos tratamientos de 3 días, analizamos los marcadores de senescencia en las células diana.

Observamos cambios morfológicos en el control Scr CM+, un fenotipo ligeramente agrandado con la construcción sh*RAB27A* #735 CM+, así como en la condición sh*mTOR* CM+, además de un incremento de la tinción SA- β -GAL cromogénica en las mismas condiciones. Aunque en el caso de sh*RAB27A* #735 CM+ este aumento no es estadísticamente significativo, existe una tendencia clara (**Figura 18A y B**). El análisis mediante citometría de flujo con el sustrato C₁₂FDG pone de relevancia que en la condición sh*RAB27A* #313 CM+ hay un ligero aumento

en estas células positivas para la tinción, aunque este incremento no es estadísticamente significativo. No se encontraron tampoco diferencias estadísticamente significativas en el resto de las condiciones (**Figura 18C**). La medición del tamaño celular de estas células tratadas con los CM no reveló diferencias estadísticamente significativas, lo que puede ser debido, en parte, a la alta dispersión de los datos (**Figura 18D**). La cuantificación del número de células después de los tratamientos demostró que las células tratadas con shRAB27A #735 CM+ presentaban un descenso en el número de células de manera estadísticamente significativa. En el resto de las condiciones, los cambios no son significativos con excepción del control Scr CM+. Además, el análisis de expresión de *CDKN1A* en estas células diana tratadas con los CM demostró un aumento en la condición shRAB27A #735 CM+ que no alcanzó significancia estadística, lo que puede ser debido nuevamente a la dispersión (**Figura 18E y F**). Cabe destacar que el marcador *CDKN1A* en la condición shmTOR no se comportó como se esperaba.

En conjunto, estos datos demuestran un alivio de la senescencia paracrina tras la reducción de los niveles de *RAB27A*, lo que correlaciona con la reducción de EVs que previamente hemos caracterizado en las células productoras. De manera general, no parece que la inhibición de *mTOR* tenga un papel relevante en el alivio de la senescencia paracrina.

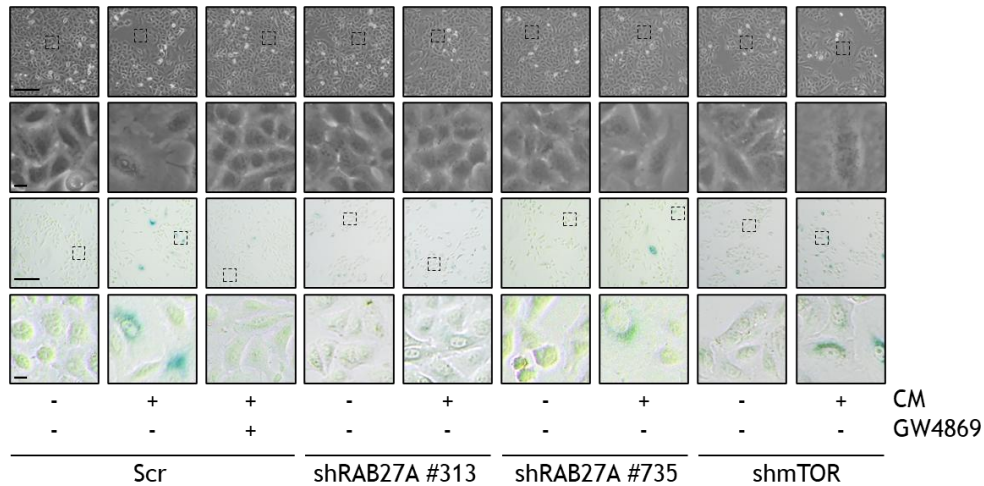
4.6 MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA BIOGÉNESIS DE EVS

De manera complementaria a la modulación genética descrita en el apartado anterior, nos planteamos modular de manera farmacológica esta biogénesis. En este sentido, seleccionamos tres fármacos previamente descritos como modulares de este proceso. El primero de ellos fue la bafilomicina A1 (BAFA1), un antibiótico macrólido inhibidor de la subunidad C de la V-ATPasa (ATP6V0/V0) que impide el flujo de H^+ hacia el interior de los lisosomas y aumenta su pH. La inhibición de este proceso mediada por BAFA1 tiene un impacto directo en la biogénesis de EVs, ya que inhibe el flujo autofágico y reduce las uniones entre los MVB y los autofagosomas (Fader et al., 2007; Mauvezin & Neufeld, 2015). El segundo fue la rapamicina (RAPA), una lactona macrocíclica que se une a mTORC1 e inhibe su acción. Al inactivar esta ruta, el proceso de autofagia se ve aumentado, lo que estimula el reciclaje de MVB, reduciendo el número de EVs (Fader et al., 2007). Por último, hemos utilizado un activador de la proteína RAB7. El fármaco ML-098 ha sido descrito como un activador de esta proteína, lo que aumenta su actividad. RAB7 está implicada en el tráfico vesicular del MVB y su fusión con los lisosomas para ser reciclados. Por tanto, la activación de esta proteína facilita el reciclaje de los MVB y reduce las EVs en el CM (Rocha et al., 2009).

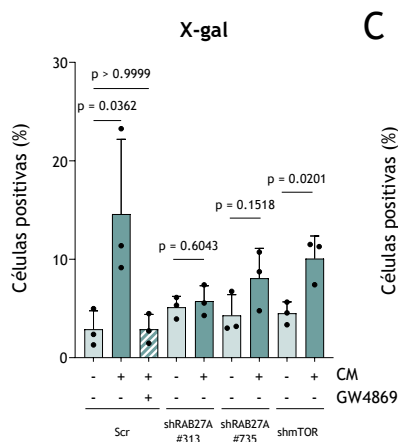
4.6.1 Caracterización del efecto de los fármacos en las células productoras

En primer lugar, analizamos el impacto de estos fármacos sobre el fenotipo senescente. Para ello, observamos los cambios morfológicos que se producen tras la inducción de senescencia y el tratamiento con cada uno de los fármacos. En la condición B+ BAFA1+ las células presentaron un fenotipo multivacuolado y con un citoplasma espiculado. En el resto de las condiciones no se apreciaron cambios morfológicos destacables. El análisis de la actividad SA- β -GAL cromogénica reveló que las células tras BAFA1 mostraron una reducción estadísticamente significativa de células positivas comparada con el control B+ (**Figura 19A**). Tras medir el tamaño celular, no encontramos diferencias significativas entre las condiciones tratadas con estos fármacos ni tampoco observamos diferencias en la capacidad de formación de colonias (**Figura 19B y C**). Con el fin de caracterizar la inhibición de la autofagia mediada por BAFA1, analizamos la expresión del marcador de autofagia LC3B mediante Western blot.

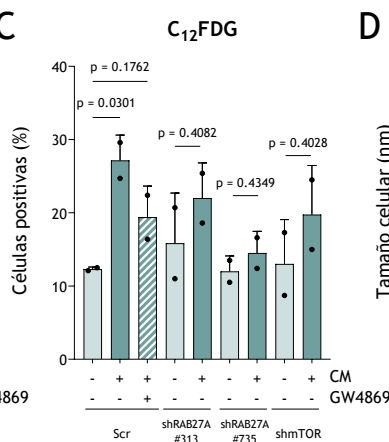
A



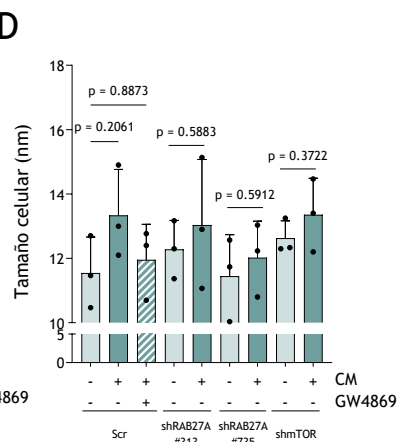
B



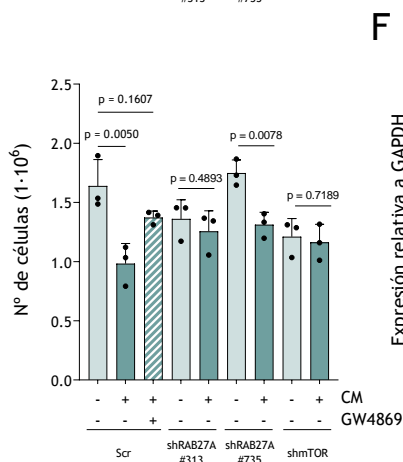
C



D



E



F

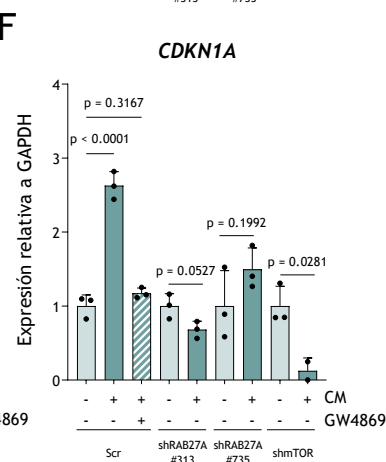


Figura 18. Efecto de la modulación genética de la biogénesis de EVs. (A) Imágenes representativas de los cambios morfológicos y de la tinción SA-B-GAL cromogénica. La escala de mayor tamaño representa 200 µm y la de menor tamaño 15 µm. (B) Cuantificación de la tinción SA-B-GAL cromogénica. (C) Análisis mediante citometría de flujo con el sustrato C₁₂FDG. (D) Medición del tamaño celular. (E) Cuantificación del número de células. (F) Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de ARNm de *CDKN1A*. Los valores obtenidos fueron relativizados al gen de mantenimiento *GAPDH*. La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba ANOVA con el test post-hoc de Tukey. A, B, D, E y F (n=3). C (n=2).

Como se observa, el tratamiento con BAFA1, produce la acumulación de este marcador, lo que indica un flujo autofágico comprometido. Al mismo tiempo, no se observaron cambios en los niveles de p21 tras el tratamiento con estos fármacos (**Figura 19E**). Por último, analizamos el pH lisosomal tras el tratamiento con estos fármacos mediante un ensayo de tinción con naranja de acridina, un colorante que se vuelve verde en ambiente básico y rojo en ambiente ácido. Comprobamos que, tras BAFA1, el pH de los lisosomas no es tan ácido comparado con los controles, lo que indica que la BAFA1 está inhibiendo la acidificación mediante la inhibición de la V-ATPasa (**Figura 19F**).

Además, mediante el análisis de las EVs secretadas después de esta modulación farmacológica, hemos observado que las células tras el tratamiento con BAFA1 presentan niveles incrementados de EVs secretadas. Este mismo análisis también revela que en las condiciones tratadas con RAPA y ML-098 no se produce la bajada esperada de EVs (**Figura 20**).

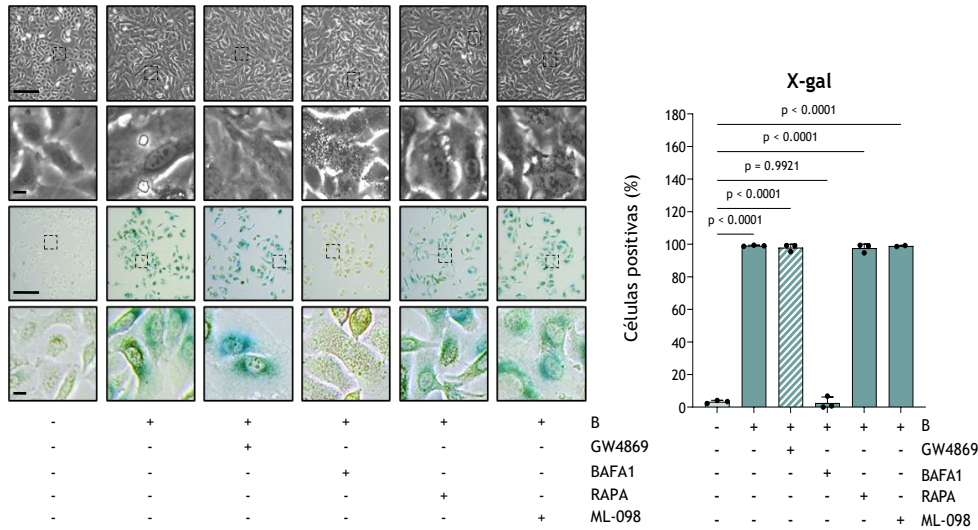
De estos datos se puede deducir que el tratamiento farmacológico no afecta al fenotipo senescente, excepto en el caso de la BAFA1, el cual modula la actividad SA- β -GAL debido a que la beta-galactosidasa es una hidrolasa ácida presente en los lisosomas que requiere de un pH muy bajo para ejercer su función. La basificación del pH lisosomal mediada por este fármaco inhibe su actividad. Además, con el resto de los datos, se puede concluir que en nuestro modelo senescente la BAFA1 está inhibiendo de manera eficiente la acidificación lisosomal. El análisis de las EVs secretadas es coherente con lo ya descrito para BAFA1 pero no con RAPA y ML-098, aunque es posible que, si bien no reduzcan el número puedan modular algunos otros aspectos de la biología de las EVs, como cambios en la composición de proteínas de membrana y del cargo que afecten a la funcionalidad de las mismas.

4.6.2 Efecto de los medios condicionados derivados del tratamiento farmacológico

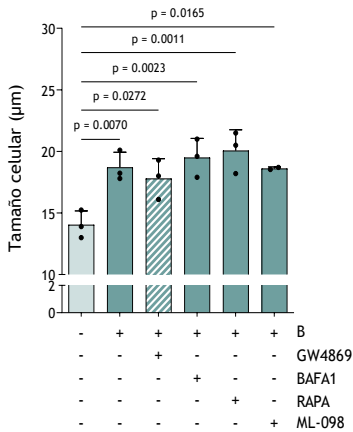
Tras caracterizar la modulación farmacológica de estos fármacos sobre el fenotipo senescente y sobre la biogénesis de EVs, generamos CM para cada uno de estos fármacos y tratamos células diana para analizar la contribución de estos tratamientos a la senescencia paracrina. Tras el tratamiento, hemos evaluado los marcadores de senescencia paracrina en estas células diana.

En todas las condiciones tratadas con estos fármacos no se han podido encontrar células con un fenotipo de inducción de senescencia paracrina. Tras evaluar la actividad SA- β -GAL cromogénica, las células positivas para esta tinción en las condiciones tratadas se parecen más al control CM- que al control CM+ de manera estadísticamente significativa (**Figura 21A**). El análisis mediante citometría de flujo con el sustrato C₁₂FDG reveló un incremento en esta tinción en la condición CM+ RAPA+, aunque la dispersión de los datos es bastante elevada (**Figura 21B**). En cuanto al tamaño celular, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las condiciones tratadas ni en el control CM+. Esto puede deberse a la alta dispersión de los datos (**Figura 21C**). Finalmente, en cuanto a la cuantificación del número de células, la tendencia nos dice que las condiciones de BAFA1 y RAPA son más similares al control CM+ que al control CM-, a pesar de que no se encuentren diferencias estadísticamente significativas debido a la dispersión (**Figura 21D**). De manera global, podemos concluir que los resultados más prometedores en este sentido se encuentran con el ML-098, ya que parece que reduce todos los marcadores de senescencia. Al mismo tiempo, tras el tratamiento con BAFA1, observamos que el porcentaje de células positivas tanto para la tinción SA- β -GAL cromogénica como por el sustrato C₁₂FDG se ven drásticamente reducidos, al mismo tiempo que el número de células se reduce.

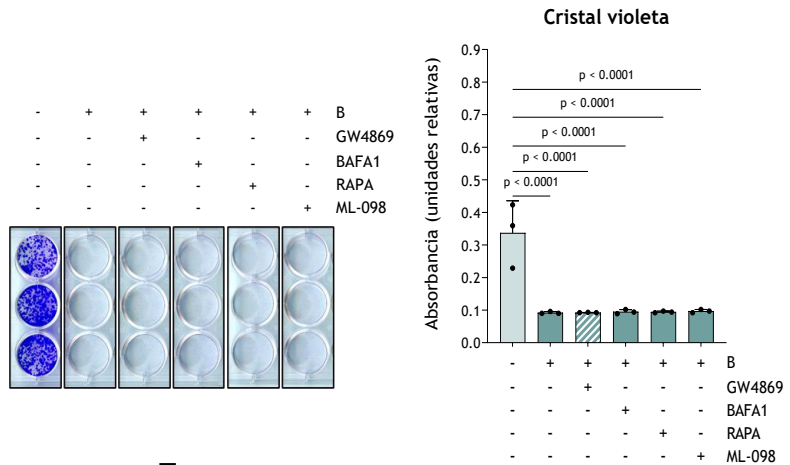
A



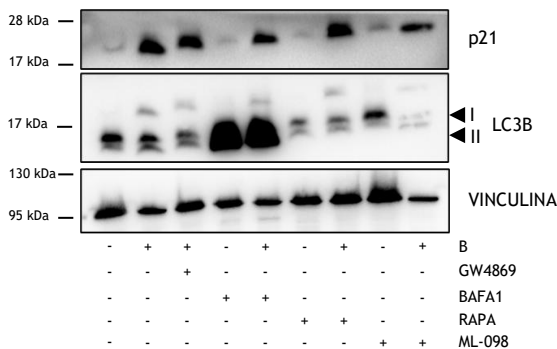
B



C



E



F

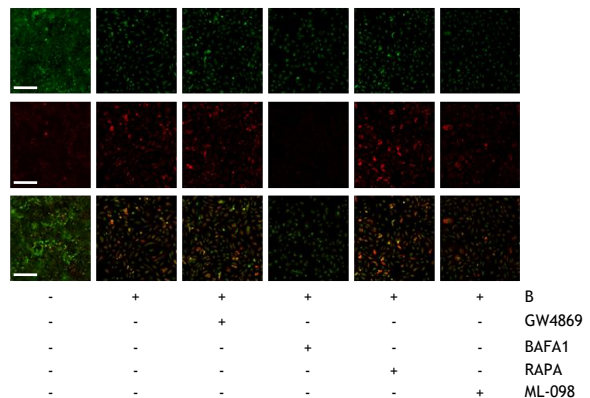


Figura 19. Caracterización de la modulación farmacológica. (A) Imágenes representativas de los cambios morfológicos, tinción SA-B-GAL cromogénica y cuantificación de la tinción. La escala de mayor tamaño representa 200µm y la de menor tamaño 15 µm. (B) Medición del tamaño celular. (C) Ensayo de formación de colonias teñidas con cristal violeta y su cuantificación. (E) Análisis de la expresión proteica de p21 y LC3B mediante Western blot. Se utilizó Vinculina como control de carga. La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba ANOVA con el test post-hoc de Tukey. A, B y C (n=3) excepto ML-098 (n=2). E y F (n=1)

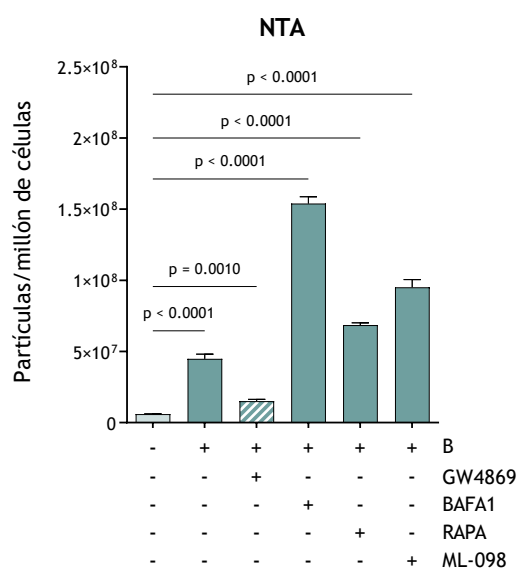


Figura 20. Análisis del número de EVs tras el tratamiento farmacológico. Análisis mediante NTA del número de EVs en el CM tras el tratamiento farmacológico. La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba ANOVA con el test post-hoc de Tukey (n=3).

Esto nos llevó a plantearnos que en el caso de BAFA1 tengamos algún problema a la hora de detectar células positivas. En el caso de la rapamicina, no parece que tenga un efecto directo en el alivio de la senescencia paracrina, lo que concuerda con los resultados obtenidos con shmTOR.

4.6.3 Arrastre de BAFA1 en los medios condicionados

A la luz de los resultados del tratamiento de los medios condicionados tras la modulación farmacológica de la biogénesis de EVs, nuestra hipótesis de partida asumía que la condición de la modulación mediante el tratamiento con BAFA1 debería enriquecer nuestros medios condicionados en EVs derivadas de células senescentes y, por tanto, aumentar la senescencia paracrina en esta condición. Dado que uno de nuestros principales marcadores de senescencia se basa en la actividad de la enzima beta-galactosidasa, decidimos estudiar si el tratamiento con BAFA1 produjo un CM donde el fármaco pudiese estar siendo arrastrado en los medios e inhibir la actividad de esta enzima en las células diana, infraestimando nuestras medidas. Por ello diseñamos un experimento donde las células diana son células A549 senescentes e incubadas con medios condicionados derivados de células A549 proliferativas tratadas con BAFA1 y RAPA. La observación de estas células senescentes diana demostró que en la condición de tratamiento con BAFA1 las células diana presentaban un citoplasma con múltiples granulaciones y fuertemente vacuolado. Al mismo tiempo, la actividad beta-galactosidasa medida mediante la tinción SA- β -GAL demostró la reducción en esta actividad en las células diana de manera estadísticamente significativa (**Figura 22A**). Teniendo en cuenta esto, analizamos por Western blot las células diana proliferativas tratadas con los medios condicionados tal y como se describió en el apartado anterior y observamos un aumento del marcador LC3B en la condición tratada con medio condicionado tras BAFA1. Al mismo tiempo, el marcador p62, que también se relaciona con el flujo autofágico se ve incrementado tras este tratamiento. En el resto de las condiciones, apenas se pueden observar cambios en estos marcadores (**Figura 22B**).

En definitiva, el tratamiento con estos CM de células A549 proliferativas tratadas con BAFA1 y RAPA demostró que el fármaco se está arrastrando en el CM y modulando la actividad SA-β-GAL en las células diana, lo que impide su detección por ambos métodos. A la luz de estos resultados es posible que el aumento de biogénesis y liberación de EVs si tenga un papel relevante potenciando este efecto, pero con este modelo no nos es posible caracterizarlo.

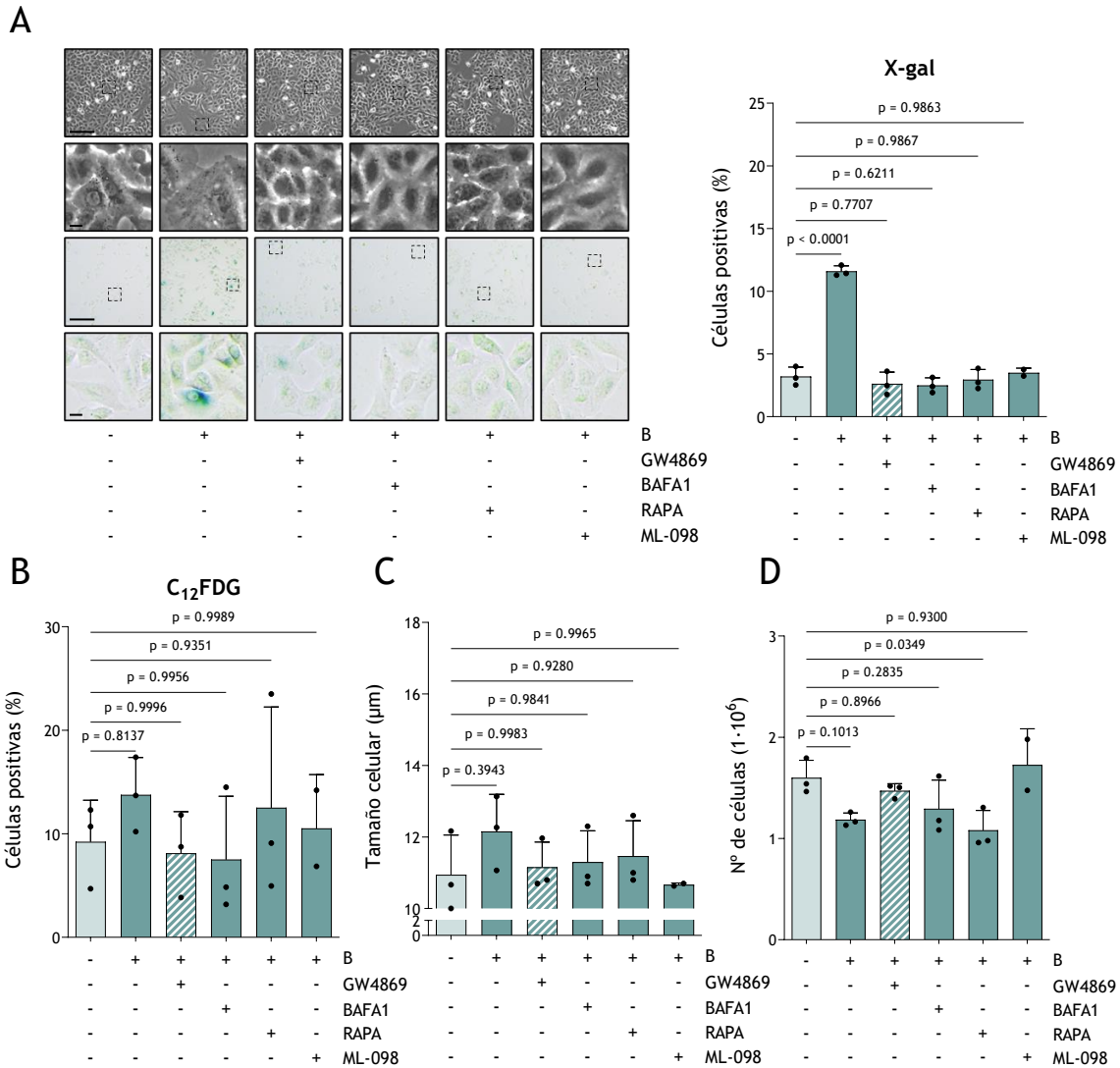


Figura 21. Efecto del tratamiento con CM tras la modulación farmacológica. (A) Imágenes representativas de los cambios morfológicos, tinción SA-β-GAL cromogénica y cuantificación de la tinción. La escala de mayor tamaño representa 200 µm y la de menor tamaño 15 µm. (B) Análisis mediante citometría de flujo con el sustrato C₁₂FDG. (C) Medición del tamaño celular. (D) Cuantificación del número de células. La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba ANOVA con el test post-hoc de Tukey (n=3) excepto ML-098 (n=2).

4.7 INHIBICIÓN DE LA ENDOCITOSIS

Tras caracterizar el papel clave de las EVs en el contexto de la senescencia paracrina, nos planteamos estudiar si la inducción de este efecto es dependiente de su internalización en las células diana. Para ello, decidimos modular el proceso de endocitosis en estas células para comprobar si este efecto podía ser aliviado. Debido a que no existe una única ruta de endocitosis, decidimos utilizar tres fármacos descritos como inhibidores de rutas concretas de

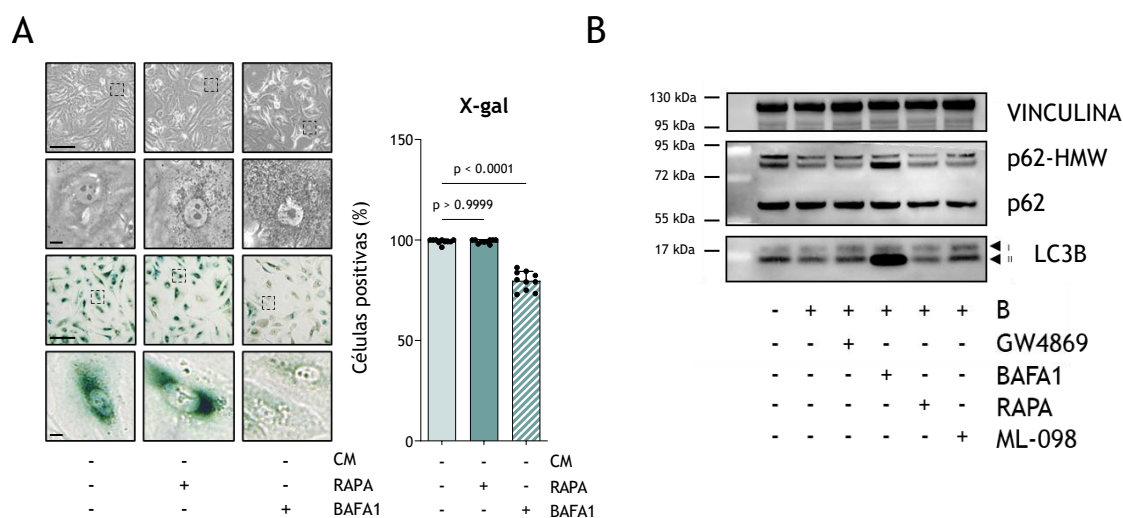


Figura 22. Arrastre de BAFA1 en los CM. (A) Imágenes representativas de morfología y tinción SA-β-GAL cromogénica y su cuantificación. La escala de mayor tamaño representa 200 μm y la de menor tamaño 15 μm. (B) Análisis de la expresión proteica de p62 y LC3B. Se utilizó Vinculina como control de carga. La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba ANOVA con el test post-hoc de Tukey (n=1).

este proceso. El primero de ellos fue la metil-β-ciclodextrina (MβCD), un compuesto que secuestra el colesterol de las membranas plasmáticas y reduce su fluidez. Esto conduce a la inhibición de la ruta de endocitosis dependiente de caveolina y la ruta independiente de clatrina (*Clathrin-independent carriers* o CLIC). El segundo fármaco es la amilorida, un inhibidor de intercambiadores Na⁺/H⁺. Esto afecta directamente al proceso de macropinocitosis, el cual se ha descrito como aumentado en células A549 (Yoon et al., 2010). El último de estos fármacos fue la cloroquina. Este compuesto actúa inhibiendo la acidificación del endosoma temprano, lo que reduce la internalización de componentes extracelulares (Dutta & Donaldson, 2012; Rennick et al., 2021). Con estos fármacos nos planteamos modular la endocitosis en las células diana para estudiar si la internalización de EVs es necesaria para desencadenar este efecto.

Para la inhibición de la endocitosis, hemos tratado las células diana con los fármacos inhibidores durante 1 hora previo al tratamiento con los CM. Tras este pretratamiento, las células se incubaron con los CM y los fármacos inhibidores de endocitosis durante 8 horas y, tras esto, las células se lavaron y se incubaron con los CM hasta el fin del primer tratamiento de 3 días. Al terminar este tratamiento, las células se contaron, se replaquearon al número inicial y se realizó un segundo tratamiento de 3 días. Tras el segundo tratamiento, observamos la presencia de células con un fenotipo agrandado que se puede asociar a la inducción de senescencia paracrina en la condición B+ Cloroquina+ y, del mismo modo, la tinción SA-β-GAL cromogénica mostró un aumento estadísticamente significativo en esta misma condición, comparada con el control CM- (**Figura 23A**). El análisis mediante citometría de flujo con el sustrato C₁₂FDG mostró un aumento en la condición CM+ MβCD + y en CM+ Cloroquina+, aunque no es estadísticamente significativo debido a la alta dispersión de los datos (**Figura 23B**). El análisis del tamaño celular mostró una clara tendencia a la reducción de tamaño celular excepto en la condición CM+ Cloroquina+, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. Además, la cuantificación del número de células demostró que la condición CM+ MβCD+ y CM+ Amilorida+ presenta una recuperación del número de células, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. Por último, el número de células en la

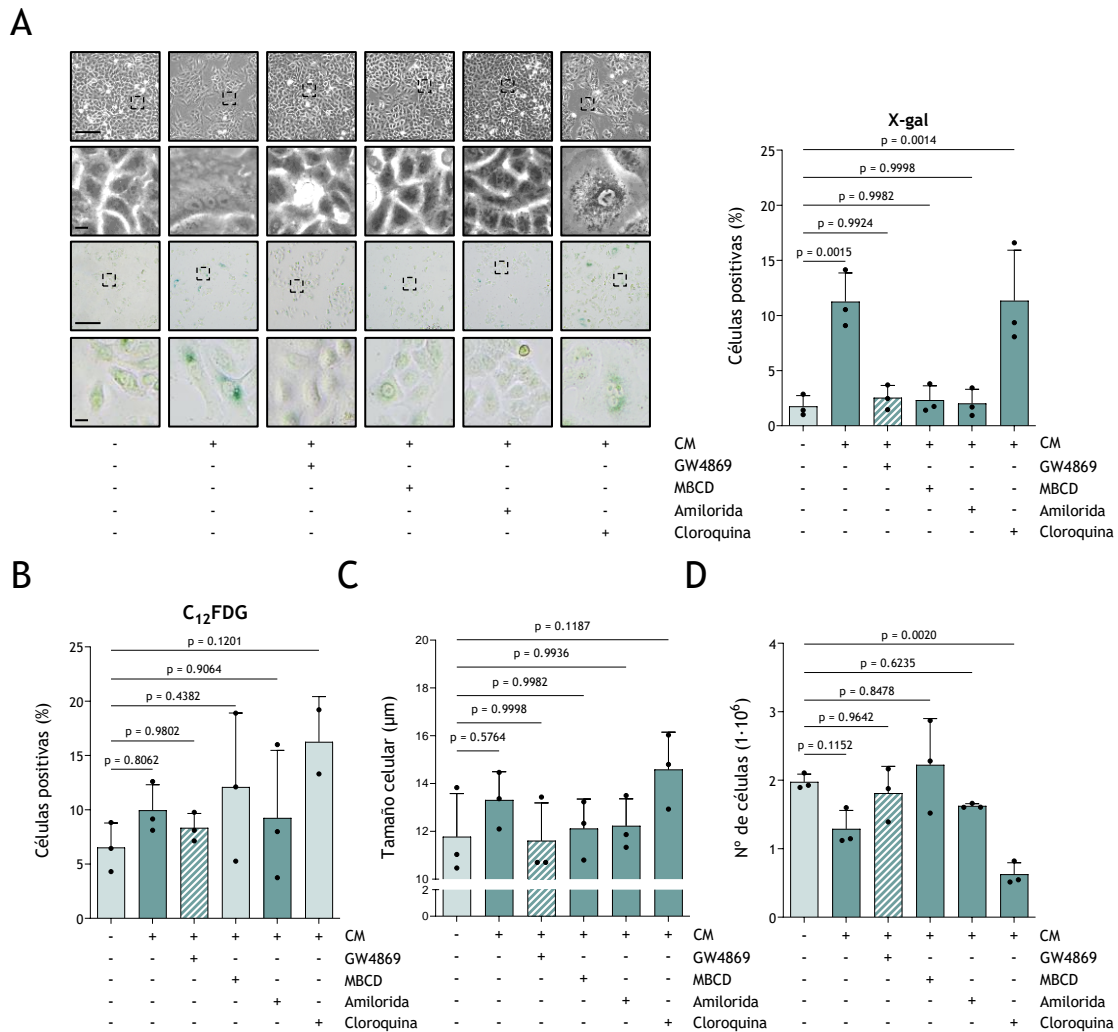


Figura 23. Efecto de la inhibición de endocitosis en senescencia paracrina. (A) Imágenes representativas de los cambios morfológicos, tinción SA-B-GAL y cuantificación de la tinción. La escala de mayor tamaño representa 200 µm y la de menor tamaño 15 µm. (B) Análisis mediante citometría de flujo con el sustrato C₁₂FDG. (C) Medición del tamaño celular. (D) Cuantificación del número de células. La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba ANOVA con el test post-hoc de Tukey (n=3).

condición CM+ Cloroquina+ mostró una clara reducción con respecto al control (**Figura 23C y D**). De manera global, estos resultados subrayan la relevancia de las rutas endocíticas dependientes de caveolina, la ruta independiente de clatrina y la macropinocitosis en el contexto de la senescencia paracrina.

4.8 MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE INNATO

Para estudiar la vía de señalización molecular que induce la senescencia paracrina en las células diana, nos planteamos modular el sistema inmune innato para comprobar si esta era la ruta clave en este proceso. Con este fin generamos líneas celulares con niveles reducidos de *RELA*, que codifica para la proteína p65, una subunidad del complejo de NF-κB, y con niveles reducidos en *cGAS* y *STING*, que actúan como principales sensores de ADN citoplasmático. En su conjunto, estas rutas son la primera barrera de inmunidad celular y responden a infecciones mediante la producción de una amplia gama de factores proinflamatorios.

4.8.1 Caracterización de la línea celular con niveles reducidos de *RELA*

En primer lugar, generamos la línea celular con niveles reducidos en *RELA* mediante shARN. Esta construcción es de expresión constitutiva y está asociada a la expresión de *EGFP* que codifica para la proteína GFP. Como control, hemos utilizado un plásmido con el mismo vector y que también lleva asociada la expresión de *EGFP*. Tras introducir esta construcción en nuestras células, decidimos caracterizar el impacto de la reducción de *RELA* en células senescentes.

Como se puede observar, la reducción de *RELA* no influyó en los cambios morfológicos típicos de senescencia. También observamos que, tras la inducción de senescencia, las células continúan expresando la proteína GFP. Al comprobar la actividad SA- β -GAL mediante tinción cromogénica observamos que la reducción en *RELA* no modifica esta actividad (**Figura 24A**). Mediante qRT-PCR analizamos los niveles de *CDKN1A* y comprobamos que, a pesar de mostrar una ligera reducción con respecto al control, los niveles siguen estando estadísticamente aumentados (**Figura 24B**). A fin de caracterizar el impacto en todos los componentes del SASP, nos propusimos comprobar que la liberación de EVs tras la reducción de *RELA* no se encuentra alterada. Mediante NTA, demostramos que estas células con niveles reducidos no mostraban cambios significativos tras senescencia en cuanto a la liberación de EVs, lo que apunta a que solo el SASP soluble podría estar alterado (**Figura 24C**). Examinando otros marcadores de senescencia, comprobamos que la capacidad formadora de colonias sigue estando comprometida tras la reducción de *RELA* (**Figura 24D**). El análisis de la expresión génica de *NFKB1* mostró que sus niveles se encuentran significativamente reducidos, al tiempo que mediante Western blot examinamos los niveles de p65, que se encuentran drásticamente reducidos tanto en la condición proliferativa (shRELA B-) como en la senescente (shRELA B+). También hemos examinado los niveles de p21 en estas células, no encontrando cambios significativos con respecto a los controles (**Figura 24E y F**). En este contexto, los cambios más relevantes los hemos encontrado examinando mediante qRT-PCR los niveles de algunos genes del SASP regulados por NF- κ B. En este sentido, analizamos los niveles de *SERPINE1*, *CCL2*, *MMP3*, *PDGFA* y *CXCL1*, y observamos que sus niveles de ARNm están significativamente reducidos (**Figura 24G**).

En conjunto, estos resultados demuestran una reducción clara de los niveles de *RELA* y de la proteína que codifica, p65. También hemos demostrado que esta reducción no afecta al fenotipo senescente salvo en la producción de factores solubles del SASP. Esto nos ha permitido generar una línea celular con niveles reducidos en *RELA* para su uso como diana de los medios condicionados.

4.8.2 Modulación de cGAS-STING

La ruta de cGAS-STING se ha descrito como el principal mecanismo de detección de ácidos nucleicos citoplasmáticos (Decout et al., 2021). Dado que las EVs son capaces de transportar una gama muy amplia de factores, entre los que se encuentra ADN, ARNm y microARN, nos propusimos generar líneas celulares con niveles reducidos en *cGAS* y *STING* con el fin de caracterizar si la ruta de inducción de senescencia paracrina era dependiente de esta transferencia de ácidos nucleicos vía EVs. Para esto, empleamos de nuevo una construcción de shARN contra *cGAS* y *STING* de expresión inducible mediante tratamiento con tetraciclina (en nuestro modelo, hemos usado doxiciclina). A esta expresión va acoplada la expresión de *TurboRFP* que codifica la proteína roja fluorescente RFP.

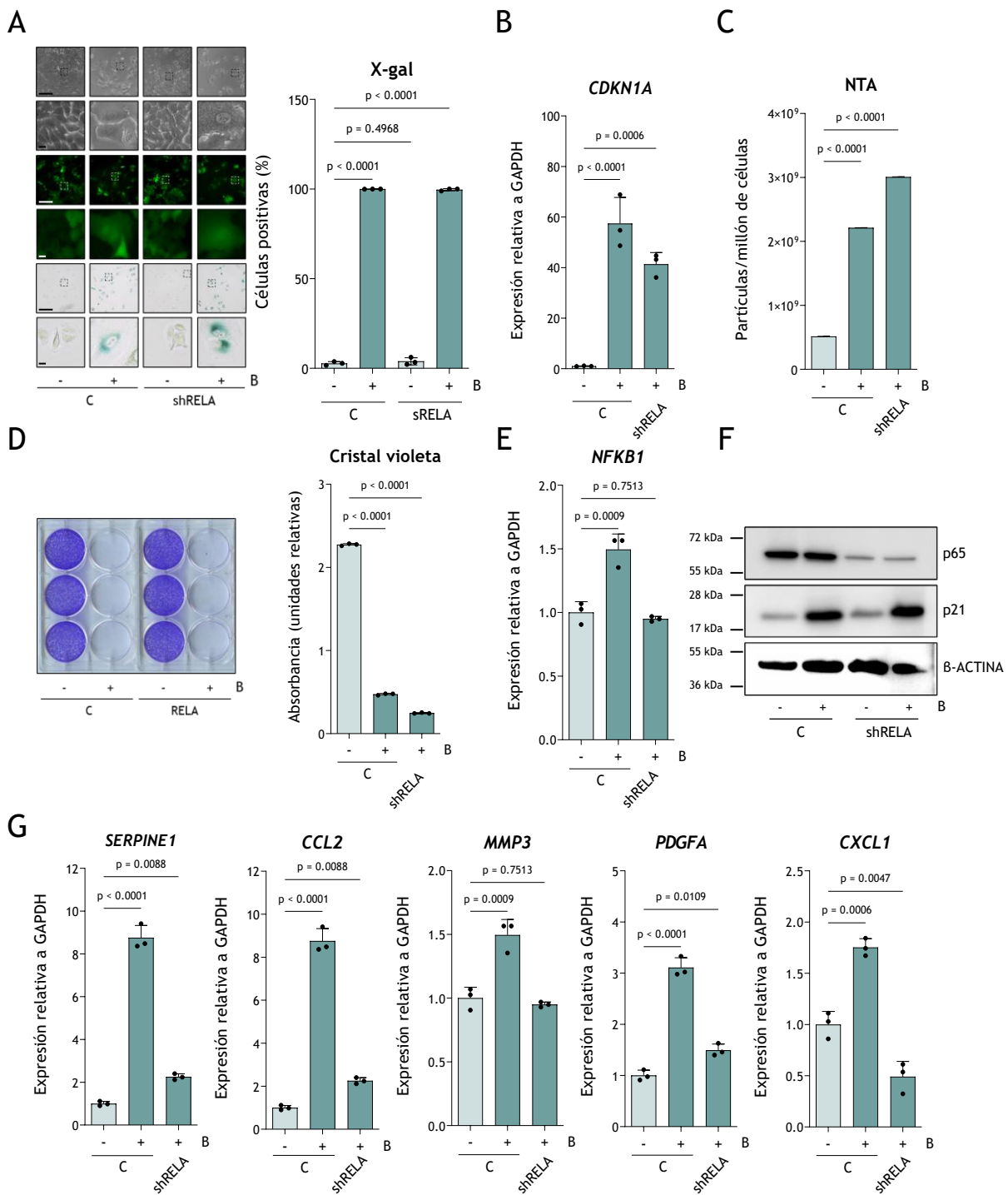


Figura 24. Caracterización de la reducción de RELA. (A) Imágenes representativas de los cambios morfológicos, expresión de la proteína GFP asociada a la construcción y tinción SA-B-GAL. Cuantificación de la tinción. La escala de mayor tamaño representa 200 μ m y la de menor tamaño 15 μ m. (B) Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de *CDKN1A*. Los valores obtenidos fueron relativizados al gen de mantenimiento *GAPDH*. (C) Análisis de las EVs liberadas mediante NTA. (D) Ensayo de formación de colonias teñidas con cristal violeta y su cuantificación. (E) Análisis de la expresión génica de *NFKB1* mediante qRT-PCR. Los valores obtenidos se relativizaron al gen de mantenimiento *GAPDH*. (F) Análisis de la expresión proteica mediante Western blot de p53 y p21. Se utilizó β -Actina como control de carga. (G) Análisis de la expresión génica de *SERPINE1*, *CCL2*, *MMP3*, *PDGFA* y *CXCL1*. Los valores obtenidos fueron relativizados al gen de mantenimiento *GAPDH*. La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba ANOVA con el test post-hoc de Tukey. A-G y F (n=3). F (n=1).

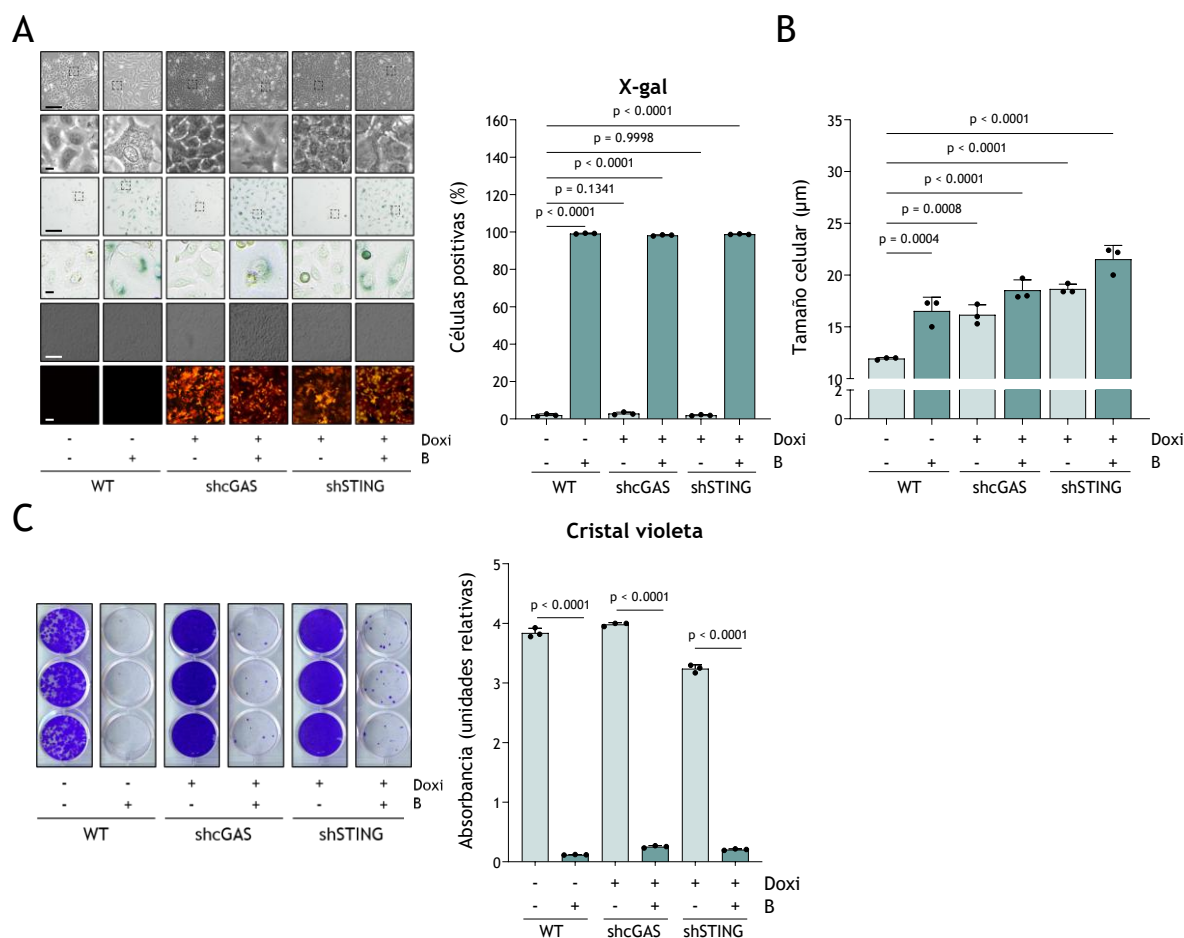


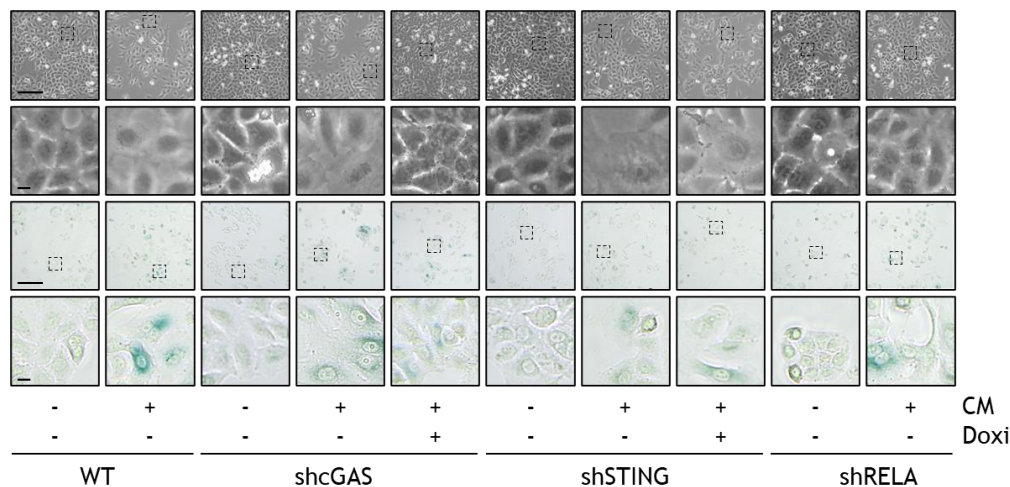
Figura 25. Caracterización de la reducción de *cGAS* y *STING*. (A) Imágenes representativas del cambio morfológico y tinción SA- β -GAL cromogénica. Cuantificación de la tinción. La escala de mayor tamaño representa 200 μm y la de menor tamaño 15 μm . (B) Medición del tamaño celular. (C) Ensayo de formación de colonias con cristal violeta y su cuantificación. La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba ANOVA con el test post-hoc de Tukey. A y B (n=3). La significancia estadística se obtuvo con el test t de Student. C (n=3).

Tras generar estas líneas celulares, hemos caracterizado el impacto de la reducción de *cGAS* y *STING* sobre el fenotipo senescente. Primero, observamos que tras el tratamiento con doxiciclina (Doxi+) la proteína RFP se expresa, tanto en la condición proliferativa como en la senescente. Los cambios morfológicos típicos de la inducción de senescencia se mantienen tras la reducción de *cGAS* y *STING*, así como la actividad beta-galactosidasa medida por tinción SA- β -GAL cromogénica. Del mismo modo, la medición del tamaño celular también mostró que no hay cambios significativos (**Figura 25A y B**). En cuanto a la capacidad de formación de colonias, la reducción de *cGAS* y *STING*, si bien permitió la generación de unas pocas colonias, no produjo una proliferación comparable con la observada en la condición control (**Figura 25C**).

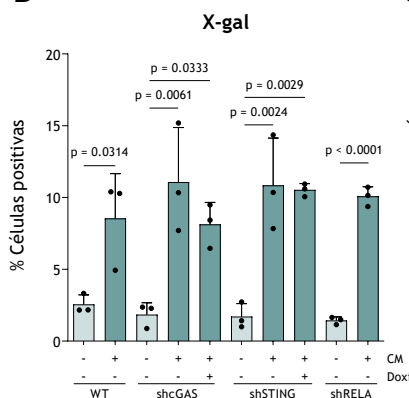
4.8.3 Efectos de la modulación del sistema inmune innato en las células diana

Tras generar las líneas con niveles reducidos de *RELA*, *cGAS* y *STING*, tratamos estas células con los CM- y CM+ para comprobar si la reducción en este sistema inmune innato correlacionaba con el alivio de la senescencia paracrina.

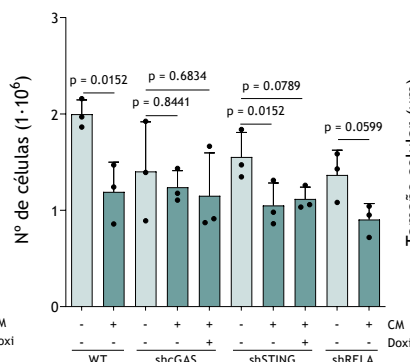
A



B



C



D

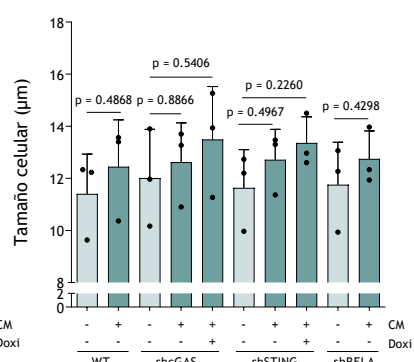


Figura 26. Efecto de la modulación del sistema inmune innato. (A) Imágenes representativas del cambio morfológico, tinción SA-β-GAL cromogénica. La escala de mayor tamaño representa 200 µm y la de menor tamaño 15 µm. (B) Cuantificación de la tinción. (C) Cuantificación del número de células. (D) Medición del tamaño celular. La significancia estadística se obtuvo mediante el test t de Student en las condiciones control. La significancia estadística se obtuvo mediante la prueba ANOVA con el test post-hoc de Tukey en el resto de condiciones (n=3).

La observación de los cambios morfológicos tras el protocolo de dos tratamientos de 3 días con CM+ mostró que, tras la reducción de *cGAS*, *STING* y *RELA*, las células diana mostraban cambios morfológicos compatibles con la inducción de senescencia. Al mismo tiempo, la tinción SA-β-GAL cromogénica demostró un aumento de células positivas tras el tratamiento con CM+ en las condiciones de reducción de los niveles de *cGAS*, *STING* y *RELA* (**Figura 26A y B**). Tras la cuantificación, observamos que las condiciones donde se redujeron los niveles de *cGAS*, *STING* y *RELA* mostraron una reducción significativa del número de células, muy parecida al control (**Figura 26C**). Finalmente, la medición del tamaño celular mostró una tendencia a un tamaño más aumentado en estas condiciones, aunque debido a la dispersión de los datos no hay resultados significativos (**Figura 26D**).

En conclusión, la modulación del sistema inmune innato mediante la reducción de los niveles de *cGAS*, *STING* y *RELA* en las células diana no parece tener un claro efecto en senescencia paracrina.

5 DISCUSIÓN

En el contexto del cáncer, la inducción de senescencia celular es un potente mecanismo de control de la progresión tumoral (d'Adda di Fagagna, 2008; Hernandez-Segura et al., 2018). Durante este estado celular, las células senescentes exhiben un fenotipo secretor muy variado y complejo, el SASP, al que se le han atribuido múltiples funciones, tanto positivas como negativas. El papel dual del SASP, que es consecuencia de la amplia gama de estímulos de senescencia y de su propia heterogeneidad, es un campo lleno de incoherencias que consideramos necesario aclarar. Entre las funciones positivas del SASP, se ha caracterizado la inducción de senescencia paracrina mediada por este fenotipo secretor (Di Mitri & Alimonti, 2016).

Entre los componentes de este fenotipo secretor se encuentran los factores solubles, un heterogéneo conjunto de citoquinas, quimioquinas y metaloproteasas, además de una fracción vesicular compuesta por distintas poblaciones de EVs (Basisty et al., 2020). En nuestro modelo, hemos demostrado la inducción de senescencia paracrina mediada por el medio condicionado senescente de A549 sobre A549 proliferativas, lo que concuerda con resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio (**Figura 9A-E**). También hemos caracterizado que, tras el tratamiento con el medio condicionado senescente, las células diana exhiben marcadores de daño en el ADN. Estos resultados son coherentes con lo ya publicado (Nelson et al., 2012, 2018). Esta inducción de daño en el ADN correlaciona con la inducción de senescencia paracrina, aunque la vía de señalización que la produce en nuestro modelo todavía es desconocida (**Figura 9F**). Tras esta caracterización y teniendo en cuenta que este efecto puede ayudar a limitar la progresión tumoral, nos planteamos estudiar la contribución relativa de cada componente del SASP a la inducción de senescencia paracrina.

La heterogeneidad del SASP es un factor limitante para caracterizar la contribución de cada componente a la inducción de senescencia paracrina. Por ello, nos decidimos a diseccionar los constituyentes de este fenotipo con el propósito de estudiar por separado sus efectos sobre las células diana. Para ello, en un primer momento, nos enfocamos en modular la biogénesis de EVs mediante el uso del inhibidor GW4869, cuyo papel en la inhibición de la biogénesis de EVs ha sido ampliamente demostrado (Catalano & O'Driscoll, 2020). La reducción del número de EVs en nuestros CM tras el tratamiento con el inhibidor (**Figura 10F**) no supone una afectación directa al resto de marcadores de senescencia, en especial en cuanto a la producción de factores solubles del SASP, lo que nos ha permitido generar CM con niveles reducidos de EVs para caracterizar la correlación entre la reducción de vesículas y la inducción de senescencia paracrina (**Figura 10A-E**). Al estudiar el efecto de la reducción de EVs en el CM, hemos observado un claro alivio en la senescencia paracrina (**Figura 11**), lo que apunta a un papel clave de las EVs en la expansión del fenotipo senescente.

Teniendo en cuenta la evidencia publicada (Veerman et al., 2021; Wallis et al., 2021) el método de aislamiento de EVs a partir del CM es clave a la hora de estudiar su funcionalidad. Es por ello por lo que nos decidimos a comparar distintas metodologías de aislamiento y purificación de EVs para estudiar su papel en este efecto. Comparamos la dUC, el método más empleado en el pasado para el aislamiento de EVs, y la SEC, el método de aislamiento y purificación más empleado actualmente en el campo para el aislamiento y purificación (Welsh et al., 2024). Tras comparar ambas metodologías, hemos observado que ambas son capaces de aislar vesículas a

partir de nuestros CM con gran eficiencia (**Figura 12A**). En cuanto a la disección de estas vesículas del resto de componentes del SASP, hemos demostrado que ambas son muy eficientes eliminando los factores solubles, aunque la dUC coaísla algunos factores solubles que la SEC es capaz de eliminar (**Figura 12E**). Estos datos concuerdan con otros artículos del campo donde se evalúa el papel de las EVs en el contexto de la senescencia celular (Wallis et al., 2021). Enfocándonos en las EVs aisladas por SEC, observamos una morfología típica al ser analizadas mediante TEM (**Figura 12C**) y su internalización en las células diana al ser marcadas con el colorante DiO (**Figura 12D**). De manera preliminar, hemos observado que el número de EVs durante senescencia en nuestro modelo aumenta con respecto a la condición control (**Figura 12A**), lo que ha sido descrito con anterioridad (Lehmann et al., 2008; Takahashi et al., 2017; Takasugi et al., 2017). Además, otros parámetros, como el tamaño de las EVs, se ve aumentado durante senescencia, aunque únicamente al analizar las EVs presentes en el CM. Con respecto a las metodologías de aislamiento, hemos observado cambios en este parámetro entre las distintas condiciones, lo que apunta a que los distintos métodos de aislamiento pueden estar enriqueciendo nuestros aislados en poblaciones de vesículas diferentes (**Figura 12B**). Se ha descrito que las características de los medios de cultivo pueden alterar la eficiencia de aislamiento mediante ultracentrifugación, además de que la alta fuerza centrífuga puede provocar agregación de distintas poblaciones de EVs (Driedonks et al., 2019; Linares et al., 2015; Welsh et al., 2024), lo que podría afectar al estudio de su funcionalidad. En este sentido, hemos observado que las EVs-dUC no inducen senescencia paracrina, mientras que al tratar las células diana con las EVs aisladas por SEC (EVs-SEC) sí vemos un claro efecto en la inducción de senescencia paracrina (**Figura 13**). Además, al tratar las células con el SN vemos un claro aumento en la inducción de senescencia paracrina, lo que apunta a que las EVs que no han sido aisladas por ultracentrifugación son las mediadoras de la inducción de senescencia paracrina (**Figura 13**). Es por esto por lo que creemos necesario profundizar en el estudio de estas vesículas que quedan en el SN y compararlas con las EVs aisladas por ambas metodologías, quizás mediante alguna aproximación ómica.

Con el propósito de indagar cuál de las distintas poblaciones de EVs presentes en nuestro CM median este proceso, decidimos fraccionarlas mediante la tecnología de AF4. Esta tecnología permite un alto grado de separación en función del tamaño hidrodinámico, pero no es específico de EVs, lo que implica la optimización de un protocolo propio para estas vesículas (Hood et al., 2014; Welsh et al., 2024; H. Zhang et al., 2018). A pesar de nuestros esfuerzos, debido a limitaciones técnicas no nos fue posible recuperar las EVs fraccionadas mediante esta tecnología para tratar nuestras células diana. Es por esto por lo que nos centramos en utilizar esta metodología para caracterizar si las vesículas secretadas por células proliferativas o senescentes presentaban diferencias que las pudiesen identificar. De manera preliminar, al estudiar el tamaño de ambas poblaciones observamos que las EVs secretadas por células senescentes son más pequeñas que aquellas secretadas por células proliferativas, lo que entra en conflicto con los resultados obtenidos mediante NTA (**Figura 14**). Al estudiar otros parámetros, como la complejidad de las vesículas (que se podría asociar a un mayor número de pliegues de la membrana de las vesículas o a una mayor cantidad de proteínas asociadas a membrana), observamos que las EVs senescentes presentaban una complejidad mayor que las vesículas proliferativas (**Figura 14**). Esto es especialmente relevante, ya que la búsqueda de diferencias entre ambas poblaciones de vesículas podría ser un marcador del estado celular, lo que podría dotar a estos resultados de valor traslacional. Aun con todo lo expuesto, es necesario seguir caracterizando estas vesículas mediante AF4 para comprobar que nuestros datos son consistentes.

Para seguir profundizando en el papel clave de las EVs en la inducción de senescencia paracrina, hemos modulado la expresión de *RAB27A* y *mTOR* a fin de generar CM con niveles reducidos de EVs de manera genética. El papel de *RAB27A* en la liberación de EVs ha caracterizado como clave en este sentido (Ostrowski et al., 2010; Sinha et al., 2016), aunque otras proteínas de la familia RAB pueden mediar este proceso, tales como RAB35 y RAB11 (Hsu et al., 2010; Savina et al., 2003). La reducción de los niveles de *RAB27A* en células senescentes demostró que el fenotipo no se ve alterado (**Figura 15**), pero que la liberación de EVs sí se encuentra muy reducida. Estos resultados se han podido observar con ambas construcciones empleadas para reducir los niveles de *RAB27A*. (**Figura 16**). En cuanto a la ruta de mTOR, la inhibición de esta ruta se ha asociado con el aumento del flujo autofágico, lo que se opone a la liberación de EVs debido a que este proceso fomenta el reciclaje de MVB (Fader et al., 2007; Ravikumar et al., 2004). En nuestro modelo, la reducción de los niveles de *mTOR* correlaciona con la expresión de un fenotipo parecido a senescencia (**Figura 17**). Otros artículos del campo han caracterizado el papel de mTOR en senescencia celular, aunque, a diferencia de nuestros datos, la hiperactivación de mTOR eleva los niveles de p21 (Llanos et al., 2016).

Al tratar las células diana con los CM con niveles reducidos en EVs mediante esta aproximación genética, hemos observado una disminución en los marcadores de senescencia en la condición tratada con CM+shRAB27A #313, lo que apunta a que la reducción de los niveles de EVs tras modular la expresión de *RAB27A* con esta construcción, es clave en la inducción de senescencia paracrina. Pese a que ambas construcciones reducen el número de EVs en el CM, la construcción shRAB27A #735 es menos eficiente que la construcción shRAB27A #313, lo que puede explicar las diferencias entre los efectos producidos por ambas construcciones (**Figura 18**). Al evaluar los efectos de la reducción de *mTOR* en la inducción de senescencia paracrina, observamos que las células shmTOR senescentes mediante bleomicina fueron capaces de inducir senescencia paracrina, mientras que las células shmTOR sin tratar, en las que observamos la presencia de marcadores de senescencia de manera basal, no indujeron senescencia paracrina. Estos datos no encajan bien con nuestras hipótesis puesto que esperaríamos que las células que presentan marcadores de senescencia tras shmTOR fuesen capaces de inducir senescencia pparacrina independientemente del tratamiento con bleomicina. Una posible explicación a esta observación es que el fenotipo senescente producido tras la reducción de *mTOR*, no conlleve la activación de vías de daño al ADN que impliquen la activación de p53 y otros mediadores del SASP. En cualquier caso, es necesario seguir profundizando en el papel de mTOR en la modulación de las EVs durante senescencia para entender su contribución a este proceso.

Además del uso del inhibidor GW4869 y la aproximación genética para modular la biogénesis de EVs, nos planteamos utilizar otros fármacos moduladores de la biogénesis para continuar caracterizando el papel de las vesículas en la inducción de senescencia paracrina. En este sentido, utilizamos bafilomicina A1, que inhibe la subunidad C de la V-ATPasa (ATP6V0/V0) e inhibe el flujo autofágico, lo que evita el reciclaje de los MVB y aumenta la secreción de EVs (Fader et al., 2007; Mauvezin & Neufeld, 2015). También hemos utilizado rapamicina, inhibidor de mTORC1, lo que fomenta la autofagia y la degradación de MVB (Fader et al., 2007). Por último, hemos empleado ML-098 como activador de RAB7, lo que facilita la degradación de los MVB mediante su fusión con los lisosomas (Rocha et al., 2009).

La modulación farmacológica con rapamicina y ML-098, demostró que ambos fármacos no afectaron al fenotipo senescente. En cuanto a la bafilomicina A1, los resultados de este trabajo

han puesto de manifiesto que este fármaco modula la actividad de la enzima beta-galactosidasa, debido a la basificación del pH lisosomal, que inhibe la actividad enzimática. Esto se ha demostrado por la ausencia de células SA- β -GAL positivas tras este fármaco (**Figura 19A**). Al mismo tiempo, hemos observado que la dosis de tratamiento con bafilomicina A1 aumenta marcadores de autofagia como LC3B y reduce el pH lisosomal (**Figura 19E y F**). En cuanto al efecto de estos fármacos sobre la biogénesis de EVs, hemos observado que tras el tratamiento con bafilomicina A1, el número de EVs en el CM medido por NTA aumentó significativamente. Por otra parte, el número de EVs tras rapamicina y ML-098 no se vio reducido con respecto al control senescente (**Figura 20**), aunque no hemos analizado los efectos de estos tratamientos sobre otros aspectos de la biogénesis de EVs. De hecho, algunos estudios han señalado la problemática de limitarse a observar los efectos de los inhibidores sobre la biogénesis de EVs únicamente analizando el número de vesículas liberadas, sin tener en cuenta los procesos que se pueden ver alterados en el interior celular (Edgar et al., 2016; Matsumoto et al., 2017; van Niel et al., 2018). Otra posible explicación podría ser que la dosis empleada en nuestros tratamientos no sea la indicada para modular la biogénesis de las EVs. La concentración empleada ha sido establecida en función de datos anteriores obtenidos en el laboratorio y en concentraciones óptimas para la inhibición de las rutas descritas, aunque también es posible que estas dosis sean muy dependientes de tipo celular, lo que apuntaría a que en el caso de las A549 senescentes sea necesario aumentar esta dosis. Al estudiar los efectos de estos fármacos en la inducción de senescencia paracrina, observamos que tras el tratamiento con el fármaco ML-098 los marcadores de senescencia se vieron reducidos. En el caso de la rapamicina, excepto en la reducción del número de células positivas para la tinción SA- β -GAL cromogénica (**Figura 21A**), no parece que este fármaco tenga un efecto significativo en el alivio de la senescencia paracrina, siendo estos resultados coherentes con los obtenidos con shmTOR. En cuanto a la bafilomicina A1, los efectos en la inducción de senescencia paracrina no han sido los esperados. Si bien hemos observado que el número de EVs tras bafilomicina A1 se encontraba muy aumentado con respecto al control senescente (**Figura 20**), no hemos observado un aumento en la inducción de senescencia paracrina en esta condición comparada con CM+ (**Figura 21**). Para tratar de profundizar en este efecto, trabajamos en la hipótesis de que nuestra detección de células positivas para la tinción SA- β -GAL cromogénica y con el sustrato C₁₂FDG por citometría de flujo, estaba siendo infraestimada por el arrastre de este fármaco y la inhibición de esta actividad en células diana. Para ello, generamos CM- tratado con bafilomicina A1 e incubamos células A549 senescentes mediante tratamiento con bleomicina con este medio. Hemos observado que en estas células diana senescentes, la presencia de células SA- β -GAL positivas se redujo de manera significativa (**Figura 22A**). Además, el análisis mediante Western blot de las células proliferativas tratadas con el CM+ tras rapamicina, bafilomicina y ML-098, demostró que los marcadores de flujo autofágico LC3B y p62 se encontraban aumentados en la condición CM+BAFA1+, lo que sugiere que el fármaco está siendo arrastrado en el CM (**Figura 22B**). A pesar de estos resultados, es necesario profundizar en otros aspectos del efecto de bafilomicina A1 en este sentido. Es posible que el aumento del número de EVs en el CM no se vea correlacionado con un aumento en la inducción de senescencia paracrina, quizás por los cambios en el cargo de las EVs tras el tratamiento con bafilomicina A1. En definitiva, es necesario seguir investigando si el aumento del número de EVs, y no su composición, es el factor clave en la inducción de senescencia paracrina.

Tras caracterizar el papel clave de las EVs en la inducción de senescencia paracrina, creímos conveniente estudiar si la internalización de las vesículas era necesaria para disparar este proceso. La alta heterogeneidad de las proteínas asociadas a EVs y sus cambios en senescencia,

así como los cambios en el cargo, nos llevó a plantearnos si la ruta de inducción de senescencia paracrina podría estar mediada por la interacción entre receptores membrana-membrana o si las células diana internalizaban las vesículas y liberaban su cargo en el interior celular para disparar este proceso. Para ello, hemos utilizado inhibidores de varias rutas de endocitosis para estudiar el papel de la internalización en la inducción de senescencia paracrina y para caracterizar las rutas clave que disparan este proceso. Utilizamos el inhibidor metil- β -ciclodextrina (M β CD) para inhibir las rutas dependientes de caveolina y la ruta independiente de clatrina (CLIC) (Anderson, 1998; Kurzchalia & Partan, 1999; Nabi & Le, 2003; Parton & Simons, 2007). Además, utilizamos el inhibidor amilorida para la inhibición de la macropinocitosis, un proceso que está muy aumentado en la línea celular A549 (Fitzner et al., 2011; Gu et al., 2010; Kerr & Teasdale, 2009; Yoon et al., 2010). Por último, utilizamos la cloroquina que impide la maduración de los endosomas y reduce la internalización (Dutta & Donaldson, 2012; Rennick et al., 2021). El tratamiento con M β CD y la amilorida redujo algunos marcadores de senescencia en las células diana (**Figura 23**). Esto sugiere que la endocitosis mediante las rutas dependientes de caveolina, independientes de clatrina y la macropinocitosis son necesarias para la inducción de senescencia paracrina. En definitiva, las EVs parecen necesitar ser internalizadas en las células diana para disparar este efecto.

Por último, para tratar de caracterizar la vía de señalización molecular que induce senescencia paracrina, nos enfocamos en la modulación del sistema inmune innato como principal mecanismo mediante la reducción de los niveles de *cGAS*, *STING* y *RELA* en las células diana. El papel del sistema inmune innato en senescencia ha sido caracterizado previamente (Dou et al., 2017; Glück et al., 2017; Takahashi et al., 2017; H. Yang et al., 2017). En nuestro modelo, la reducción de los niveles de *RELA* en células tumorales senescentes redujo los niveles de factores solubles del SASP, sin afectar a otros aspectos del fenotipo senescente, como la biogénesis y liberación de EVs (**Figura 24**). En cuanto a *cGAS-STING*, la reducción de sus niveles no alteró significativamente la morfología ni la actividad SA- β -GAL. Aunque hemos observado la presencia de algunas colonias tras la inducción de senescencia, la proliferación no fue comparable con la observada en los controles (**Figura 25C**). Al observar los efectos del CM senescente en estas células diana con niveles reducidos de *cGAS*, *STING* y *RELA*, no hemos observado un alivio de la senescencia paracrina, lo que sugiere que en las células A549, el sistema inmune innato no juega un papel clave en la inducción de senescencia paracrina. Otros artículos han demostrado, sin embargo, que la ruta de NF- κ B en un contexto no tumoral media la inducción de senescencia paracrina (Fafián-Labora & O’Loghlen, 2021). Es necesario profundizar si este efecto es propio de las A549 o bien es extensible a otros tipos tumorales.

En definitiva, hemos demostrado el papel clave de las EVs secretadas por células tumorales senescentes en senescencia paracrina. Hemos abordado la problemática de la heterogeneidad del SASP mediante su disección física, genética y farmacológica para estudiar la contribución relativa de cada componente a este proceso. Al mismo tiempo, hemos demostrado que la vía endocítica resulta clave a la hora de inducir este efecto en las células diana, lo que apunta a la necesidad de que las vesículas se internalicen. Finalmente, hemos tratado de caracterizar la ruta de inducción de senescencia paracrina mediada por estas vesículas, aunque sin éxito. Futuros experimentos que empleen técnicas ómicas podrán ayudar a resolver esta cuestión, lo que nos permitirá conocer las rutas implicadas en la inducción de senescencia paracrina. Al mismo tiempo, la traslación de este modelo *in vitro* a un contexto *in vivo* permitirá conocer el alcance de este efecto en un contexto más fisiológico, con el fin de trasladar los resultados de esta tesis a un ámbito más clínico. Aun con todo, el papel de los factores solubles, que constituyen una

parte muy amplia del SASP, debería ser caracterizado más en profundidad en este contexto. Es posible que, aunque las EVs tengan un papel clave en este sentido, la contribución de los factores solubles también sea relevante, lo que podría suponer una sinergia entre los componentes del SASP soluble y vesicular a este proceso.

Finalmente, creemos que ahondar en los estímulos inductores de senescencia paracrina contribuirá de manera positiva a nuevas vías más eficaces para el tratamiento de tumores mediante quimioterapia.

6 CONCLUSIONES

Con todo lo expuesto, las conclusiones de este trabajo son:

1. El CM de células A549 senescentes mediante bleomicina induce senescencia paracrina en células A549 proliferativas.
2. El tratamiento con el inhibidor GW4869 reduce los niveles de EVs en el CM sin alterar significativamente otros marcadores de senescencia. Además, la reducción de las EVs tras el uso del inhibidor GW4869 correlaciona con el alivio de la senescencia paracrina
3. La comparativa entre los métodos de aislamiento y purificación SEC y dUC demostró que ambos son capaces de aislar poblaciones de EVs a partir del CM, eliminando la mayor parte de los factores solubles, siendo SEC un poco más eficiente que dUC en este proceso. De manera preliminar, nuestros resultados empleando la tecnología AF4 demostraron que las EVs de A549 proliferativas y senescentes muestran cambios significativos. Al estudiar el efecto de las EVs aisladas por SEC y las presentes en el SN tras dUC observamos que en estas condiciones se induce senescencia paracrina.
4. La reducción de los niveles de *RAB27A* correlaciona con la reducción de los niveles de EVs en el CM, sin alterar otros aspectos del fenotipo senescente. Además, la reducción de los niveles de *mTOR* induce un fenotipo parecido a senescencia en las células A549. Al tratar las células A549 diana con estos CM observamos que la reducción de los niveles de EVs tras la modulación genética de la biogénesis correlaciona con un alivio de la senescencia paracrina al modular *RAB27A* pero no *mTOR*.
5. La modulación farmacológica de la biogénesis de EVs afectó al número de vesículas sin afectar al fenotipo senescente excepto en el caso de BAFA1. Esta modulación farmacológica de la biogénesis de EVs puso de manifiesto que la activación de RAB7 alivia la senescencia paracrina. Al mismo tiempo, observamos que la modulación mediante BAFA1 de la senescencia paracrina puede estar opacada por el arrastre de este fármaco en los CM
6. La modulación de la endocitosis mediante M β CD y amilorida destacó el papel clave de esta ruta en el alivio de la senescencia paracrina. Esto supone que, en concreto, la ruta de internalización de EVs dependiente de caveolina, independiente de clatrina y la ruta macropinocítica son fundamentales en este proceso.
7. La reducción de *RELA* reduce los niveles de genes asociados al SASP sin afectar a otros aspectos del fenotipo senescente. Al mismo tiempo, la reducción de los niveles de *cGAS* y *STING* no afectó al fenotipo senescente en células A549. Finalmente, hemos demostrado que la modulación del sistema inmune innato no parece tener efecto en la inducción de senescencia paracrina.

A la luz de estos resultados, nuestra conclusión principal es que la inducción de senescencia paracrina en un modelo tumoral está mediada, al menos parcialmente, por las EVs liberadas por células tumorales senescentes.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., Athineos, D., Kang, T.-W., Lasitschka, F., Andrulis, M., Pascual, G., Morris, K. J., Khan, S., Jin, H., Dharmalingam, G., Snijders, A. P., Carroll, T., Capper, D., Pritchard, C., ... Gil, J. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology*, *15*(8), 978-990. <https://doi.org/10.1038/ncb2784>
- Acosta, J. C., O'Loughlen, A., Banito, A., Guijarro, M. V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., Takatsu, Y., Melamed, J., d'Adda di Fagagna, F., Bernard, D., Hernando, E., & Gil, J. (2008). Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell*, *133*(6), 1006-1018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.038>
- Al Suraih, M. S., Trussoni, C. E., Splinter, P. L., LaRusso, N. F., & O'Hara, S. P. (2020). Senescent cholangiocytes release extracellular vesicles that alter target cell phenotype via the epidermal growth factor receptor. *Liver International*, *40*(10), 2455-2468. <https://doi.org/10.1111/liv.14569>
- Alibhai, F. J., Lim, F., Yeganeh, A., DiStefano, P. V., Binesh-Marvasti, T., Belfiore, A., Wlodarek, L., Gustafson, D., Millar, S., Li, S., Weisel, R. D., Fish, J. E., & Li, R. (2020). Cellular senescence contributes to age-dependent changes in circulating extracellular vesicle cargo and function. *Aging Cell*, *19*(3). <https://doi.org/10.1111/accel.13103>
- Alimonti, A., Nardella, C., Chen, Z., Clohessy, J. G., Carracedo, A., Trotman, L. C., Cheng, K., Varmeh, S., Kozma, S. C., Thomas, G., Rosivatz, E., Woscholski, R., Cognetti, F., Scher, H. I., & Pandolfi, P. P. (2010). A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *Journal of Clinical Investigation*, *120*(3), 681-693. <https://doi.org/10.1172/JCI40535>
- Alspach, E., Flanagan, K. C., Luo, X., Ruhland, M. K., Huang, H., Pazolli, E., Donlin, M. J., Marsh, T., Piwnica-Worms, D., Monahan, J., Novack, D. V., McAllister, S. S., & Stewart, S. A. (2014). p38MAPK Plays a Crucial Role in Stromal-Mediated Tumorigenesis. *Cancer Discovery*, *4*(6), 716-729. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0743>
- Anderson, R. G. W. (1998). THE CAVEOLAE MEMBRANE SYSTEM. En *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 67, Número Volume 67, 1998, pp. 199-225). Annual Reviews. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.199>
- Angelini, P. D., Fluck, M. F. Z., Pedersen, K., Parra-Palau, J. L., Guiu, M., Bernadó Morales, C., Vicario, R., Luque-García, A., Navalpotro, N. P., Giralt, J., Canals, F., Gomis, R. R., Tabernero, J., Baselga, J., Villanueva, J., & Arribas, J. (2013). Constitutive HER2 Signaling Promotes Breast Cancer Metastasis through Cellular Senescence. *Cancer Research*, *73*(1), 450-458. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2301>

- Aoshiba, K., Tsuji, T., Kameyama, S., Itoh, M., Semba, S., Yamaguchi, K., & Nakamura, H. (2013). Senescence-associated secretory phenotype in a mouse model of bleomycin-induced lung injury. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *65*(7-8), 1053-1062. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2013.04.001>
- Aoshiba, K., Tsuji, T., & Nagai, A. (2003). Bleomycin induces cellular senescence in alveolar epithelial cells. *European Respiratory Journal*, *22*(3), 436-443. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00011903>
- Atay, S., Gercel-Taylor, C., & Taylor, D. D. (2011). Human Trophoblast-Derived Exosomal Fibronectin Induces Pro-Inflammatory IL-1 β Production by Macrophages. *American Journal of Reproductive Immunology*, *66*(4), 259-269. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.00995.x>
- Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., & David, G. (2012). Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology*, *14*(7), 677-685. <https://doi.org/10.1038/ncb2502>
- Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., A. Saltness, R., Jeganathan, K. B., Verzosa, G. C., Pezeshki, A., Khazaie, K., Miller, J. D., & van Deursen, J. M. (2016). Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, *530*(7589), 184-189. <https://doi.org/10.1038/nature16932>
- Barrès, C., Blanc, L., Bette-Bobillo, P., André, S., Mamoun, R., Gabius, H.-J., & Vidal, M. (2010). Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood*, *115*(3), 696-705. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-231449>
- Basisty, N., Kale, A., Jeon, O. H., Kuehnemann, C., Payne, T., Rao, C., Holtz, A., Shah, S., Sharma, V., Ferrucci, L., Campisi, J., & Schilling, B. (2020). A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLOS Biology*, *18*(1), e3000599. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000599>
- Bavik, C., Coleman, I., Dean, J. P., Knudsen, B., Plymate, S., & Nelson, P. S. (2006). The Gene Expression Program of Prostate Fibroblast Senescence Modulates Neoplastic Epithelial Cell Proliferation through Paracrine Mechanisms. *Cancer Research*, *66*(2), 794-802. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1716>
- Biran, A., Zada, L., Abou Karam, P., Vadai, E., Roitman, L., Ovadya, Y., Porat, Z., & Krizhanovsky, V. (2017). Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell*, *16*(4), 661-671. <https://doi.org/10.1111/acel.12592>
- Birch, J., & Passos, J. F. (2017). Targeting the SASP to combat ageing: Mitochondria as possible intracellular allies? *BioEssays*, *39*(5), 1600235. <https://doi.org/10.1002/bies.201600235>

Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science*, 279(5349), 349-352.
<https://doi.org/10.1126/science.279.5349.349>

Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. (2004). The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell*, 116(2), 153-166. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01079-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01079-1)

Bonsergent, E., Grisard, E., Buchrieser, J., Schwartz, O., Théry, C., & Lavieu, G. (2021). Quantitative characterization of extracellular vesicle uptake and content delivery within mammalian cells. *Nature Communications*, 12(1), 1864. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22126-y>

Borghesan, M., Fafián-Labora, J., Eleftheriadou, O., Carpintero-Fernández, P., Paez-Ribes, M., Vizcay-Barrena, G., Swisa, A., Kolodkin-Gal, D., Ximénez-Embún, P., Lowe, R., Martín-Martín, B., Peinado, H., Muñoz, J., Fleck, R. A., Dor, Y., Ben-Porath, I., Vossenkamper, A., Muñoz-Espin, D., & O’Loghlen, A. (2019). Small Extracellular Vesicles Are Key Regulators of Non-cell Autonomous Intercellular Communication in Senescence via the Interferon Protein IFITM3. *Cell Reports*, 27(13), 3956-3971.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.095>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A. H. F. M., Schlegelberger, B., Stein, H., Dörken, B., Jenuwein, T., & Schmitt, C. A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*, 436(7051), 660-665. <https://doi.org/10.1038/nature03841>

Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., Ranta, F., Ullrich, S., Mocikat, R., Braungart, K., Mehra, T., Fehrenbacher, B., Berdel, J., Niessner, H., Meier, F., ... Röcken, M. (2013). T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*, 494(7437), 361-365. <https://doi.org/10.1038/nature11824>

Burd, C. E., Sorrentino, J. A., Clark, K. S., Darr, D. B., Krishnamurthy, J., Deal, A. M., Bardeesy, N., Castrillon, D. H., Beach, D. H., & Sharpless, N. E. (2013). Monitoring Tumorigenesis and Senescence In Vivo with a p16INK4a-Luciferase Model. *Cell*, 152(1), 340-351. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.010>

Buschow, S. I., Nolte-‘t Hoen, E. N. M., Van Niel, G., Pols, M. S., Ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C. J. M., Raposo, G., Wubbolts, R., Wauben, M. H. M., & Stoorvogel, W. (2009). MHC II in Dendritic Cells is Targeted to Lysosomes or T Cell-Induced Exosomes Via Distinct Multivesicular Body Pathways. *Traffic*, 10(10), 1528-1542. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x>

Cai, H., Reinisch, K., & Ferro-Novick, S. (2007). Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs Work Together to Mediate the Intracellular Destination of a Transport Vesicle. *Developmental Cell*, 12(5), 671-682. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.04.005>



- Casella, G., Munk, R., Kim, K. M., Piao, Y., De, S., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2019). Transcriptome signature of cellular senescence. *Nucleic Acids Research*, *47*(14), 7294-7305. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz555>
- Catalano, M., & O'Driscoll, L. (2020). Inhibiting extracellular vesicles formation and release: A review of EV inhibitors. *Journal of Extracellular Vesicles*, *9*(1), 1703244. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1703244>
- Chairoungdua, A., Smith, D. L., Pochard, P., Hull, M., & Caplan, M. J. (2010). Exosome release of β -catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *Journal of Cell Biology*, *190*(6), 1079-1091. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002049>
- Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.-M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N. E., Ding, S., Feng, W., Luo, Y., Wang, X., Aykin-Burns, N., Krager, K., Ponnappan, U., Hauer-Jensen, M., Meng, A., & Zhou, D. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nature Medicine*, *22*(1), 78-83. <https://doi.org/10.1038/nm.4010>
- Chang, T.-C., Wentzel, E. A., Kent, O. A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K. H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C. J., Arking, D. E., Beer, M. A., Maitra, A., & Mendell, J. T. (2007). Transactivation of miR-34a by p53 Broadly Influences Gene Expression and Promotes Apoptosis. *Molecular Cell*, *26*(5), 745-752. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.010>
- Chen, Z., Trotman, L. C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z. A., Niki, M., Koutcher, J. A., Scher, H. I., Ludwig, T., Gerald, W., Cordon-Cardo, C., & Paolo Pandolfi, P. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, *436*(7051), 725-730. <https://doi.org/10.1038/nature03918>
- Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J. E., Premssrirut, P., Luo, W., Chicas, A., Lee, C. S., Kogan, S. C., & Lowe, S. W. (2011). Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes & Development*, *25*(20), 2125-2136. <https://doi.org/10.1101/gad.17276711>
- Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & van Deursen, J. M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: From mechanisms to therapy. *Nature Medicine*, *21*(12), 1424-1435. <https://doi.org/10.1038/nm.4000>
- Christianson, H. C., Svensson, K. J., van Kuppevelt, T. H., Li, J.-P., & Belting, M. (2013). Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(43), 17380-17385. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304266110>
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguría, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., Beach, D., & Serrano, M. (2005). Senescence in premalignant tumours. *Nature*, *436*(7051), 642-642. <https://doi.org/10.1038/436642a>

- Collado, M., & Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: Evidence from mice and humans. *Nature Reviews Cancer*, *10*(1), 51-57. <https://doi.org/10.1038/nrc2772>
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L. F., Théry, C., & Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, jcs.128868. <https://doi.org/10.1242/jcs.128868>
- Coppé, J.-P., Kauser, K., Campisi, J., & Beauséjour, C. M. (2006). Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor by Primary Human Fibroblasts at Senescence *. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(40), 29568-29574. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603307200>
- Coppé, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P.-Y., & Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biology*, *6*(12), e301. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>
- Coppé, J.-P., Rodier, F., Patil, C. K., Freund, A., Desprez, P.-Y., & Campisi, J. (2011). Tumor Suppressor and Aging Biomarker p16INK4a Induces Cellular Senescence without the Associated Inflammatory Secretory Phenotype *. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(42), 36396-36403. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257071>
- Correia-Melo, C., Marques, F. D., Anderson, R., Hewitt, G., Hewitt, R., Cole, J., Carroll, B. M., Miwa, S., Birch, J., Merz, A., Rushton, M. D., Charles, M., Jurk, D., Tait, S. W., Czapiewski, R., Greaves, L., Nelson, G., Bohlooly-Y, M., Rodriguez-Cuenca, S., ... Passos, J. F. (2016). Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *The EMBO Journal*, *35*(7), 724-742. <https://doi.org/10.15252/embj.201592862>
- Crescenzi, E., Pacifico, F., Lavorgna, A., De Palma, R., D'Aiuto, E., Palumbo, G., Formisano, S., & Leonardi, A. (2011). NF-κB-dependent cytokine secretion controls Fas expression on chemotherapy-induced premature senescent tumor cells. *Oncogene*, *30*(24), 2707-2717. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.1>
- d'Adda di Fagagna, F. (2008). Living on a break: Cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature Reviews Cancer*, *8*(7), 512-522. <https://doi.org/10.1038/nrc2440>
- De Cecco, M., Ito, T., Petrashen, A. P., Elias, A. E., Skvir, N. J., Criscione, S. W., Caligiana, A., Broccoli, G., Adney, E. M., Boeke, J. D., Le, O., Beauséjour, C., Ambati, J., Ambati, K., Simon, M., Seluanov, A., Gorbunova, V., Slagboom, P. E., Helfand, S. L., ... Sedivy, J. M. (2019). L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature*, *566*(7742), 73-78. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0784-9>
- Decout, A., Katz, J. D., Venkatraman, S., & Ablasser, A. (2021). The cGAS–STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*, *21*(9), 548-569. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00524-z>

- Di, G., Liu, Y., Lu, Y., Liu, J., Wu, C., & Duan, H.-F. (2014). IL-6 Secreted from Senescent Mesenchymal Stem Cells Promotes Proliferation and Migration of Breast Cancer Cells. *PLOS ONE*, 9(11), e113572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113572>
- Di Mitri, D., & Alimonti, A. (2016). Non-Cell-Autonomous Regulation of Cellular Senescence in Cancer. *Trends in Cell Biology*, 26(3), 215-226. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.005>
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., & Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9363-9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>
- Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of Endocytosis. En *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 78, Número Volume 78, 2009, pp. 857-902). Annual Reviews. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>
- Dou, Z., Ghosh, K., Vizioli, M. G., Zhu, J., Sen, P., Wangenstein, K. J., Simithy, J., Lan, Y., Lin, Y., Zhou, Z., Capell, B. C., Xu, C., Xu, M., Kieckhafer, J. E., Jiang, T., Shoshkes-Carmel, M., Tanim, K. M. A. A., Barber, G. N., Seykora, J. T., ... Berger, S. L. (2017). Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature*, 550(7676), 402-406. <https://doi.org/10.1038/nature24050>
- Driedonks, T. A. P., Twilhaar, M. K. N., & Nolte-'t Hoen, E. N. M. (2019). Technical approaches to reduce interference of Fetal calf serum derived RNA in the analysis of extracellular vesicle RNA from cultured cells. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8(1), 1552059. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1552059>
- Dutta, D., & Donaldson, J. G. (2012). Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cellular Logistics*, 2(4), 203-208. <https://doi.org/10.4161/cl.23967>
- Edgar, J. R., Manna, P. T., Nishimura, S., Banting, G., & Robinson, M. S. (2016). Tetherin is an exosomal tether. *eLife*, 5, e17180. <https://doi.org/10.7554/eLife.17180>
- Efeyan, A., Ortega-Molina, A., Velasco-Miguel, S., Herranz, D., Vassilev, L. T., & Serrano, M. (2007). Induction of p53-Dependent Senescence by the MDM2 Antagonist Nutlin-3a in Mouse Cells of Fibroblast Origin. *Cancer Research*, 67(15), 7350-7357. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0200>
- Escrevente, C., Keller, S., Altevogt, P., & Costa, J. (2011). Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer*, 11(1), 108. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-108>
- Ewald, J. A., Desotelle, J. A., Wilding, G., & Jarrard, D. F. (2010). Therapy-Induced Senescence in Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 102(20), 1536-1546. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq364>
- Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G. J., Zanesi, N., Crawford, M., Ozer, G. H., Wernicke, D., Alder, H.,

- Caligiuri, M. A., Nana-Sinkam, P., Perrotti, D., & Croce, C. M. (2012). MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(31), E2110-E2116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209414109>
- Fader, C. M., Sánchez, D., Furlán, M., & Colombo, M. I. (2007). Induction of Autophagy Promotes Fusion of Multivesicular Bodies with Autophagic Vacuoles in K562 Cells. *Traffic*, *9*(2), 230-250. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00677.x>
- Fafián-Labora, J. A., & O’Loughlen, A. (2021). NF- κ B/IKK activation by small extracellular vesicles within the SASP. *Aging Cell*, *20*(7), e13426. <https://doi.org/10.1111/acel.13426>
- Faget, D. V., Ren, Q., & Stewart, S. A. (2019). Unmasking senescence: Context-dependent effects of SASP in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *19*(8), 439-453. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0156-2>
- Feng, D., Zhao, W.-L., Ye, Y.-Y., Bai, X.-C., Liu, R.-Q., Chang, L.-F., Zhou, Q., & Sui, S.-F. (2010). Cellular Internalization of Exosomes Occurs Through Phagocytosis. *Traffic*, *11*(5), 675-687. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01041.x>
- Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., Hanisch, U.-K., & Simons, M. (2011). Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *Journal of Cell Science*, *124*(3), 447-458. <https://doi.org/10.1242/jcs.074088>
- Fletcher-Sananikone, E., Kanji, S., Tomimatsu, N., Di Cristofaro, L. F. M., Kollipara, R. K., Saha, D., Floyd, J. R., Sung, P., Hromas, R., Burns, T. C., Kittler, R., Habib, A. A., Mukherjee, B., & Burma, S. (2021). Elimination of Radiation-Induced Senescence in the Brain Tumor Microenvironment Attenuates Glioblastoma Recurrence. *Cancer Research*, *81*(23), 5935-5947. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-0752>
- Fraile-Ramos, A., Cepeda, V., Elstak, E., & van der Sluijs, P. (2010). Rab27a Is Required for Human Cytomegalovirus Assembly. *PLoS ONE*, *5*(12), e15318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015318>
- Franzen, C. A., Simms, P. E., Van Huis, A. F., Foreman, K. E., Kuo, P. C., & Gupta, G. N. (2014). Characterization of Uptake and Internalization of Exosomes by Bladder Cancer Cells. *BioMed Research International*, *2014*(1), 619829. <https://doi.org/10.1155/2014/619829>
- Freund, A., Laberge, R.-M., Demaria, M., & Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Molecular Biology of the Cell*, *23*(11), 2066-2075. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-10-0884>
- Freund, A., Patil, C. K., & Campisi, J. (2011). p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype: P38 regulates the senescence secretory phenotype. *The EMBO Journal*, *30*(8), 1536-1548. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.69>

- Fujii, M., Kawai, Y., Endoh, M., Hossain, M. N., Nakabayashi, K., & Ayusawa, D. (2006). Expression of RAB27B is up-regulated in senescent human cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, *127*(7), 639-642. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.03.001>
- Fulzele, S., Mendhe, B., Khayrullin, A., Johnson, M., Kaiser, H., Liu, Y., Isales, C. M., & Hamrick, M. W. (2019). Muscle-derived miR-34a increases with age in circulating extracellular vesicles and induces senescence of bone marrow stem cells. *Aging*, *11*(6), 1791-1803. <https://doi.org/10.18632/aging.101874>
- Gardner, S. E., Humphry, M., Bennett, M. R., & Clarke, M. C. H. (2015). Senescent Vascular Smooth Muscle Cells Drive Inflammation Through an Interleukin-1 α -Dependent Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *35*(9), 1963-1974. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305896>
- Glück, S., Guey, B., Gulen, M. F., Wolter, K., Kang, T.-W., Schmacke, N. A., Bridgeman, A., Rehwinkel, J., Zender, L., & Ablasser, A. (2017). Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nature Cell Biology*, *19*(9), 1061-1070. <https://doi.org/10.1038/ncb3586>
- Goñi, F. M., & Alonso, A. (2009). Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure. *Lipid Interactions, Domain Formation, and Lateral Structure of Membranes*, *1788*(1), 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.09.002>
- Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovskiy, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., ... Demaria, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, *179*(4), 813-827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. En *Journal of General Virology* (Vol. 36, Número 1, pp. 59-72). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>
- Gu, C., Yaddanapudi, S., Weins, A., Osborn, T., Reiser, J., Pollak, M., Hartwig, J., & Sever, S. (2010). Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *The EMBO Journal*, *29*(21), 3593-3606. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.249>
- Guan, X., LaPak, K. M., Hennessey, R. C., Yu, C. Y., Shakya, R., Zhang, J., & Burd, C. E. (2017). Stromal Senescence By Prolonged CDK4/6 Inhibition Potentiates Tumor Growth. *Molecular Cancer Research*, *15*(3), 237-249. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0319>
- Guccini, I., Revandkar, A., D'Ambrosio, M., Colucci, M., Pasquini, E., Mosole, S., Troiani, M., Brina, D., Sheibani-Tezerji, R., Elia, A. R., Rinaldi, A., Pernigoni, N., Rüschoff, J. H., Dettwiler, S., De Marzo, A. M., Antonarakis, E. S., Borrelli, C., Moor, A. E., Garcia-Escudero, R., ... Alimonti, A. (2021). Senescence Reprogramming by TIMP1

Deficiency Promotes Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Cell*, 39(1), 68-82.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.10.012>

Gulen, M. F., Samson, N., Keller, A., Schwabenland, M., Liu, C., Glück, S., Thacker, V. V., Favre, L., Mangeat, B., Kroese, L. J., Krimpenfort, P., Prinz, M., & Ablasser, A. (2023). cGAS–STING drives ageing-related inflammation and neurodegeneration. *Nature*, 620(7973), 374-380. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06373-1>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

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

Hartman, Z. C., Poage, G. M., den Hollander, P., Tsimelzon, A., Hill, J., Panupinthu, N., Zhang, Y., Mazumdar, A., Hilsenbeck, S. G., Mills, G. B., & Brown, P. H. (2013). Growth of Triple-Negative Breast Cancer Cells Relies upon Coordinate Autocrine Expression of the Proinflammatory Cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer Research*, 73(11), 3470-3480. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4524-T>

Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585-621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)

Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*, 28(6), 436-453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>

Herranz, N., Gallage, S., Mellone, M., Wuestefeld, T., Klotz, S., Hanley, C. J., Raguz, S., Acosta, J. C., Innes, A. J., Banito, A., Georgilis, A., Montoya, A., Wolter, K., Dharmalingam, G., Faull, P., Carroll, T., Martínez-Barbera, J. P., Cutillas, P., Reisinger, F., ... Gil, J. (2015). mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nature Cell Biology*, 17(9), 1205-1217. <https://doi.org/10.1038/ncb3225>

Hettinger, Z. R., Kargl, C. K., Shannahan, J. H., Kuang, S., & Gavin, T. P. (2021). Extracellular vesicles released from stress-induced prematurely senescent myoblasts impair endothelial function and proliferation. *Experimental Physiology*, 106(10), 2083-2095. <https://doi.org/10.1113/EP089423>

Hoare, M., Ito, Y., Kang, T.-W., Weekes, M. P., Matheson, N. J., Patten, D. A., Shetty, S., Parry, A. J., Menon, S., Salama, R., Antrobus, R., Tomimatsu, K., Howat, W., Lehner, P. J., Zender, L., & Narita, M. (2016). NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nature Cell Biology*, 18(9), 979-992. <https://doi.org/10.1038/ncb3397>

Höhn, A., Weber, D., Jung, T., Ott, C., Hugo, M., Kochlik, B., Kehm, R., König, J., Grune, T., & Castro, J. P. (2017). Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biology*, 11, 482-501. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.001>

- Hood, R. R., DeVoe, D. L., Atencia, J., Vreeland, W. N., & Omiatek, D. M. (2014). A facile route to the synthesis of monodisperse nanoscale liposomes using 3D microfluidic hydrodynamic focusing in a concentric capillary array. *Lab on a Chip*, 14(14), 2403-2409. <https://doi.org/10.1039/C4LC00334A>
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplod, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., ... Lyden, D. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527(7578), 329-335. <https://doi.org/10.1038/nature15756>
- Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M. A., Bakhti, M., Grønberg, M., Möbius, W., Rhee, J., Barr, F. A., & Simons, M. (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A–C. *Journal of Cell Biology*, 189(2), 223-232. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911018>
- Hurley, J. H. (2008). ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Cell structure and dynamics*, 20(1), 4-11. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.12.002>
- Irion, U., & St Johnston, D. (2007). Bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex. *Nature*, 445(7127), 554-558. <https://doi.org/10.1038/nature05503>
- Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., van Tuyn, J., Nelson, D. M., Rai, T. S., Shah, P. P., Hewitt, G., Korolchuk, V. I., Passos, J. F., Wu, H., Berger, S. L., & Adams, P. D. (2013). Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *Journal of Cell Biology*, 202(1), 129-143. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212110>
- Jahn, R., & Scheller, R. H. (2006). SNAREs—Engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(9), 631-643. <https://doi.org/10.1038/nrm2002>
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, 262(19), 9412-9420. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)48095-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48095-7)
- Jurgielewicz, B. J., Yao, Y., & Stice, S. L. (2020). Kinetics and Specificity of HEK293T Extracellular Vesicle Uptake using Imaging Flow Cytometry. *Nanoscale Research Letters*, 15(1), 170. <https://doi.org/10.1186/s11671-020-03399-6>
- Kahlert, C., Melo, S. A., Protopopov, A., Tang, J., Seth, S., Koch, M., Zhang, J., Weitz, J., Chin, L., Futreal, A., & Kalluri, R. (2014). Identification of Double-stranded Genomic DNA Spanning All Chromosomes with Mutated KRAS and p53 DNA in the Serum Exosomes of Patients with Pancreatic Cancer *. *Journal of Biological Chemistry*, 289(7), 3869-3875. <https://doi.org/10.1074/jbc.C113.532267>

- Kajimoto, T., Okada, T., Miya, S., Zhang, L., & Nakamura, S. (2013). Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nature Communications*, 4(1), 2712. <https://doi.org/10.1038/ncomms3712>
- Kamerkar, S., LeBleu, V. S., Sugimoto, H., Yang, S., Ruivo, C. F., Melo, S. A., Lee, J. J., & Kalluri, R. (2017). Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*, 546(7659), 498-503. <https://doi.org/10.1038/nature22341>
- Kang, C., Xu, Q., Martin, T. D., Li, M. Z., Demaria, M., Aron, L., Lu, T., Yankner, B. A., Campisi, J., & Elledge, S. J. (2015). The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science*, 349(6255), aaa5612. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5612>
- Kaplon, J., Zheng, L., Meissl, K., Chaneton, B., Selivanov, V. A., Mackay, G., van der Burg, S. H., Verdegaal, E. M. E., Cascante, M., Shlomi, T., Gottlieb, E., & Peeper, D. S. (2013). A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature*, 498(7452), 109-112. <https://doi.org/10.1038/nature12154>
- Karimi, N., Cvjetkovic, A., Jang, S. C., Crescitelli, R., Hosseinpour Feizi, M. A., Nieuwland, R., Lötvall, J., & Lässer, C. (2018). Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after separation from lipoproteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(15), 2873-2886. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2773-4>
- Kastenhuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell*, 170(6), 1062-1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2015). Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nature Cell Biology*, 17(6), 759-770. <https://doi.org/10.1038/ncb3166>
- Kavanagh, E. L., Lindsay, S., Halasz, M., Gubbins, L. C., Weiner-Gorzal, K., Guang, M. H. Z., McGoldrick, A., Collins, E., Henry, M., Blanco-Fernández, A., O’Gorman, P., Fitzpatrick, P., Higgins, M. J., Dowling, P., & McCann, A. (2017). Protein and chemotherapy profiling of extracellular vesicles harvested from therapeutic induced senescent triple negative breast cancer cells. *Oncogenesis*, 6(10), e388-e388. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.82>
- Kerr, M. C., & Teasdale, R. D. (2009). Defining Macropinocytosis. *Traffic*, 10(4), 364-371. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00878.x>
- Kim, Y. H., Choi, Y. W., Lee, J., Soh, E. Y., Kim, J.-H., & Park, T. J. (2017). Senescent tumor cells lead the collective invasion in thyroid cancer. *Nature Communications*, 8(1), 15208. <https://doi.org/10.1038/ncomms15208>
- Kirchhausen, T. (2000). Clathrin. En *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 69, Número Volume 69, 2000, pp. 699-727). Annual Reviews. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.699>
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., & Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers

- to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(8), E968-E977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M. R., Kovalev, G. I., Al-Regaiey, K., Su, L., & Sharpless, N. E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *Journal of Clinical Investigation*, *114*(9), 1299-1307. <https://doi.org/10.1172/JCI22475>
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.-Y., & Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(21), 12072-12077. <https://doi.org/10.1073/pnas.211053698>
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C. J., Aarden, L. A., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2008). Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell*, *133*(6), 1019-1031. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.039>
- Kurzchalia, T. V., & Partan, R. G. (1999). Membrane microdomains and caveolae. *Current Opinion in Cell Biology*, *11*(4), 424-431. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)80061-1](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80061-1)
- Laberge, R.-M., Sun, Y., Orjalo, A. V., Patil, C. K., Freund, A., Zhou, L., Curran, S. C., Davalos, A. R., Wilson-Edell, K. A., Liu, S., Limbad, C., Demaria, M., Li, P., Hubbard, G. B., Ikeno, Y., Javors, M., Desprez, P.-Y., Benz, C. C., Kapahi, P., ... Campisi, J. (2015). MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nature Cell Biology*, *17*(8), 1049-1061. <https://doi.org/10.1038/ncb3195>
- Laulagnier, K., Javalet, C., Hemming, F. J., Chivet, M., Lachenal, G., Blot, B., Chatellard, C., & Sadoul, R. (2018). Amyloid precursor protein products concentrate in a subset of exosomes specifically endocytosed by neurons. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(4), 757-773. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2664-0>
- Lawrenson, K., Grun, B., Benjamin, E., Jacobs, I. J., Dafou, D., & Gayther, S. A. (2010). Senescent Fibroblasts Promote Neoplastic Transformation of Partially Transformed Ovarian Epithelial Cells in a Three-dimensional Model of Early Stage Ovarian Cancer. *Neoplasia*, *12*(4), 317-IN3. <https://doi.org/10.1593/neo.91948>
- Lederle, W., Depner, S., Schnur, S., Obermueller, E., Catone, N., Just, A., Fusenig, N. E., & Mueller, M. M. (2011). IL-6 promotes malignant growth of skin SCCs by regulating a network of autocrine and paracrine cytokines. *International Journal of Cancer*, *128*(12), 2803-2814. <https://doi.org/10.1002/ijc.25621>
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*, *5*(2), 187-195. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>

- Lehmann, B. D., Paine, M. S., Brooks, A. M., McCubrey, J. A., Renegar, R. H., Wang, R., & Terrian, D. M. (2008). Senescence-Associated Exosome Release from Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 68(19), 7864-7871. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6538>
- Lespagnol, A., Duflaut, D., Beekman, C., Blanc, L., Fiucci, G., Marine, J.-C., Vidal, M., Amson, R., & Telerman, A. (2008). Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. *Cell Death & Differentiation*, 15(11), 1723-1733. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.104>
- Li, T., & Chen, Z. J. (2018). The cGAS–cGAMP–STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer. *Journal of Experimental Medicine*, 215(5), 1287-1299. <https://doi.org/10.1084/jem.20180139>
- Lin, A. W., Barradas, M., Stone, J. C., Aelst, L. van, Serrano, M., & Lowe, S. W. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes & Development*, 12(19), 3008-3019. <https://doi.org/10.1101/gad.12.19.3008>
- Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Arraud, N., & Brisson, A. R. (2015). High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 29509. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.29509>
- Liu, D., & Hornsby, P. J. (2007). Senescent Human Fibroblasts Increase the Early Growth of Xenograft Tumors via Matrix Metalloproteinase Secretion. *Cancer Research*, 67(7), 3117-3126. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3452>
- Llanos, S., García-Pedrero, J. M., Morgado-Palacin, L., Rodrigo, J. P., & Serrano, M. (2016). Stabilization of p21 by mTORC1/4E-BP1 predicts clinical outcome of head and neck cancers. *Nature Communications*, 7(1), 10438. <https://doi.org/10.1038/ncomms10438>
- Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J., & Baltimore, D. (2002). Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors. *Science*, 295(5556), 868-872. <https://doi.org/10.1126/science.1067081>
- López-Polo, V., Maus, M., Zacharioudakis, E., Lafarga, M., Attolini, C. S.-O., Marques, F. D. M., Kovatcheva, M., Gavathiotis, E., & Serrano, M. (2024). Release of mitochondrial dsRNA into the cytosol is a key driver of the inflammatory phenotype of senescent cells. *Nature Communications*, 15(1), 7378. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51363-0>
- Lowe, S. W., Cepero, E., & Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432(7015), 307-315. <https://doi.org/10.1038/nature03098>
- Lujambio, A., Akkari, L., Simon, J., Grace, D., Tschaharganeh, D. F., Bolden, J. E., Zhao, Z., Thapar, V., Joyce, J. A., Krizhanovsky, V., & Lowe, S. W. (2013). Non-Cell-Autonomous Tumor Suppression by p53. *Cell*, 153(2), 449-460. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.020>

- Luo, X., Fu, Y., Loza, A. J., Murali, B., Leahy, K. M., Ruhland, M. K., Gang, M., Su, X., Zamani, A., Shi, Y., Lavine, K. J., Ornitz, D. M., Weilbaecher, K. N., Long, F., Novack, D. V., Faccio, R., Longmore, G. D., & Stewart, S. A. (2016). Stromal-Initiated Changes in the Bone Promote Metastatic Niche Development. *Cell Reports*, *14*(1), 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.016>
- Luo, X., Ruhland, M. K., Pazolli, E., Lind, A. C., & Stewart, S. A. (2011). Osteopontin Stimulates Preneoplastic Cellular Proliferation Through Activation of the MAPK Pathway. *Molecular Cancer Research*, *9*(8), 1018-1029. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0472>
- Malaquin, N., Vercamer, C., Bouali, F., Martien, S., Deruy, E., Wernert, N., Chwastyniak, M., Pinet, F., Abbadie, C., & Pourtier, A. (2013). Senescent Fibroblasts Enhance Early Skin Carcinogenic Events via a Paracrine MMP-PAR-1 Axis. *PLOS ONE*, *8*(5), e63607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063607>
- Manohar, S., & Neurohr, G. E. (2024). Too big not to fail: Emerging evidence for size-induced senescence. *The FEBS Journal*, *291*(11), 2291-2305. <https://doi.org/10.1111/febs.16983>
- Mathieu, M., Névo, N., Jouve, M., Valenzuela, J. I., Maurin, M., Verweij, F. J., Palmulli, R., Lankar, D., Dingli, F., Loew, D., Rubinstein, E., Boncompain, G., Perez, F., & Théry, C. (2021). Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nature Communications*, *12*(1), 4389. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24384-2>
- Matsumoto, A., Takahashi, Y., Nishikawa, M., Sano, K., Morishita, M., Charoenviriyakul, C., Saji, H., & Takakura, Y. (2017). Accelerated growth of B16BL6 tumor in mice through efficient uptake of their own exosomes by B16BL6 cells. *Cancer Science*, *108*(9), 1803-1810. <https://doi.org/10.1111/cas.13310>
- Mauvezin, C., & Neufeld, T. P. (2015). Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, *11*(8), 1437-1438. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1066957>
- Mensà, E., Guescini, M., Giuliani, A., Bacalini, M. G., Ramini, D., Corleone, G., Ferracin, M., Fulgenzi, G., Graciotti, L., Praticchizzo, F., Sorci, L., Battistelli, M., Monsurrò, V., Bonfigli, A. R., Cardelli, M., Recchioni, R., Marcheselli, F., Latini, S., Maggio, S., ... Olivieri, F. (2020). Small extracellular vesicles deliver miR-21 and miR-217 as pro-senescence effectors to endothelial cells. *Journal of Extracellular Vesicles*, *9*(1), 1725285. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1725285>
- Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C. M. A. M., Majoor, D. M., Shay, J. W., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, *436*(7051), 720-724. <https://doi.org/10.1038/nature03890>

- Möbius, W., Van Donselaar, E., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Heijnen, H. F. G., Slot, J. W., & Geuze, H. J. (2003). Recycling Compartments and the Internal Vesicles of Multivesicular Bodies Harbor Most of the Cholesterol Found in the Endocytic Pathway: **Cholesterol in the Endocytic Pathway**. *Traffic*, 4(4), 222-231. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00072.x>
- Montecalvo, A., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Beer Stolz, D., Sullivan, M. L. G., Karlsson, J. M., Baty, C. J., Gibson, G. A., Erdos, G., Wang, Z., Milosevic, J., Tkacheva, O. A., Divito, S. J., Jordan, R., Lyons-Weiler, J., Watkins, S. C., & Morelli, A. E. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*, 119(3), 756-766. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-338004>
- Morelli, A. E., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Sullivan, M. L. G., Stolz, D. B., Papworth, G. D., Zahorchak, A. F., Logar, A. J., Wang, Z., Watkins, S. C., Falo, L. D., Jr, & Thomson, A. W. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, 104(10), 3257-3266. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0824>
- Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1), 24641. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>
- Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., & Serrano, M. (2013). Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell*, 155(5), 1104-1118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019>
- Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(7), 482-496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>
- Nabi, I. R., & Le, P. U. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *Journal of Cell Biology*, 161(4), 673-677. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302028>
- Nanbo, A., Kawanishi, E., Yoshida, R., & Yoshiyama, H. (2013). Exosomes Derived from Epstein-Barr Virus-Infected Cells Are Internalized via Caveola-Dependent Endocytosis and Promote Phenotypic Modulation in Target Cells. *Journal of Virology*, 87(18), 10334-10347. <https://doi.org/10.1128/JVI.01310-13>
- Näslund, T. I., Paquin-Proulx, D., Paredes, P. T., Vallhov, H., Sandberg, J. K., & Gabrielsson, S. (2014). Exosomes from breast milk inhibit HIV-1 infection of dendritic cells and subsequent viral transfer to CD4+ T cells. *AIDS*, 28(2). https://journals.lww.com/aidsonline/fulltext/2014/01140/exosomes_from_breast_milk_inhibit_hiv_1_infection.3.aspx
- Naviaux R K, Costanzi E, Haas M, & Verma I M. (1996). The pCL vector system: Rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *Journal of Virology*, 70(8), 5701-5705. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.8.5701-5705.1996>

- Nazarenko, I., Rana, S., Baumann, A., McAlear, J., Hellwig, A., Trendelenburg, M., Lochnit, G., Preissner, K. T., & Zöller, M. (2010). Cell Surface Tetraspanin Tspan8 Contributes to Molecular Pathways of Exosome-Induced Endothelial Cell Activation. *Cancer Research*, *70*(4), 1668-1678. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2470>
- Nehme, J., Yang, D., Altulea, A., Varela-Eirin, M., Wang, L., Hu, S., Wu, Y., Togo, J., Niu, C., Speakman, J. R., & Demaria, M. (2023). High dietary protein and fat contents exacerbate hepatic senescence and SASP in mice. *The FEBS Journal*, *290*(5), 1340-1347. <https://doi.org/10.1111/febs.16292>
- Nelson, G., Kucheryavenko, O., Wordsworth, J., & von Zglinicki, T. (2018). The senescent bystander effect is caused by ROS-activated NF- κ B signalling. *Stress and Senescence: A Special Issue dedicated to Dr. Olivier Toussaint*, *170*, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.08.005>
- Nelson, G., Wordsworth, J., Wang, C., Jurk, D., Lawless, C., Martin-Ruiz, C., & von Zglinicki, T. (2012). A senescent cell bystander effect: Senescence-induced senescence. *Aging Cell*, *11*(2), 345-349. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00795.x>
- Neurohr, G. E., Terry, R. L., Lengfeld, J., Bonney, M., Brittingham, G. P., Moretto, F., Miettinen, T. P., Vaites, L. P., Soares, L. M., Paulo, J. A., Harper, J. W., Buratowski, S., Manalis, S., van Werven, F. J., Holt, L. J., & Amon, A. (2019). Excessive Cell Growth Causes Cytoplasm Dilution And Contributes to Senescence. *Cell*, *176*(5), 1083-1097.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.018>
- Nolte-'t Hoen, E. N. M., Buermans, H. P. J., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M. H. M., & 't Hoen, P. A. C. (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Research*, *40*(18), 9272-9285. <https://doi.org/10.1093/nar/gks658>
- Nyström, T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO Journal*, *24*(7), 1311-1317. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600599>
- Omer, A., Barrera, M. C., Moran, J. L., Lian, X. J., Di Marco, S., Beausejour, C., & Gallouzi, I.-E. (2020). G3BP1 controls the senescence-associated secretome and its impact on cancer progression. *Nature Communications*, *11*(1), 4979. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18734-9>
- Orjalo, A. V., Bhaumik, D., Gengler, B. K., Scott, G. K., & Campisi, J. (2009). Cell surface-bound IL-1 α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(40), 17031-17036. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905299106>
- Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C. F., Schauer, K., Hume, A. N., Freitas, R. P., Goud, B., Benaroch, P., Hacothen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M. C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L. F., & Thery, C. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology*, *12*(1), 19-30. <https://doi.org/10.1038/ncb2000>

- Özcan, S., Alessio, N., Acar, M. B. B., Mert, E., Omerli, F., Peluso, G., & Galderisi, U. (2016). Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. *Aging*, *8*(7), 1316-1327. <https://doi.org/10.18632/aging.100971>
- Pan, Q., Ramakrishnaiah, V., Henry, S., Fouraschen, S., de Ruiter, P. E., Kwekkeboom, J., Tilanus, H. W., Janssen, H. L. A., & van der Laan, L. J. W. (2012). Hepatic cell-to-cell transmission of small silencing RNA can extend the therapeutic reach of RNA interference (RNAi). *Gut*, *61*(9), 1330. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300449>
- Park, J. T., Lee, Y.-S., Cho, K. A., & Park, S. C. (2018). Adjustment of the lysosomal-mitochondrial axis for control of cellular senescence. *Ageing Research Reviews*, *47*, 176-182. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.08.003>
- Parton, R. G., & Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(3), 185-194. <https://doi.org/10.1038/nrm2122>
- Passos, J. F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C. J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., Saretzki, G., Rudolph, K. L., Kirkwood, T. B. L., & von Zglinicki, T. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Molecular Systems Biology*, *6*(1), 347. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.5>
- Passos, J. F., Saretzki, G., Ahmed, S., Nelson, G., Richter, T., Peters, H., Wappler, I., Birket, M. J., Harold, G., Schaeuble, K., Birch-Machin, M. A., Kirkwood, T. B. L., & Von Zglinicki, T. (2007). Mitochondrial Dysfunction Accounts for the Stochastic Heterogeneity in Telomere-Dependent Senescence. *PLoS Biology*, *5*(5), e110. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050110>
- Pazolli, E., Luo, X., Brehm, S., Carbery, K., Chung, J.-J., Prior, J. L., Doherty, J., Demehri, S., Salavaggione, L., Piwnica-Worms, D., & Stewart, S. A. (2009). Senescent Stromal-Derived Osteopontin Promotes Preneoplastic Cell Growth. *Cancer Research*, *69*(3), 1230-1239. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2970>
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liégeois, N. J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.-W., Cordon-Cardo, C., & DePinho, R. A. (1998). The Ink4a Tumor Suppressor Gene Product, p19Arf, Interacts with MDM2 and Neutralizes MDM2's Inhibition of p53. *Cell*, *92*(6), 713-723. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81400-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81400-2)
- Ragni, E., Perucca Orfei, C., De Luca, P., Lugano, G., Viganò, M., Colombini, A., Valli, F., Zacchetti, D., Bollati, V., & de Girolamo, L. (2019). Interaction with hyaluronan matrix and miRNA cargo as contributors for in vitro potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of human osteoarthritic synoviocytes. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1215-z>
- Rakhra, K., Bachireddy, P., Zabuawala, T., Zeiser, R., Xu, L., Kopelman, A., Fan, A. C., Yang, Q., Braunstein, L., Crosby, E., Ryeom, S., & Felsher, D. W. (2010). CD4+ T Cells Contribute to the Remodeling of the Microenvironment Required for Sustained Tumor

- Regression upon Oncogene Inactivation. *Cancer Cell*, 18(5), 485-498. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.002>
- Rana, S., Claas, C., Kretz, C. C., Nazarenko, I., & Zoeller, M. (2011). Activation-induced internalization differs for the tetraspanins CD9 and Tspan8: Impact on tumor cell motility. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(1), 106-119. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.10.002>
- Rana, S., Yue, S., Stadel, D., & Zöller, M. (2012). Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(9), 1574-1584. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.06.018>
- Raver-Shapira, N., Marciano, E., Meiri, E., Spector, Y., Rosenfeld, N., Moskovits, N., Bentwich, Z., & Oren, M. (2007). Transcriptional Activation of miR-34a Contributes to p53-Mediated Apoptosis. *Molecular Cell*, 26(5), 731-743. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.017>
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., Scaravilli, F., Easton, D. F., Duden, R., O’Kane, C. J., & Rubinsztein, D. C. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature Genetics*, 36(6), 585-595. <https://doi.org/10.1038/ng1362>
- Rennick, J. J., Johnston, A. P. R., & Parton, R. G. (2021). Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics. *Nature Nanotechnology*, 16(3), 266-276. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00858-8>
- Robbins, E., Levine, E. M., & Eagle, H. (1970). MORPHOLOGIC CHANGES ACCOMPANYING SENESCENCE OF CULTURED HUMAN DIPLOID CELLS. *Journal of Experimental Medicine*, 131(6), 1211-1222. <https://doi.org/10.1084/jem.131.6.1211>
- Rocha, N., Kuijl, C., van der Kant, R., Janssen, L., Houben, D., Janssen, H., Zwart, W., & Neefjes, J. (2009). Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150Glued and late endosome positioning. *Journal of Cell Biology*, 185(7), 1209-1225. <https://doi.org/10.1083/jcb.200811005>
- Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A. M., Muñoz, D. P., Raza, S. R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. R., & Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature Cell Biology*, 11(8), 973-979. <https://doi.org/10.1038/ncb1909>
- Rodier, F., Muñoz, D. P., Teachenor, R., Chu, V., Le, O., Bhaumik, D., Coppé, J.-P., Campeau, E., Beauséjour, C. M., Kim, S.-H., Davalos, A. R., & Campisi, J. (2011). DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *Journal of Cell Science*, 124(1), 68-81. <https://doi.org/10.1242/jcs.071340>

- Rojas, A., Liu, G., Coleman, I., Nelson, P. S., Zhang, M., Dash, R., Fisher, P. B., Plymate, S. R., & Wu, J. D. (2011). IL-6 promotes prostate tumorigenesis and progression through autocrine cross-activation of IGF-IR. *Oncogene*, *30*(20), 2345-2355. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.605>
- Ruscetti, M., Leibold, J., Bott, M. J., Fennell, M., Kulick, A., Salgado, N. R., Chen, C.-C., Ho, Y., Sanchez-Rivera, F. J., Feucht, J., Baslan, T., Tian, S., Chen, H.-A., Romesser, P. B., Poirier, J. T., Rudin, C. M., de Stanchina, E., Manchado, E., Sherr, C. J., & Lowe, S. W. (2018). NK cell-mediated cytotoxicity contributes to tumor control by a cytostatic drug combination. *Science*, *362*(6421), 1416-1422. <https://doi.org/10.1126/science.aas9090>
- Russo, A. A., Tong, L., Lee, J.-O., Jeffrey, P. D., & Pavletich, N. P. (1998). Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature*, *395*(6699), 237-243. <https://doi.org/10.1038/26155>
- Sagiv, A., Burton, D. G. A., Moshayev, Z., Vadai, E., Wensveen, F., Ben-Dor, S., Golani, O., Polic, B., & Krizhanovsky, V. (2016). NKG2D ligands mediate immunosurveillance of senescent cells. *Aging*, *8*(2), 328-344. <https://doi.org/10.18632/aging.100897>
- Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., & Narita, M. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes & Development*, *28*(2), 99-114. <https://doi.org/10.1101/gad.235184.113>
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science*, *307*(5712), 1098-1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>
- Savina, A., Furlán, M., Vidal, M., & Colombo, M. I. (2003). Exosome Release Is Regulated by a Calcium-dependent Mechanism in K562 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(22), 20083-20090. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301642200>
- Schmitt, C. A., Fridman, J. S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R. M., & Lowe, S. W. (2002). A Senescence Program Controlled by p53 and p16INK4a Contributes to the Outcome of Cancer Therapy. *Cell*, *109*(3), 335-346. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00734-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00734-1)
- Schmitt, C. A., Wang, B., & Demaria, M. (2022). Senescence and cancer—Role and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *19*(10), 619-636. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00668-4>
- 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*(5), 593-602. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81902-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81902-9)
- Shao, L., Feng, W., Li, H., Gardner, D., Luo, Y., Wang, Y., Liu, L., Meng, A., Sharpless, N. E., & Zhou, D. (2014). Total body irradiation causes long-term mouse BM injury via induction of HSC premature senescence in an Ink4a- and Arf-independent manner. *Blood*, *123*(20), 3105-3115. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-515619>

- Sharpless, N. E. (2005). INK4a/ARF: A multifunctional tumor suppressor locus. *The Utility of Genetically Altered Mouse Models for Cancer Research*, 576(1), 22-38. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.08.021>
- Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer*, 15(7), 397-408. <https://doi.org/10.1038/nrc3960>
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2019). Telomeres and telomerase: Three decades of progress. *Nature Reviews Genetics*, 20(5), 299-309. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0099-1>
- Sinha, S., Hoshino, D., Hong, N. H., Kirkbride, K. C., Grega-Larson, N. E., Seiki, M., Tyska, M. J., & Weaver, A. M. (2016). Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *Journal of Cell Biology*, 214(2), 197-213. <https://doi.org/10.1083/jcb.201601025>
- Sitar, S., Kejžar, A., Pahovnik, D., Kogej, K., Tušek-Žnidarič, M., Lenassi, M., & Žagar, E. (2015). Size Characterization and Quantification of Exosomes by Asymmetrical-Flow Field-Flow Fractionation. *Analytical Chemistry*, 87(18), 9225-9233. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01636>
- Somiya, M., & Kuroda, S. (2021). Reporter gene assay for membrane fusion of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(13). <https://doi.org/10.1002/jev2.12171>
- Somiya, M., & Kuroda, S. (2022). Verification of extracellular vesicle-mediated functional mRNA delivery via RNA editing [Preprint]. *Cell Biology*. <https://doi.org/10.1101/2022.01.25.477620>
- Song, L., Rawal, B., Nemeth, J. A., & Haura, E. B. (2011). JAK1 Activates STAT3 Activity in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells and IL-6 Neutralizing Antibodies Can Suppress JAK1-STAT3 Signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(3), 481-494. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0502>
- Song, P., Trajkovic, K., Tsunemi, T., & Krainc, D. (2016). Parkin Modulates Endosomal Organization and Function of the Endo-Lysosomal Pathway. *The Journal of Neuroscience*, 36(8), 2425. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2569-15.2016>
- Soriani, A., Zingoni, A., Cerboni, C., Iannitto, M. L., Ricciardi, M. R., Di Gialleonardo, V., Cippitelli, M., Fionda, C., Petrucci, M. T., Guarini, A., Foà, R., & Santoni, A. (2009). ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood*, 113(15), 3503-3511. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-173914>
- Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., & Brech, A. (2009). Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs. *Traffic*, 10(7), 925-937. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x>
- Svensson, K. J., Christianson, H. C., Wittrup, A., Bourseau-Guilmain, E., Lindqvist, E., Svensson, L. M., Mörgelin, M., & Belting, M. (2013). Exosome Uptake Depends on ERK1/2-Heat Shock Protein 27 Signaling and Lipid Raft-mediated Endocytosis

Negatively Regulated by Caveolin-1 *. *Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17713-17724. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445403>

Takahashi, A., Loo, T. M., Okada, R., Kamachi, F., Watanabe, Y., Wakita, M., Watanabe, S., Kawamoto, S., Miyata, K., Barber, G. N., Ohtani, N., & Hara, E. (2018). Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nature Communications*, 9(1), 1249. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03555-8>

Takahashi, A., Okada, R., Nagao, K., Kawamata, Y., Hanyu, A., Yoshimoto, S., Takasugi, M., Watanabe, S., Kanemaki, M. T., Obuse, C., & Hara, E. (2017). Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nature Communications*, 8(1), 15287. <https://doi.org/10.1038/ncomms15287>

Takai, H., Smogorzewska, A., & de Lange, T. (2003). DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres. *Current Biology*, 13(17), 1549-1556. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00542-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00542-6)

Takasugi, M., Okada, R., Takahashi, A., Virya Chen, D., Watanabe, S., & Hara, E. (2017). Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nature Communications*, 8(1), 15729. <https://doi.org/10.1038/ncomms15728>

Tasdemir, N., Banito, A., Roe, J.-S., Alonso-Curbelo, D., Camiolo, M., Tschaharganeh, D. F., Huang, C.-H., Aksoy, O., Bolden, J. E., Chen, C.-C., Fennell, M., Thapar, V., Chicas, A., Vakoc, C. R., & Lowe, S. W. (2016). BRD4 Connects Enhancer Remodeling to Senescence Immune Surveillance. *Cancer Discovery*, 6(6), 612-629. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0217>

Temchura, V. V., Tenbusch, M., Nchinda, G., Nabi, G., Tippler, B., Zelenyuk, M., Wildner, O., Überla, K., & Kuate, S. (2008). Enhancement of immunostimulatory properties of exosomal vaccines by incorporation of fusion-competent G protein of vesicular stomatitis virus. *Vaccine*, 26(29), 3662-3672. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.069>

Teo, Y. V., Rattanavirotkul, N., Olova, N., Salzano, A., Quintanilla, A., Tarrats, N., Kiourtis, C., Müller, M., Green, A. R., Adams, P. D., Acosta, J.-C., Bird, T. G., Kirschner, K., Neretti, N., & Chandra, T. (2019). Notch Signaling Mediates Secondary Senescence. *Cell Reports*, 27(4), 997-1007.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.104>

Terlecki-Zaniewicz, L., Lämmermann, I., Latreille, J., Bobbili, M. R., Pils, V., Schosserer, M., Weinmüllner, R., Dellago, H., Skalicky, S., Pum, D., Almaraz, J. C. H., Scheideler, M., Morizot, F., Hackl, M., Gruber, F., & Grillari, J. (2018). Small extracellular vesicles and their miRNA cargo are anti-apoptotic members of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging*, 10(5), 1103-1132. <https://doi.org/10.18632/aging.101452>

Thakur, B. K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., Williams, C., Rodriguez-Barrueco, R., Silva, J. M., Zhang, W., Hearn, S., Elemento, O., Paknejad, N., Manova-Todorova, K., Welte, K., ... Lyden,

- D. (2014). Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection. *Cell Research*, 24(6), 766-769. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.44>
- Theos, A. C., Truschel, S. T., Tenza, D., Hurbain, I., Harper, D. C., Berson, J. F., Thomas, P. C., Raposo, G., & Marks, M. S. (2006). A Luminal Domain-Dependent Pathway for Sorting to Intraluminal Vesicles of Multivesicular Endosomes Involved in Organelle Morphogenesis. *Developmental Cell*, 10(3), 343-354. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.01.012>
- Tian, T., Zhu, Y.-L., Hu, F.-H., Wang, Y.-Y., Huang, N.-P., & Xiao, Z.-D. (2013). Dynamics of exosome internalization and trafficking. *Journal of Cellular Physiology*, 228(7), 1487-1495. <https://doi.org/10.1002/jcp.24304>
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008). Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science*, 319(5867), 1244-1247. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654-659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213-228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- van Vliet, T., Varela-Eirin, M., Wang, B., Borghesan, M., Brandenburg, S. M., Franzin, R., Evangelou, K., Seelen, M., Gorgoulis, V., & Demaria, M. (2021). Physiological hypoxia restrains the senescence-associated secretory phenotype via AMPK-mediated mTOR suppression. *Molecular Cell*, 81(9), 2041-2052.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.03.018>
- van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M. S., Rubinstein, E., & Raposo, G. (2011). The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Developmental Cell*, 21(4), 708-721. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.019>
- Vanpouille-Box, C., Alard, A., Aryankalayil, M. J., Sarfraz, Y., Diamond, J. M., Schneider, R. J., Inghirami, G., Coleman, C. N., Formenti, S. C., & Demaria, S. (2017). DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nature Communications*, 8(1), 15618. <https://doi.org/10.1038/ncomms15618>
- Veerman, R. E., Teeuwen, L., Czarnewski, P., Güclüler Akpınar, G., Sandberg, A., Cao, X., Pernemalm, M., Orre, L. M., Gabrielsson, S., & Eldh, M. (2021). Molecular evaluation of five different isolation methods for extracellular vesicles reveals different clinical applicability and subcellular origin. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(9), e12128. <https://doi.org/10.1002/jev2.12128>

- Victorelli, S., Salmonowicz, H., Chapman, J., Martini, H., Vizioli, M. G., Riley, J. S., Cloix, C., Hall-Younger, E., Machado Espindola-Netto, J., Jurk, D., Lagnado, A. B., Sales Gomez, L., Farr, J. N., Saul, D., Reed, R., Kelly, G., Eppard, M., Greaves, L. C., Dou, Z., ... Passos, J. F. (2023). Apoptotic stress causes mtDNA release during senescence and drives the SASP. *Nature*, *622*(7983), 627-636. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06621-4>
- Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Madrid, F., & Mittelbrunn, M. (2014). Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Seminars in Cancer Biology*, *28*, 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.04.009>
- Wallis, R., Josipovic, N., Mizen, H., Robles-Tenorio, A., Tyler, E. J., Papantonis, A., & Bishop, C. L. (2021). Isolation methodology is essential to the evaluation of the extracellular vesicle component of the senescence-associated secretory phenotype. *Journal of Extracellular Vesicles*, *10*(4). <https://doi.org/10.1002/jev2.12041>
- Wang, B., Varela-Eirin, M., Brandenburg, S. M., Hernandez-Segura, A., van Vliet, T., Jongbloed, E. M., Wilting, S. M., Ohtani, N., Jager, A., & Demaria, M. (2022). Pharmacological CDK4/6 inhibition reveals a p53-dependent senescent state with restricted toxicity. *The EMBO Journal*, *41*(6). <https://doi.org/10.15252/embj.2021108946>
- Wang, D., Wang, H., Brown, J., Daikoku, T., Ning, W., Shi, Q., Richmond, A., Strieter, R., Dey, S. K., & DuBois, R. N. (2006). CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer. *Journal of Experimental Medicine*, *203*(4), 941-951. <https://doi.org/10.1084/jem.20052124>
- Wang, E. (1995). Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Research*, *55*(11), 2284-2292.
- Wang, R., Yu, Z., Sunchu, B., Shoaf, J., Dang, I., Zhao, S., Caples, K., Bradley, L., Beaver, L. M., Ho, E., Löhr, C. V., & Perez, V. I. (2017). Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism. *Aging Cell*, *16*(3), 564-574. <https://doi.org/10.1111/accel.12587>
- Weiner-Gorzal, K., Dempsey, E., Milewska, M., McGoldrick, A., Toh, V., Walsh, A., Lindsay, S., Gubbins, L., Cannon, A., Sharpe, D., O'Sullivan, J., Murphy, M., Madden, S. F., Kell, M., McCann, A., & Furlong, F. (2015). Overexpression of the microRNA miR-433 promotes resistance to paclitaxel through the induction of cellular senescence in ovarian cancer cells. *Cancer Medicine*, *4*(5), 745-758. <https://doi.org/10.1002/cam4.409>
- Wells, S. I., Aronow, B. J., Wise, T. M., Williams, S. S., Couget, J. A., & Howley, P. M. (2003). Transcriptome signature of irreversible senescence in human papillomavirus-positive cervical cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(12), 7093-7098. <https://doi.org/10.1073/pnas.1232309100>
- Welsh, J. A., Goberdhan, D. C., O'Driscoll, L., Théry, C., & Witwer, K. W. (2024). MISEV2023: An updated guide to EV research and applications. *Journal of Extracellular Vesicles*, *13*(2), e12416. <https://doi.org/10.1002/jev2.12416>

- Wieland, E., Rodriguez-Vita, J., Liebler, S. S., Mogler, C., Moll, I., Herberich, S. E., Espinet, E., Herpel, E., Menuchin, A., Chang-Claude, J., Hoffmeister, M., Gebhardt, C., Brenner, H., Trumpp, A., Siebel, C. W., Hecker, M., Utikal, J., Sprinzak, D., & Fischer, A. (2017). Endothelial Notch1 Activity Facilitates Metastasis. *Cancer Cell*, *31*(3), 355-367. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.01.007>
- Wiley, C. D., Schaum, N., Alimirah, F., Lopez-Dominguez, J. A., Orjalo, A. V., Scott, G., Desprez, P.-Y., Benz, C., Davalos, A. R., & Campisi, J. (2018). Small-molecule MDM2 antagonists attenuate the senescence-associated secretory phenotype. *Scientific Reports*, *8*(1), 2410. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20000-4>
- Wiley, C. D., Velarde, M. C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E. A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H. W., Davis, S. S., Ramanathan, A., Gerencser, A. A., Verdin, E., & Campisi, J. (2016). Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metabolism*, *23*(2), 303-314. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.011>
- Xu, M., Su, X., Xiao, X., Yu, H., Li, X., Keating, A., Wang, S., & Zhao, R. C. (2021). Hydrogen Peroxide-Induced Senescence Reduces the Wound Healing-Promoting Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Partially via miR-146a. *Aging and Disease*, *12*(1), 102. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0624>
- Xu, M., Tchkonja, T., Ding, H., Ogrodnik, M., Lubbers, E. R., Pirtskhalava, T., White, T. A., Johnson, K. O., Stout, M. B., Mezera, V., Giorgadze, N., Jensen, M. D., LeBrasseur, N. K., & Kirkland, J. L. (2015). JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(46), E6301-E6310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515386112>
- Xu, P., Wang, M., Song, W., Wang, Q., Yuan, G.-C., Sudmant, P. H., Zare, H., Tu, Z., Orr, M. E., & Zhang, B. (2022). The landscape of human tissue and cell type specific expression and co-regulation of senescence genes. *Molecular Neurodegeneration*, *17*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00507-7>
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R. A., Hernando, E., Krizhanovskiy, V., Cordon-Cardo, C., & Lowe, S. W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, *445*(7128), 656-660. <https://doi.org/10.1038/nature05529>
- Yamakoshi, K., Takahashi, A., Hirota, F., Nakayama, R., Ishimaru, N., Kubo, Y., Mann, D. J., Ohmura, M., Hirao, A., Saya, H., Arase, S., Hayashi, Y., Nakao, K., Matsumoto, M., Ohtani, N., & Hara, E. (2009). Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *Journal of Cell Biology*, *186*(3), 393-407. <https://doi.org/10.1083/jcb.200904105>
- Yang, F., Tuxhorn, J. A., Ressler, S. J., McAlhany, S. J., Dang, T. D., & Rowley, D. R. (2005). Stromal Expression of Connective Tissue Growth Factor Promotes Angiogenesis and Prostate Cancer Tumorigenesis. *Cancer Research*, *65*(19), 8887-8895. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1702>

- Yang, H., Wang, H., Ren, J., Chen, Q., & Chen, Z. J. (2017). cGAS is essential for cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(23). <https://doi.org/10.1073/pnas.1705499114>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R.-M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yoon, Y.-K., Kim, H.-P., Han, S.-W., Oh, D. Y., Im, S.-A., Bang, Y.-J., & Kim, T.-Y. (2010). KRAS mutant lung cancer cells are differentially responsive to MEK inhibitor due to AKT or STAT3 activation: Implication for combinatorial approach. *Molecular Carcinogenesis*, 49(4), 353-362. <https://doi.org/10.1002/mc.20607>
- Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahar, E., Condiotti, R., Ben-Porath, I., & Krizhanovsky, V. (2016). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nature Communications*, 7(1), 11190. <https://doi.org/10.1038/ncomms11190>
- Yoshimoto, S., Loo, T. M., Atarashi, K., Kanda, H., Sato, S., Oyadomari, S., Iwakura, Y., Oshima, K., Morita, H., Hattori, M., Honda, K., Ishikawa, Y., Hara, E., & Ohtani, N. (2013). Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*, 499(7456), 97-101. <https://doi.org/10.1038/nature12347>
- Young, A. P., Schlisio, S., Minamishima, Y. A., Zhang, Q., Li, L., Grisanzio, C., Signoretti, S., & Kaelin, W. G. (2008). VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nature Cell Biology*, 10(3), 361-369. <https://doi.org/10.1038/ncb1699>
- Yu, X., Harris, S. L., & Levine, A. J. (2006). The Regulation of Exosome Secretion: A Novel Function of the p53 Protein. *Cancer Research*, 66(9), 4795-4801. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4579>
- Yu, X., Riley, T., & Levine, A. J. (2009). The regulation of the endosomal compartment by p53 the tumor suppressor gene. *FEBS Journal*, 276(8), 2201-2212. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06949.x>
- Yuyama, K., Sun, H., Mitsutake, S., & Igarashi, Y. (2012). Sphingolipid-modulated Exosome Secretion Promotes Clearance of Amyloid- β by Microglia. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), 10977-10989. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.324616>
- Zech, D., Rana, S., Büchler, M. W., & Zöller, M. (2012). Tumor-exosomes and leukocyte activation: An ambivalent crosstalk. *Cell Communication and Signaling*, 10(1), 37. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-10-37>
- Zhang, H., Freitas, D., Kim, H. S., Fabijanic, K., Li, Z., Chen, H., Mark, M. T., Molina, H., Martin, A. B., Bojmar, L., Fang, J., Rampersaud, S., Hoshino, A., Matei, I., Kenific, C.

- M., Nakajima, M., Mutvei, A. P., Sansone, P., Buehring, W., ... Lyden, D. (2018). Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nature Cell Biology*, 20(3), 332-343. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0040-4>
- Zhang, Q., Higginbotham, J. N., Jeppesen, D. K., Yang, Y.-P., Li, W., McKinley, E. T., Graves-Deal, R., Ping, J., Britain, C. M., Dorsett, K. A., Hartman, C. L., Ford, D. A., Allen, R. M., Vickers, K. C., Liu, Q., Franklin, J. L., Bellis, S. L., & Coffey, R. J. (2019). Transfer of Functional Cargo in Exomeres. *Cell Reports*, 27(3), 940-954.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.009>
- Zhang, Q., Jeppesen, D. K., Higginbotham, J. N., Graves-Deal, R., Trinh, V. Q., Ramirez, M. A., Sohn, Y., Neining, A. C., Taneja, N., McKinley, E. T., Niitsu, H., Cao, Z., Evans, R., Glass, S. E., Ray, K. C., Fissell, W. H., Hill, S., Rose, K. L., Huh, W. J., ... Coffey, R. J. (2021). Supermeres are functional extracellular nanoparticles replete with disease biomarkers and therapeutic targets. *Nature Cell Biology*, 23(12), 1240-1254. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00805-8>
- Zhang, X., Borg, E. G. F., Liaci, A. M., Vos, H. R., & Stoorvogel, W. (2020). A novel three step protocol to isolate extracellular vesicles from plasma or cell culture medium with both high yield and purity. *Journal of Extracellular Vesicles*, 9(1), 1791450. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1791450>
- Zhao, B., Liu, P., Fukumoto, T., Nacarelli, T., Fatkhutdinov, N., Wu, S., Lin, J., Aird, K. M., Tang, H.-Y., Liu, Q., Speicher, D. W., & Zhang, R. (2020). Topoisomerase 1 cleavage complex enables pattern recognition and inflammation during senescence. *Nature Communications*, 11(1), 908. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14652-y>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características de las células senescentes	21
Figura 2. Inductores de senescencia y rutas de control	22
Figura 3. Papel dual del SASP en cáncer	28
Figura 4. Biogénesis y composición molecular de las EVs	33
Figura 5. Rutas de endocitosis e inhibidores	35
Figura 6. Inducción de senescencia celular con bleomicina	54
Figura 7. Caracterización de senescencia celular en A549 tras bleomicina.....	55
Figura 8. Protocolo de inducción de senescencia paracrina	56
Figura 9. Caracterización de la inducción de senescencia paracrina	57
Figura 10. Efecto del tratamiento con GW4869 en células senescentes	59
Figura 11. Efecto del tratamiento con CM tras GW4869.....	60
Figura 12. Caracterización de las EVs aisladas mediante distintas metodologías	62
Figura 13. Efecto del tratamiento con EVs aisladas.....	63
Figura 14. Caracterización de las EVs mediante AF4.....	64
Figura 15. Caracterización de la reducción de <i>RAB27A</i>	65
Figura 16. Reducción de los niveles de EVs tras sh <i>RAB27A</i>	66
Figura 17. Caracterización de la reducción de <i>mTOR</i>	68
Figura 18. Efecto de la modulación genética de la biogénesis de EVs	70
Figura 19. Caracterización de la modulación farmacológica	72
Figura 20. Análisis del número de EVs tras el tratamiento farmacológico.....	73
Figura 21. Efecto del tratamiento con CM tras la modulación farmacológica.....	74
Figura 22. Arrastre de BAFA1 en el CM	75
Figura 23. Efecto de la inhibición de la endocitosis en senescencia paracrina	76
Figura 24. Caracterización de la reducción de <i>RELA</i>	78
Figura 25. Caracterización de la reducción de <i>cGAS</i> y <i>STING</i>	79
Figura 26. Efecto de la modulación del sistema inmune innato.....	80
Figura 27. Inducción de senescencia con bleomicina por citometría de flujo.....	119
Figura 28. Inducción de senescencia paracrina con CM por citometría de flujo	119
Figura 29. Efecto de GW4869 en células senescentes	120
Figura 30. Efecto del tratamiento con GW4869 en senescencia paracrina	120
Figura 31. Efecto de la reducción de <i>mTOR</i>	121

Figura 32. Efecto de la reducción de RAB27A y mTOR en senescencia paracrina..122
Figura 33. Efecto de la modulación farmacológica en senescencia paracrina.....123
Figura 34. Efecto de la inhibición de endocitosis en senescencia paracrina.....123

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plásmidos retrovirales utilizados	44
Tabla 2. Plásmidos lentivirales utilizados	44
Tabla 3. Programa de la qRT-PCR.....	46
Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados	46
Tabla 5. Lista de anticuerpos primarios utilizados	48
Tabla 6. Lista de anticuerpos secundarios utilizados	48

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE LAS FIGURAS

Las **Figuras 1, 2, 4-34** son de autoría propia

La **Figura 3** se ha adaptado de la Figura 2 de Di Mitri & Alimonti, 2016 con el permiso de Elsevier

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

GRÁFICOS DE CITOMETRÍA

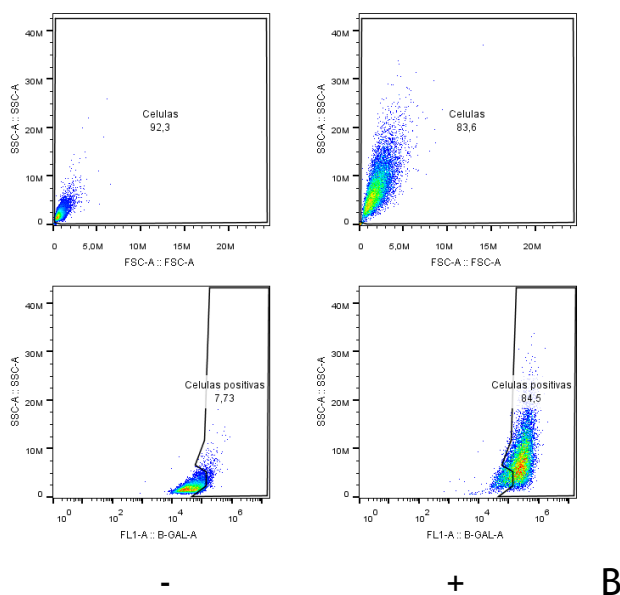


Figura 27. Inducción de senescencia con bleomicina por citometría de flujo. Análisis de células A549 proliferativas (B-) y senescentes (B+) por citometría de flujo con el sustrato C₁₂FDG. En la figura se muestran los gráficos de citometría SSC-A vs. FSC-A y SSC-A vs. FL1A-B-GAL-A.

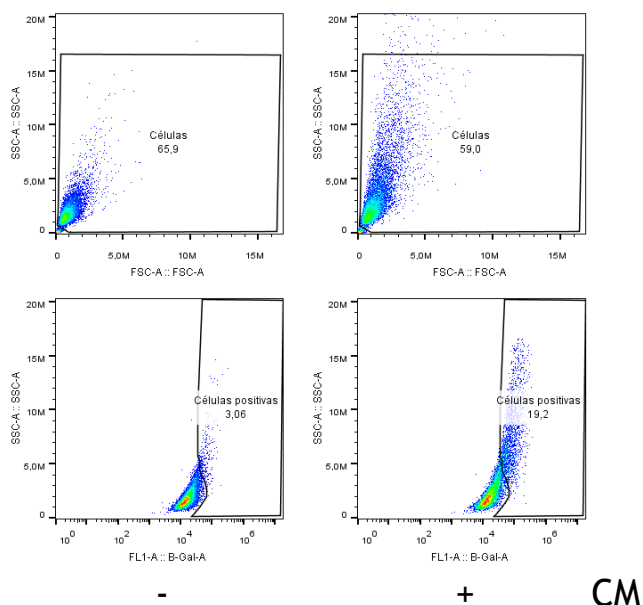


Figura 28. Inducción de senescencia paracrina con CM por citometría de flujo. Análisis de células A549 tratadas con medio condicionado de células proliferativas (CM-) y senescentes (CM+) por citometría de flujo con el sustrato C₁₂FDG. En la figura se muestran los gráficos de citometría SSC-A vs. FSC-A y SSC-A vs. FL1A-B-GAL-A.

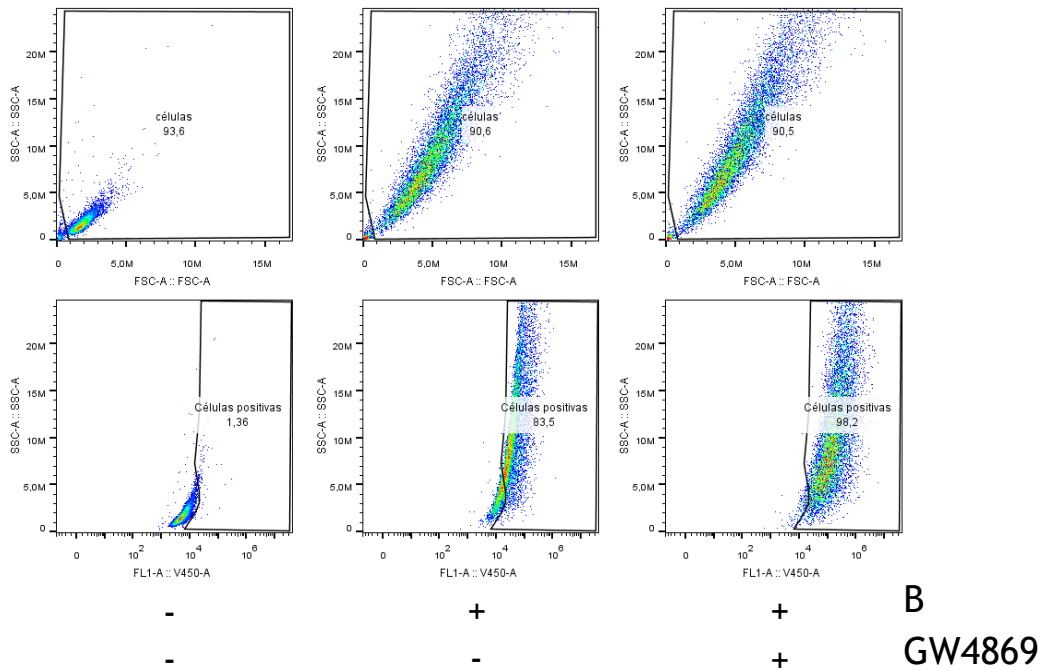


Figura 29. Efecto de GW4869 en células senescentes. Análisis de células A549 proliferativas (B-), senescentes (B+) y senescentes tratadas (B+GW4869+) por citometría de flujo con el sustrato C₁₂FDG. En la figura se muestran los gráficos de citometría SSC-A vs. FSC-A y SSC-A vs. FL1A-B-GAL-A.

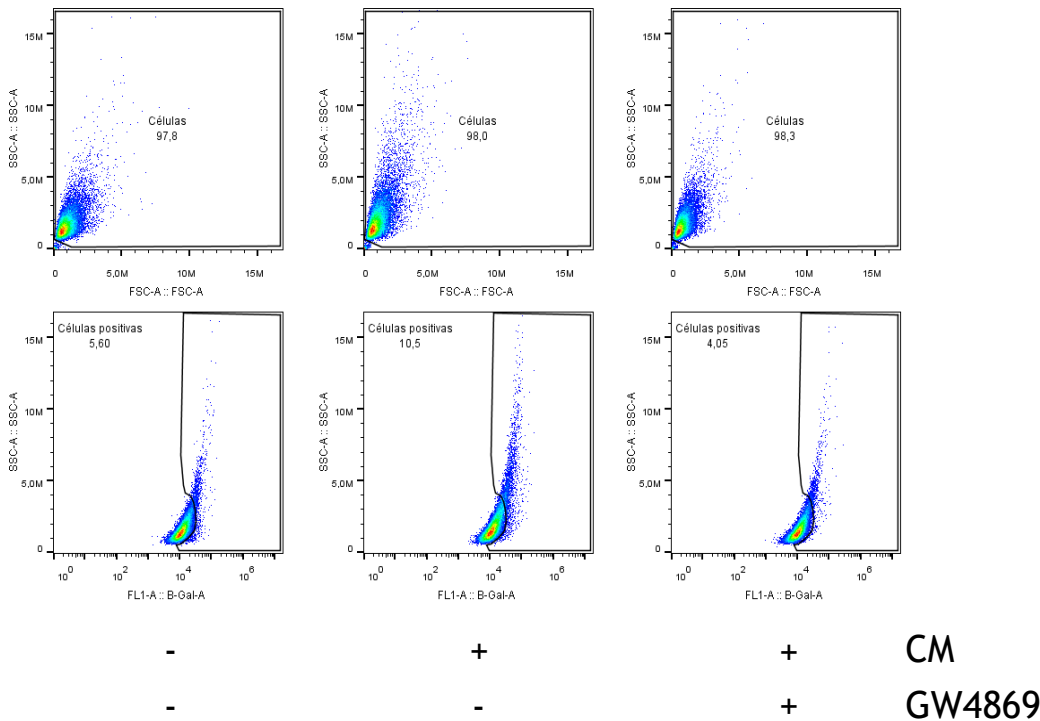


Figura 30. Efecto del tratamiento con GW4869 en senescencia paracrina. Análisis de células A549 tratadas con medio condicionado de células proliferativas (CM-), senescentes (CM+) y CM+GW4869+ por citometría de flujo con el sustrato C₁₂FDG. En la figura se muestran los gráficos de citometría SSC-A vs. FSC-A y SSC-A vs. FL1A-B-GAL-A.

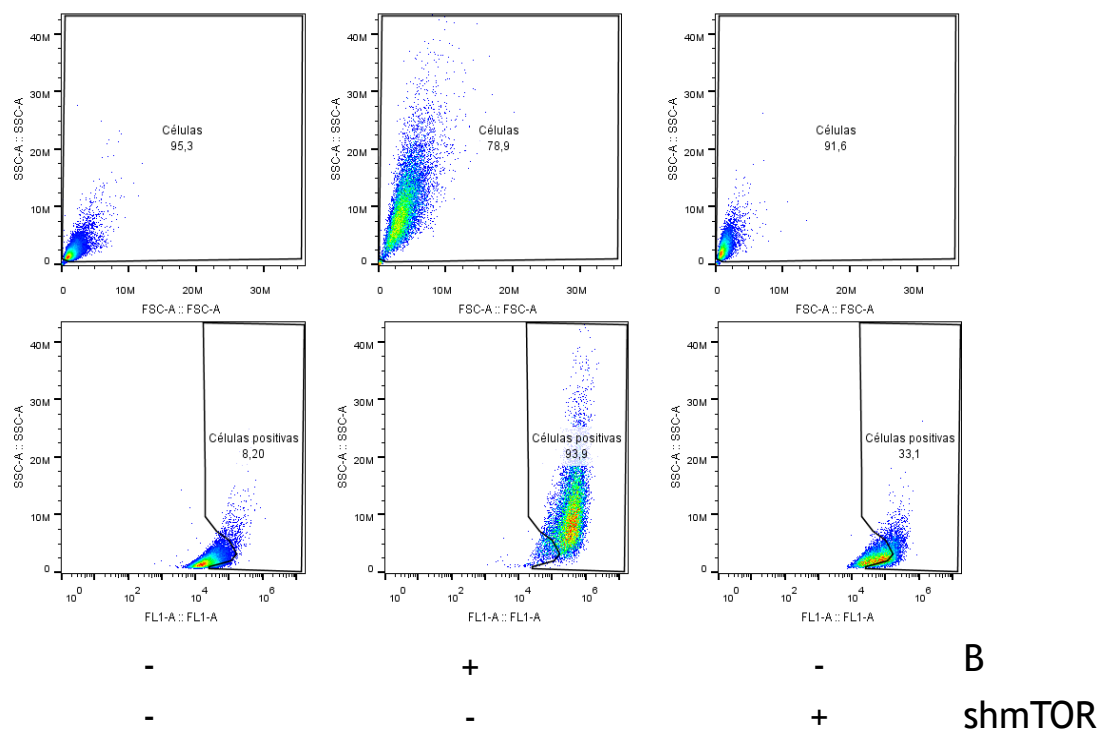
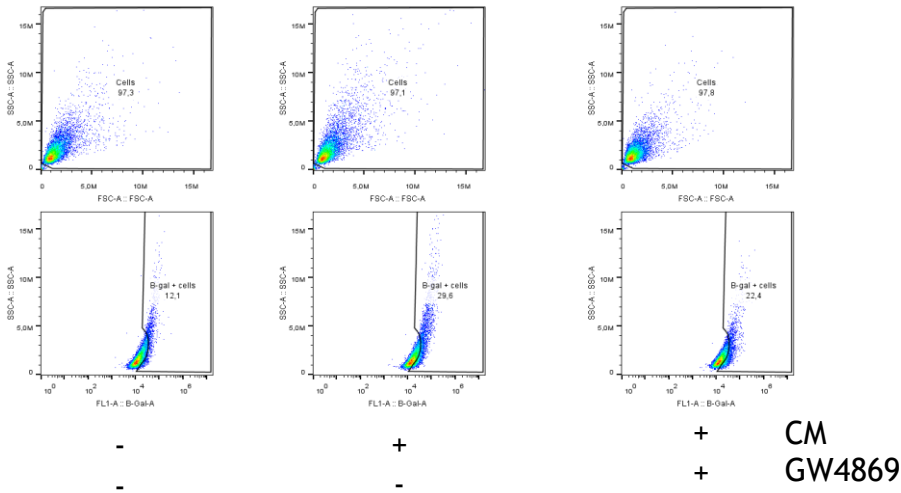
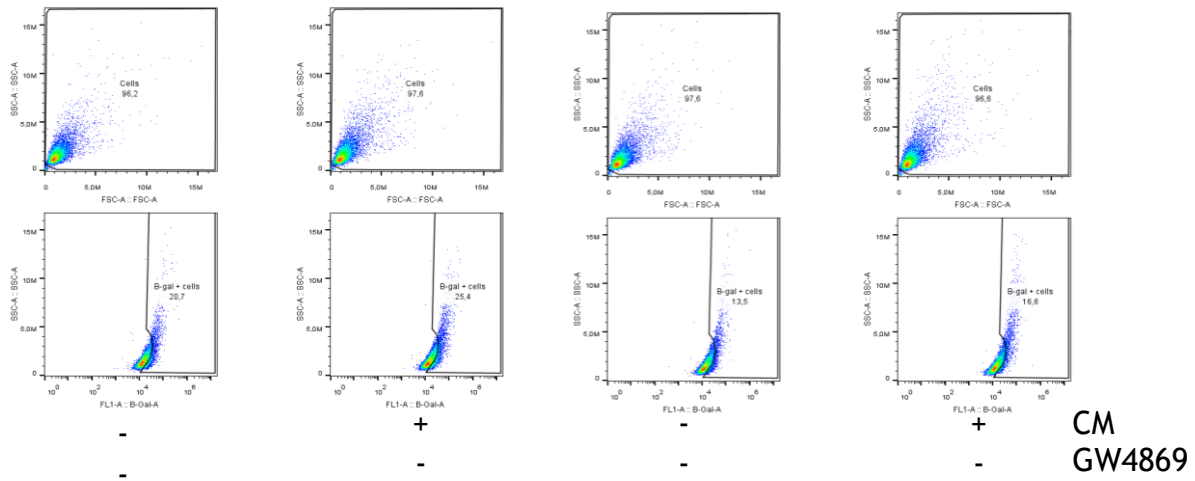


Figura 31. Efecto de la reducción de *mTOR*. Análisis de células A549 proliferativas (B-), senescentes (B+) y shmTOR por citometría de flujo con el sustrato C₁₂FDG. En la figura se muestran los gráficos de citometría SSC-A vs. FSC-A y SSC-A vs. FL1A-B-GAL-A.



Scr



shRAB27A #313

shRAB27A #735

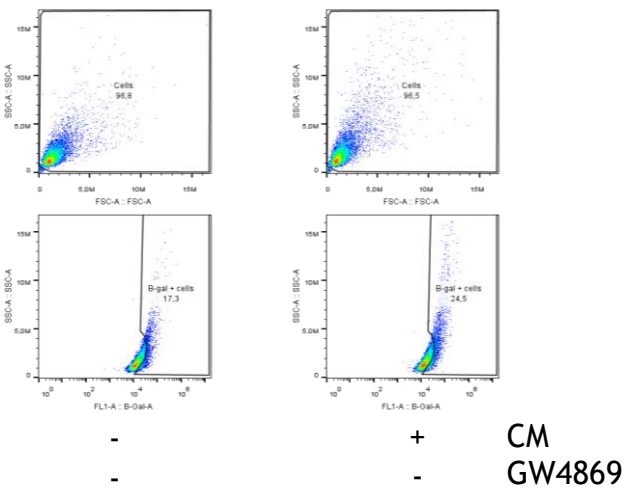


Figura 32. Efecto de la reducción de *RAB27A* y *mTOR* en senescencia paracrina. Análisis de células A549 tratadas con los CM derivados de células shRAB27A y shmTOR por citometría de flujo con el sustrato $C_{12}FDG$. En la figura se muestran los gráficos de citometría SSC-A vs. FSC-A y SSC-A vs. FL1-A-B-GAL-A.

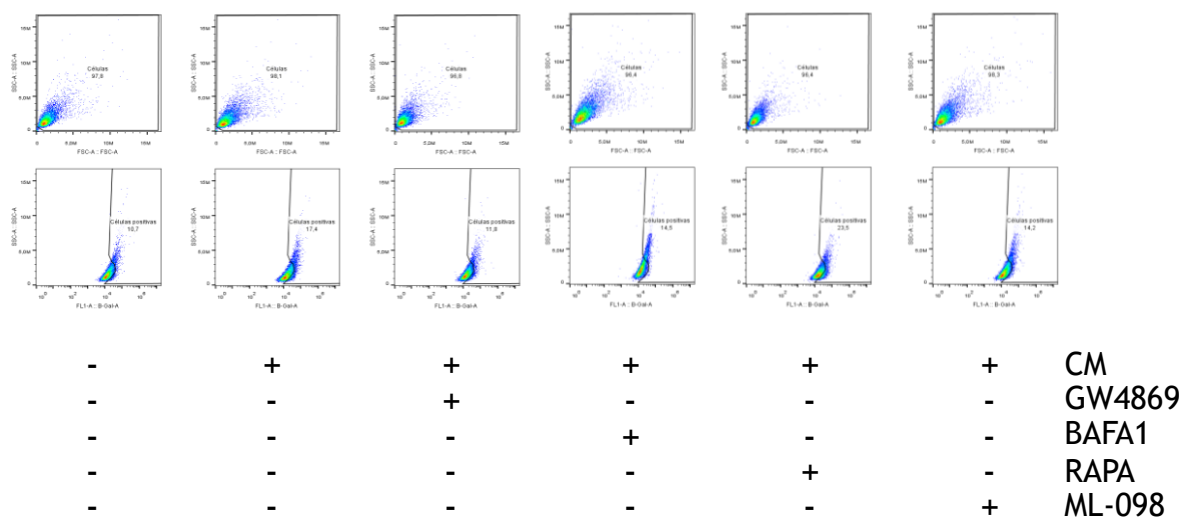


Figura 33. Efecto de la modulación farmacológica en senescencia paracrina. Análisis de células A549 tratadas con los fármacos moduladores de la biogénesis por citometría de flujo con el sustrato C₁₂FDG. En la figura se muestran los gráficos de citometría SSC-A vs. FSC-A y SSC-A vs. FL1A-B-GAL-A.

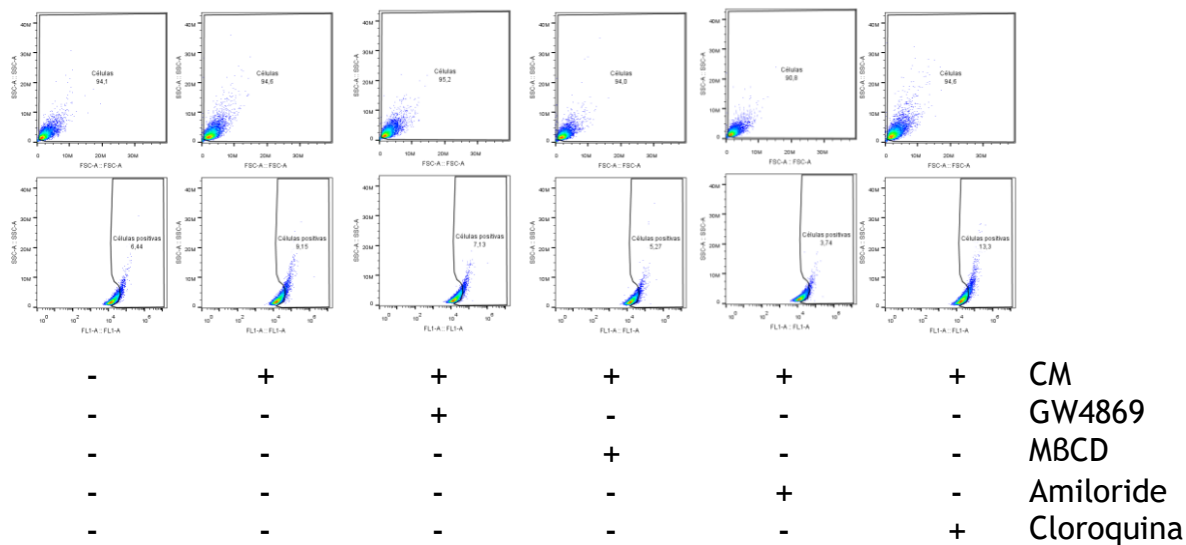


Figura 34. Efecto de la inhibición de endocitosis en senescencia paracrina. Análisis de células A549 tratadas con los inhibidores de endocitosis por citometría de flujo con el sustrato C₁₂FDG. En la figura se muestran los gráficos de citometría SSC-A vs. FSC-A y SSC-A vs. FL1A-B-GAL-A.

La senescencia celular se define como una parada estable en ciclo celular y presenta un fenotipo secretor propio conocido como SASP. Entre los constituyentes del SASP se encuentran factores solubles y vesículas extracelulares (EVs), con funciones importantes en comunicación intercelular. La biogénesis y liberación de estas EVs están aumentadas en senescencia, lo que sugiere un papel clave durante este estado celular. En cáncer, al SASP se le han atribuido tanto funciones protumorales como antitumorales, entre las que está la inducción de senescencia paracrina. La contribución relativa de cada componente del SASP a este proceso es un campo lleno de contradicciones que es necesario aclarar. En esta tesis abordamos la problemática de la contribución de las EVs a la inducción de senescencia paracrina en células tumorales.