



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

**ESTUDIO DE CELULAS SENESCENTES POR  
CITOMETRIA DE IMAGEN.**

**SENESCENT CELLS STUDY THROUGH IMAGE  
CYTOMETRY**

Autor

**Jorge Navarro Amesti**

Directores

**Dr. José Octavio Alda Torrubia**

**Dra. Desirée Pereboom Maicas**

Departamento de Farmacología y Fisiología Área de Fisiología Humana. Facultad de  
Medicina

SAI Citómica. Universidad de Zaragoza

Zaragoza 2019







# ÍNDICE

GLOSARIO-----	1
RESUMEN-----	2
ABSTRACT -----	3
INTRODUCCIÓN -----	4
▪ Senescencia celular -----	4
▪ Métodos de determinación-----	6
▪ Citometría de imagen-----	7
▪ Fisetina -----	8
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS-----	10
▪ Planteamiento-----	10
▪ Objetivos -----	10
MATERIALES Y MÉTODOS -----	11
▪ MATERIALES-----	11
- Equipo-----	11
- Material biológico-----	12
- Otros reactivos -----	12
▪ MÉTODOS -----	13
- Cultivo celular -----	13
- Tripsinización-----	14
- Determinación de senescencia celular-----	14
- Estudio de la mostaza nitrogenada como inductor de senescencia -----	15
- Estudio de radiación UVB como inductor de senescencia sobre fibroblastos humanos y efecto protector de la fisetina. -----	16
- Estudio de radiación UVB como inductor de senescencia sobre queratinocitos HaCaT y efecto protector de la fisetina. -----	17

RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	18
▪ Efecto de mostaza nitrogenada como inductor de senescencia en cultivo celular de fibroblastos humanos -----	18
▪ Estudio de la radiación UVB como inductor de senescencia sobre fibroblastos humanos y efecto protector de la fisetina -----	20
▪ Estudio de la radiación UVB como inductor de senescencia sobre queratinocitos HaCaT y efecto protector de la fisetina -----	21
CONCLUSIONES -----	22
CONCLUSIONS -----	22
BIBLIOGRAFÍA -----	23
▪ Recursos bibliográficos -----	23
▪ Referencias bibliográficas -----	23

# GLOSARIO

---

- **ADN/DNA:** ácido desoxirribonucleico
- **AP-1:** proteína activadora 1
- **ARNm:** ácido ribonucleico
- **BrdU:** bromodesoxiuridina
- **C<sub>12</sub>FDG:** 5-Dodecanoylamino fluorescein Di- $\beta$ -D-Galactopyranoside
- **DcR2:** receptor señuelo 2
- **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium
- **DMSO:** dimetilsulfoxido
- **DNA-SCARS:** segmentos de ADN con alteraciones de la cromatina
- **IL-6:** interleuquina 6
- **MAPK:** proteína quinasa activada por mitógenos
- **MN:** mostaza nitrogenada
- **mTOR:** diana e rapamicina en mamíferos
- **OH:** radical hidroxilo
- **PBS:** phosphate buffered saline
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- **RS:** senescencia replicativa
- **SAHF:** focos heterocromaticos asociados a senescencia
- **SASP:** fenotipo secretor asociado a senescencia
- **SA- $\alpha$ -Fuc:**  $\alpha$ -fucosidasa asociada a senescencia
- **SA- $\beta$ -Gal:**  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia
- **SFB:** suero fetal bovino
- **SIPS:** stress induced premature senescence
- **UV:** ultravioleta

## RESUMEN

---

La senescencia celular, conocida como la detención irreversible de la división celular, puede ser inducida por agentes oxidantes y radiación ultravioleta entre otros. Las células senescentes se distinguen por una serie de rasgos morfológicos y moleculares, entre los que destaca el incremento de la actividad  $\beta$ -Galactosidasa lisosomal,

Dado que la senescencia es uno de los factores más implicados en el envejecimiento cutáneo, se ha propuesto determinar y cuantificar tanto sus efectos inductores por mostaza nitrogenada y radiación UVB como el efecto protector que ejerce la fisetina.

Cómo modelo de estudio se han utilizado cultivos de fibroblastos humanos y una línea de queratinocitos HaCaT. Se ha determinado la senescencia utilizando el fluorocromo C<sub>12</sub>FDG mediante citometría de imagen. Cuantificado el efecto de la radiación ultravioleta y de la mostaza nitrogenada como inductores de senescencia y por último, se ha analizado el efecto protector que ejerce la fisetina.

Los resultados obtenidos mediante citometría de imagen sugieren que la radiación UVB (1,8 J/cm<sup>2</sup>) y la mostaza nitrogenada a una concentración de 100  $\mu$ M producen un aumento de la senescencia celular; Mientras que la fisetina en concentraciones de 2  $\mu$ M disminuye notablemente la senescencia en fibroblastos irradiados con UVB, este efecto también se aprecia aunque no tan notoriamente en queratinocitos HaCaT irradiados con UVB.

**Palabras clave:**  $\beta$ -galactosidasa Citometría, fibroblastos, fisetina, queratinocitos, radiación UVB, senescencia.



## ABSTRACT

---

Cellular senescence, known as the irreversible detention of cellular division, can be induced by chemical agents and ultraviolet radiation among others. Senescent cells are distinguished by a series of morphological and molecular features, between which the increase of lisosomal  $\beta$ -Gal activity is highlighted.

As senescence is one of the most implicated factors in cutaneous aging, it has been proposed to determine and quantify both its inductive effects by nitrogenous mustard and UVB radiation and the protector effect fisetin performs.

As a study model, cultures of human fibroblasts and a HaCaT keratinocyte line have been used. Senescence was determined using  $C_{12}$ FDG fluorochrome by image cytometry. Quantified the effect of ultraviolet radiation and nitrogen mustard as senescence inducers and finally, the protective effect of fisetin has been analyzed

The results obtained by image cytometry suggest that UVB radiation (1.8 J/cm<sup>2</sup>) and nitrogenous mustard at a 100  $\mu$ M concentration produce rises in cellular senescence. While fisetin in concentrations of 2  $\mu$ M significantly decreases senescence in UVB radiated fibroblasts, this effect is also appreciated although not as notoriously in UVB irradiated HaCaT keratinocytes.

**Key words:**  $\beta$ -galactosidase, Cytometry, fibroblasts, fisetin, keratinocytes, UVB radiation, senescence.

# INTRODUCCIÓN

## Senescencia celular

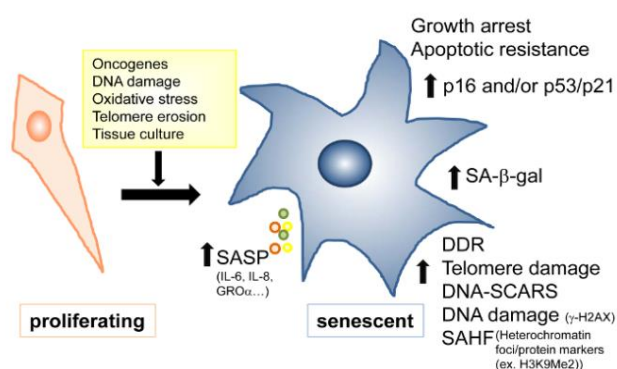
La senescencia celular fue descrita por primera vez por Hayflick en la década de 1960, fue definida como la detención irreversible de la división celular en un cultivo prolongado y metabólicamente activo, ocurre tanto *in vivo* como *in vitro*.

A esta limitación se le denominó senescencia replicativa (RS), es uno de los recursos celulares más importantes para evitar la transformación en estado tumoral, causado por la erosión telomérica progresiva asociada con la acumulación de daño en el ADN (Singh and Piekorz, 2013), que conduce a la detención del ciclo celular en la fase G1.

Estas células que se acumulan en los tejidos con el avance de la edad (Abbadie et al., 2017) se han convertido en un foco importante de investigación en biogerontología, que intenta determinar cómo se produce el envejecimiento. (de Magalhaes and Passos, 2018). Su identificación, cuantificación y caracterización puede ayudar a la comprensión del papel que tienen en el envejecimiento y en diversas patogénesis del organismo. (Biran et al., 2017).

Aunque inicialmente se describió asociada al agotamiento de las capacidades proliferativas de las células y al acortamiento de los telómeros (RS) se ha visto que en respuesta a estrés o daño celular, las células en proliferación también pueden inducir un programa específico que inicia un estado de detención del ciclo, esta acumulación de células senescentes puede influir en muchos procesos biológicos, incluido el desarrollo embrionario, la reparación y regeneración de tejidos, la supresión de tumores y el envejecimiento. (Noren Hooten and Evans, 2017).

La ausencia de marcadores específicos de senescencia dificulta la caracterización de las células senescentes que se acumulan *in vivo* en tejidos y órganos. Los métodos de detección más fiables analizan las distintas características moleculares, metabólicas y morfológicas. Estos incluyen, pero no están limitados a, altos niveles de p16<sup>Ink4a</sup>, p21, macroH2A, IL-6, p38MAPK fosforilada y actividad β-galactosidasa asociada a la senescencia (SA-β-Gal). (van Deursen, 2014).



**Fig 1:** Representación esquemática de fibroblastos en proliferación (izquierda) y senescentes (derecha). En el recuadro amarillo se muestran ejemplos de inductores de senescencia. Tomada de *Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence*. (Noren Hooten and Evans, 2017)

**Antes se suponía** que las células senescentes (que han perdido la capacidad de dividirse) contribuían al envejecimiento al minar la reparación de los tejidos. Se creía que estas entraban en senescencia para evitar volverse cancerosas cuando el daño las ponía en riesgo de proliferar de forma incontrolada.

**Más tarde**, la idea de que las células senescentes desempeñan un papel en el envejecimiento de los tejidos y los organismos cayó en descrédito. Sin embargo, ahora la idea ha vuelto a ganar fuerza.

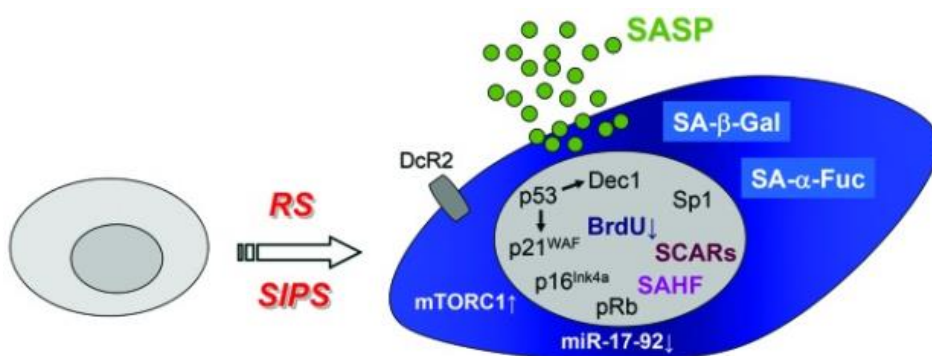
**Las nuevas investigaciones** indican que las células pueden contribuir al envejecimiento del modo propuesto inicialmente y estimulando también la inflamación. Además, pueden dañar las células de su alrededor y fomentar así el cáncer.

**Algunos estudios** con ratones indican que retrasar la senescencia celular ayudaría a frenar el envejecimiento y a posponer algunas de las enfermedades asociadas a él.

**Fig 2:** Tabla resumen de los avances en cuanto al concepto de senescencia y sus posibles implicaciones en enfermedades asociadas tales como envejecimiento y cáncer. Tomada de *Investigación y ciencia. Senescencia celular. (David Stipp, 2012)*

La senescencia aparece como una respuesta al estrés, pero es un arma de doble filo. Tiene una función protectora y supresora de tumores pero por otro lado, exhibe efectos perjudiciales a nivel celular y orgánico, incluido el agotamiento proliferativo de las células progenitoras o la promoción de procesos inflamatorios vinculados al denominado fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). (Cahu, 2013). (**Fig 3**).

Curiosamente, la eliminación de células senescentes acumuladas in vivo en ratón retrasa efectivamente los trastornos asociados al envejecimiento, corroborando así el vínculo causal entre la senescencia celular y la disfunción tisular en fenotipos relacionados con la edad. (Singh and Piekorz, 2013)



**Fig 3:** Rasgos característicos de las células senescentes. Las células que experimentan senescencia replicativa (RS) o senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) se caracterizan por una morfología aumentada y aplanada con cambios moleculares y subcelulares, incluida la activación de vías supresoras de tumores (p53-p21 WAF, p53-Dec1, p16 Ink4a), alteraciones de la cromatina (ADN-SCARS, segmentos de ADN con alteraciones de la cromatina que refuerzan la senescencia; SAHF (focos heterocromáticos asociados a la senescencia) y activación de ciertos factores de transcripción (Sp1), así como la producción de factores secretados (SASP, fenotipo secretor asociado a la senescencia). Además, la expresión en la superficie celular del receptor 2 señuelo (DcR2) aumenta durante la senescencia. Tomada de: *Senescence-associated lysosomal  $\alpha$ -L-fucosidase (SA- $\alpha$ -Fuc) (Singh and Piekorz, 2013).*

## Métodos de determinación

El estudio de la senescencia celular ha sido complejo, debido en parte a la dificultad de detectar su presencia dentro de los tejidos.

Uno de los métodos de detección más populares se realiza mediante la evaluación de la actividad SA- $\beta$ -gal.(Biran et al., 2017).

A nivel bioquímico y enzimático, se observa una expansión considerable del compartimento lisosomal y por tanto, un aumento de la granularidad en las células que experimentan senescencia. Esto se demuestra con un aumento de actividad SA- $\beta$ -gal y medida a un pH 6, cómo marcador clásico para detectar células senescentes.(Singh and Piekorz, 2013).

La actividad SA-beta-gal, es un marcador ampliamente utilizado, ya que en el año 2000 se demostró que esta actividad era debida a un incremento en la abundancia de la enzima (Kurz et al., 2000), ligada al incremento de la biogénesis lisosomal observada en las células senescentes (Debacq-Chainiaux et al., 2009). Este incremento de actividad (codificada por el gen lisosomal  $\beta$ -galactosidasa denominado GLB1), parece deberse, en parte, a la acumulación de niveles aumentados de GLB1, ARNm y proteína.(Lee et al., 2006).

Esta actividad se detecta de manera rutinaria citoquímicamente; Pero este método requiere mucho tiempo, es subjetivo y, por lo tanto, es propenso error. Además no es suficiente, ya que la tinción positiva también puede ocurrir en otros contextos biológicos.(Kuilman et al., 2010, Caldwell et al., 2012). Por lo tanto, se combina con la tinción para marcadores adicionales, por ejemplo de daño en el ADN.

Como se ha dicho anteriormente la tinción histoquímica con SA- $\beta$ -gal no distingue los diferentes tipos de células senescentes en tejidos y además puede dar lugar a falsos positivos (por ejemplo, el aumento de la actividad de SA- $\beta$ -Gal en cultivos con alta confluencia celular) o falsos negativos, porque la inducción de senescencia ha sido insuficiente. Teniendo en cuenta esta última observación se han investigado varias hidrolasas lisosomales, además de SA- $\beta$ -Gal, para determinar su capacidad como marcadores de senescencia. Se identificó la  $\alpha$ -L-fucosidasa (glicosidasa involucrada en el metabolismo de ciertos glicolípidos y glicoproteínas), como un biomarcador novedoso y prometedor para la senescencia celular.

Otros métodos incluyen Western blotting, PCR e inmunohistoquímica, para caracterizar las etapas del crecimiento y desarrollo de las células, pero actualmente no existen métodos que permitan monitorear simultáneamente la proliferación celular e identificar cambios en las propiedades celulares para cada célula individual.

A nivel de la arquitectura nuclear, la formación de ADN-SCARS (segmentos de ADN con alteraciones de cromatina que refuerzan senescencia) y los focos heterocromáticos asociados a la senescencia (SAHF) reflejan la represión de los genes proliferativos y, por lo tanto, la falta de síntesis de ADN detectada por una falta de incorporación de BrdU. (*Fig 3*).

A nivel del punto de control molecular, la vía p53-p21<sup>WAF1</sup> y el supresor de tumores p16<sup>INK4a</sup>, así como el incremento de la vía mTOR (principal vía que censa el estado energético y nutricional de la célula) mediante rapamicina (inductor de senescencia) (Fernandez Larrosa et al., 2011) asumen roles sinérgicos en la inducción y mantenimiento del fenotipo senescente.

La determinación de proliferación celular también puede usarse como un parámetro inversamente proporcional a senescencia celular, entendida ésta como una detención del ciclo celular en fase G1 tras un evento estresante.(Choi et al., 2018).

La citometría de flujo basada en imágenes tiene la capacidad de obtener simultáneamente datos morfométricos y monitorear la división celular, y detectar la expresión de múltiples proteínas de interés.(Luk et al., 2017).

En este trabajo las determinaciones de senescencia se han realizado mediante el citómetro de imagen, el cual a la vez que identifica las células senescentes nos permite ver su morfología, gracias a sus tres objetivos de microscopia confocal.

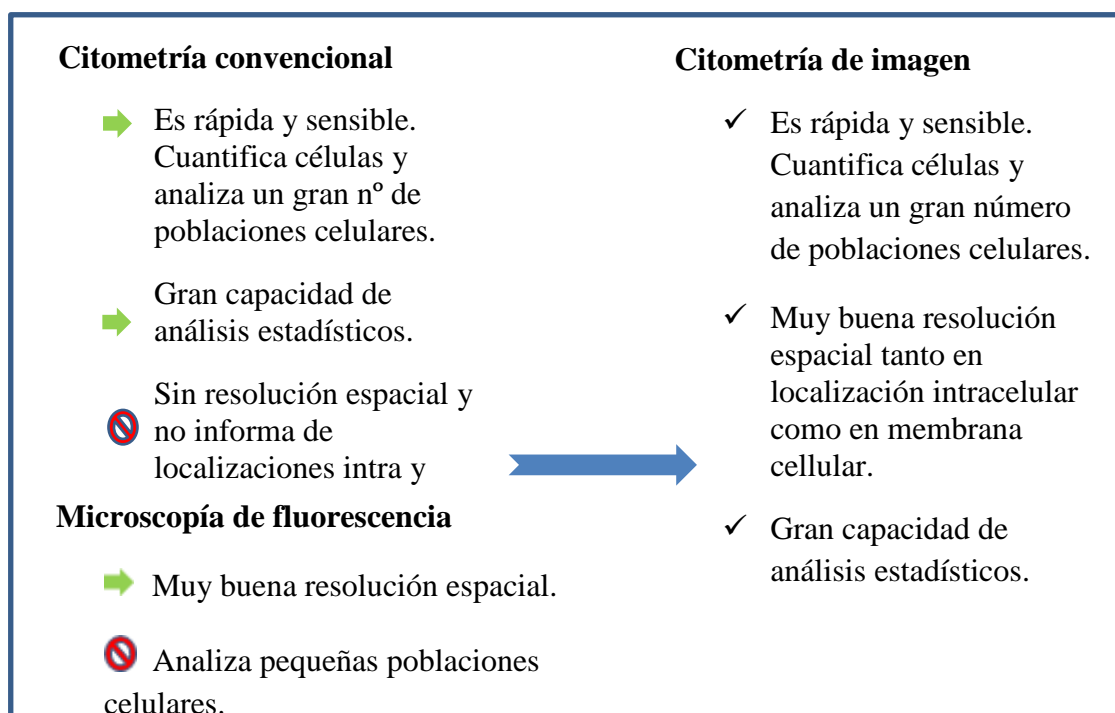
## Citometría de imagen

La citometría de imagen proporciona imágenes de una gran cantidad de células que luego son procesadas. La lectura resultante proporciona información sobre la cantidad de células y el posible fenotipo celular.

Permite la evaluación de datos morfológicos y fluorescentes a nivel de una sola célula, así como a nivel de población. Combina la ventaja estadística de citometría de flujo con la capacidad de identificar cada evento en función de una imagen real, lo que permite analizar la expresión de proteínas en células individuales en poblaciones de células heterogéneas, donde el nivel de expresión de una de las proteínas es bajo.(Barteneva et al., 2012).

En la actualidad, el catálogo de líneas de emisión que se pueden encontrar en láseres de este tipo, es amplio entre el UV y el rojo lejano, permitiendo alojar un gran número de fluorocromos dentro de este espectro.

Una de las mayores diferencias entre un citómetro de imágenes y un citómetro de flujo es que las células de las imágenes anteriores se cruzan frente a una fuente de luz, mientras que la última utiliza un fotomultiplicador para leer la fluorescencia.



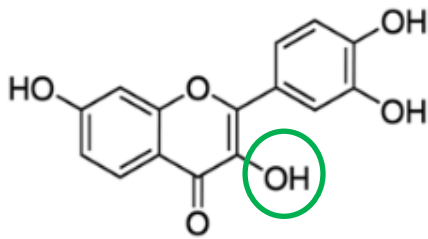
**Fig 4:** Representación esquemática de las ventajas y desventajas de citometría convencional y la microscopía de fluorescencia frente a la citometría de imagen. (Figura del autor con la información del SAI. Servicio de Apoyo a la Investigación. Universidad de Zaragoza)

## Fisetina

La fisetina es un flavonol (cuya diversidad radica en las diferentes posiciones del grupo –OH), es decir, una sustancia química que pertenece a los flavonoides. Se puede encontrar tanto en plantas, donde sirven como colorante, como en frutas y verduras. (Sahu et al., 2014).

La fisetina es un potente activador de las sirtuinas. (En concreto de la sirtuina I) (Yang et al., 2007) ; Estas enzimas están codificadas por el gen SIRT1, estudios han revelado que la fisetina aumenta la expresión de este gen (Kim et al., 2015). Este gen se cree que es un regulador clave de la supervivencia celular en momentos de estrés.

La fisetina presenta propiedades antisenescentes debido a la reducción de la expresión del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) mediante regulación epigenética. (Hayakawa et al., 2015) Por lo tanto se sospecha que actuará en contra de los efectos del envejecimiento.



**Fig 5:** Representación química de la fisetina, en la que aparece destacado el radical hidroxilo (-OH) en el C3, característico de los flavonoles.

La fisetina tiene mayor interés en la senescencia celular, debido a su efecto antisenolítico; Ha sido probada en distintos modelos que han sufrido una inducción de senescencia, mostrando su efectividad reduciendo marcadores senescentes, incluso en animales de edad avanzada, lo que sugiere que es inmediatamente traducible. (Yousefzadeh et al., 2018).

Es importante destacar que en los estudios realizados, la bibliografía informa de que no se han encontrado efectos adversos de la fisetina, incluso cuando se administra a dosis altas. (Maher, 2015).

# **OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO**

---

## **Planteamiento:**

Dado que las sustancias oxidantes y la radiación UVB inducen senescencia, se propone estudiar los efectos senescentes de mostaza nitrogenada, sobre un cultivo de fibroblastos humanos, a lo largo del tiempo, lo que permitiría conseguir un modelo de inducción de senescencia celular con mejoras respecto a otros inductores volátiles como el peróxido de hidrógeno.

Habiéndose descrito que la fisetina actúa como protector antirradicales libres, se plantea estudiar los efectos de esta sobre la inducción de senescencia tanto en un modelo de fibroblastos, como en otro de queratinocitos, ambos irradiados con radiación UVB.

Finalmente se ha utilizado una técnica de medida de senescencia a partir del incremento de la actividad  $\beta$ -galactosidasa (a pH alcalinizado) medida por citometría de imagen.

## **Objetivos:**

- En primer lugar la puesta en marcha de una técnica que nos permita detectar y cuantificar células senescentes *in vivo* mediante citometría de imagen gracias a SA- $\beta$ -Gal y al reactivo C<sub>12</sub>FDG.
- Estudiar el efecto senescente de un agente oxidante, la mostaza nitrogenada MN, a lo largo del tiempo en fibroblastos.
- Estudiar del efecto senescente inducido mediante radiación UVB en queratinocitos HaCat y fibroblastos humanos.
- Analizar y estudiar el efecto protector de la fisetina tanto en fibroblastos como en queratinocitos sometidos a radiación UVB.



# MATERIAL Y MÉTODOS

---

## Material

### Equipos

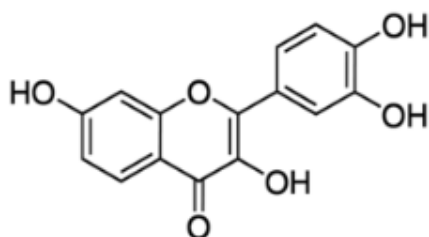
- Microscopio Invertido de Fluorescencia Nikon® Eclipse TE 2000 S
- Cámara de Neubauer
- Centrifuga (Eppendorf® Centrifuge 5810 R)
- Estufa de cultivo (BINDER®): 37°C y 5% CO<sub>2</sub>
- Cabina de seguridad biológica clase II (Telstar® Bio-II-A)
- Balanza electrónica AND® HR-120
- Baño termostático (Nahita®)
- pHmetro (CRISON®, microH 2002)
- Placas de 6 y 12 pocillos
- Agitador de placas
- Citómetro de imagen (AMNIS® ImageStream X (Seattle, WA, USA) (**Fig 5**): El ImageStreamX combina la captura microscópica de imágenes a alta velocidad con la citometría de flujo, para crear una plataforma estadísticamente sólida, ofreciendo una amplia gama de nuevas aplicaciones de análisis celular. Esta técnica permite proporcionar un medio conveniente para la obtención de imágenes y análisis de células directamente en fluidos corporales en aplicaciones clínicas.(Basiji et al., 2007).
- Lámpara de irradiación UVB QUICKTRONIC® INSTANT START.



**Fig 5:** Fotografía del citómetro de imagen AMNIS ISX100 conectado a las pantallas para permitir visualización. SAI. Servicio de Apoyo a la Investigación. Universidad de Zaragoza.

## Material biológico

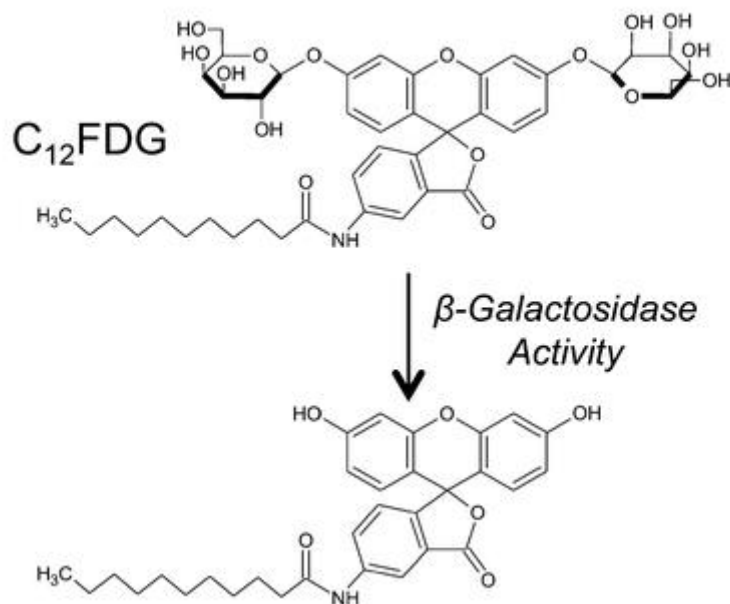
- Fibroblastos dérmicos procedentes de cultivo primario de piel humana (Departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Medicina).
- Queratinocitos epidérmicos procedentes de cultivo primario de piel humana (Departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Medicina).
- Medio DMEM completo para el mantenimiento del cultivo celular. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 4,5 g/L Glucose with L-Glutamine, Lonza, BioWhittaker®, BE12-604F) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina).
- Fisetina (Compuesto natural, un flavonoide, presente en frutas comunes como las fresas o las manzanas). **Fig 5**.



**Fig 5:** La imagen muestra la fórmula química de la fisetina, utilizada en los experimentos para determinar y estudiar su poder protector frente a la radiación UVB.

## Otros reactivos

- Tampón fosfato salino esteril para cultivo celular (PBS, 0.0067M (PO<sub>4</sub>), Lonza, BioWhittaker®, BE17-516Q).
- Tripsina 1X (Cultek, 91L0930-100).
- Solución de calibración para OSMOMAT (Calibration solution 300mOsmol/kg NaCl/H<sub>2</sub>O, Gonotec 3393C41).
- C<sub>12</sub>FDG (5-Dodecanoilaminofluorescein Di-β-D-Galactopiranosido). Sustrato fluorogénico para β-Galactosidasa. ID:ED03235. Carbosynth. Esta molécula permeable a la membrana, se hidroliza por acción de la β-galactosidasa enriquecida en las células senescentes. Tras la hidrólisis y la excitación con láser, el C<sub>12</sub>FDG emite fluorescencia verde, y por lo tanto puede detectarse por citometría. (Cahu and Sola, 2013). (**Fig 5**).
- NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (Bicarbonato de amonio).
- DMSO (Dimetil sulfoxido).



**Fig 6:** La imagen muestra el reactivo fluorogénico C<sub>12</sub> FDG. La cadena hidrofóbica de 12 carbonos ayuda a cruzar la membrana celular donde la β-galactosidasa, el producto del gen lacZ, escinde los dos grupos de azúcar, lo que da como resultado un producto ópticamente activo que se acumula en la célula. Tomada de Cellular heterogeneity and live cell arrays. (Walling and Shepard, 2011)

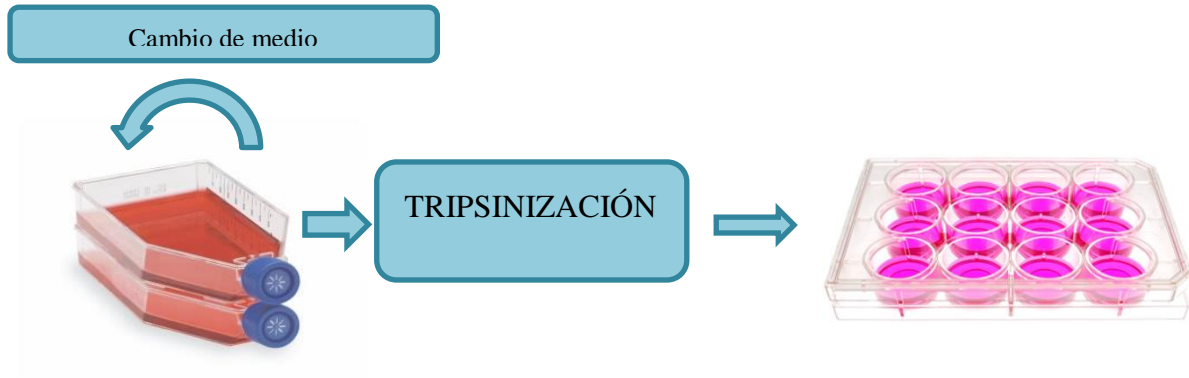
## Métodos

### 1. Cultivo celular

En este trabajo, el cultivo celular empleado se ha obtenido a través de una línea de fibroblastos primarios de piel humana obtenidos del departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Medicina.

Las células se han mantenido en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, con medio DMEM suplementado al 10% con STF.

Las condiciones de la estufa han sido de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se cambiaba cada tres o cuatro días. Al llegar al 90-95% de confluencia celular, se ha tripsinizado y subcultivado (ya que alcanzado este nivel de confluencia celular se agotan los nutrientes del medio y las células no pueden continuar dividiéndose) en placas de 12 pocillos (0,4-0'8 mL/pocillo) a una concentración aproximada de 100 células/mL. El trabajo con las células se ha realizado en todo momento bajo condiciones de esterilidad en la cabina de seguridad biológica.



**Fig 7:** La imagen muestra el esquema seguido para el mantenimiento de los cultivos celulares. (Figura por el autor).

## 2. Tripsinización

Este proceso es necesario para despegar las células que crecen adheridas a la superficie del frasco tras alcanzar un 90-95 % de confluencia celular.

Se sigue el siguiente protocolo, manteniendo siempre las condiciones de esterilidad:

En primer lugar, extraer el medio de cultivo y lavar los frascos hasta dos veces con PBS para así retirar todas aquellas proteínas que en caso de estar presentes al añadir la tripsina, impedirían que esta realizara su acción sobre las células.

Tras el lavado, se retira el PBS y se añade la tripsina (1 mL diluida en 5 mL de PBS) previamente atemperada a 37°C y se deja actuar 5 minutos en la estufa.

Al observar al microscopio óptico el despegamiento celular hay que proceder a la detención de la reacción, la cual se consigue mediante la aplicación de frío (con una base de hielo) y la adición de 10 mL de medio DMEM (10 % STF).

A continuación se procede a centrifugar a 850 rpm durante 4 minutos, obteniendo así el *pellet* de células deseado y el sobrenadante, este último será desechado para así resuspender el *pellet* en el volumen deseado de medio DMEM.

Por último se procede a la distribución de la mezcla en placas de 12 pocillos y se lleva a la estufa en condiciones de 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

## 3. Determinación de la senescencia celular

Una célula en estado fisiológico óptimo tiene en su citoplasma los lisosomas a un pH 4; Siendo que el pH citoplasmático es de 7,2.

La actividad beta galactosidasa asociada a senescencia (SA β-gal), la cual es objeto de estudio en la determinación de células senescentes es posible detectarla gracias a un

mayor contenido lisosomal a un pH sub óptimo de 6 (Kurz et al., 2000), por ello para la determinación de células senescentes se diseña el siguiente protocolo:

-Alcalinización del pH lisosomal: En la literatura es frecuente el uso de bafilomicina A1 (Debacq-Chainiaux et al., 2009) o de sales, como el cloruro de amonio  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Lucien et al., 2014). En este caso se ha innovado alcalinizando los lisosomas mediante  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  (Pm: 70,06 g/mol). Tomando 7,9 gramos de la sal y diluyendo en 100 mL de  $\text{dH}_2\text{O}$  obtenemos una concentración de 1 M, de la cual tomaremos el volumen necesario (20  $\mu\text{L}$  en 1 mL) para así obtener una concentración final de 20 mM. Finalmente tras añadir 20  $\mu\text{L}$ , incubaremos en la estufa 30 minutos a 37°C.

-Determinación de la actividad SA- $\beta$ -Gal: Utilizando el reactivo fluorogénico  $\text{C}_{12}\text{FDG}$ , que es capaz de atravesar la membrana celular se ha de preparar una disolución 20 mM (disolviendo 2 mg en 117  $\mu\text{L}$  de DMSO), de la cual añadiremos a las muestras una dilución 1:10 (para alcanzar una concentración 2 mM).

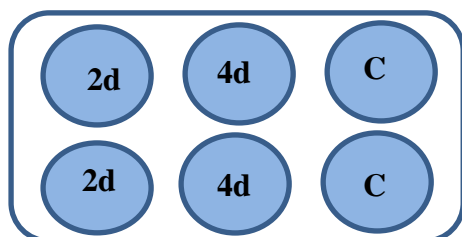
-Ensayo: Una vez tripsinizadas y centrifugadas las células, se procede a la alcalinización del pH lisosomal con su posterior incubación 30 minutos. Posteriormente, añadiremos el sustrato fluorogénico encargado de determinar la actividad SA- $\beta$ -Gal y volveremos a incubar 90 minutos, tras esto llevaremos la muestra resultante a analizar al citómetro de imagen AMNIS®. ( $\lambda_{\text{excitación}}= 488 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{\text{emisión}}= 520 \text{ nm}$ )

#### 4. Estudio de la mostaza nitrogenada como inductor de senescencia

En este experimento se evaluará el efecto de la mostaza nitrogenada, MN, como inductor de senescencia celular en función del tiempo sobre fibroblastos humanos.

Se trabaja con una concentración de 100  $\mu\text{M}$  ya que a partir de 150  $\mu\text{M}$  comienza a ser letal para las células y es de interés que estén vivas, para ello se prepara 10 mM de MN (Pm: 178,49 g/mol) para añadir una disolución 1:100 de esta y así obtener una concentración de 100  $\mu\text{M}$ .

El procedimiento es el siguiente:



**Fig 8:** Plantilla que representa placa de 6 pocillos para el estudio de la mostaza nitrogenada como inductor de senescencia. (Figura del autor).

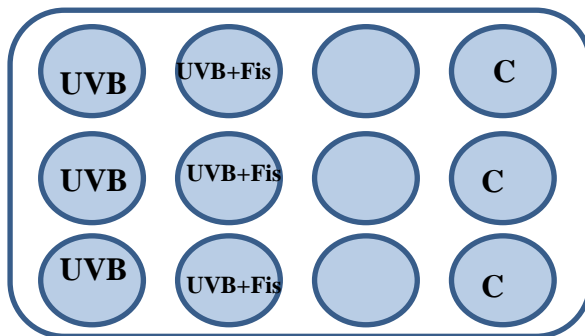
Siguiendo el esquema de la **Figura 7**, se establece una siembra de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/mL en cada pocillo. En los pocillos marcados como “2d” y “4d” se añade una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de MN. Los pocillos marcados como “C” nos servirán para un posterior control.

- 2 días tras la adición de MN se procede a aplicar el protocolo de determinación de senescencia celular (materiales y métodos 3.) a la primera columna de pocillos (2d).
- 2 días tras la adición de MN también se estudia la última columna de pocillos (C), donde C nos servirá de control al añadir 100  $\mu\text{M}$  de MN *in situ*, es decir, minutos antes de pasar las muestras por el citómetro, para así asegurarnos de que la fluorescencia obtenida no es un producto de la interacción de  $\text{C}_{12}\text{FDG}$  con MN.
- 4 días tras la adición de MN se procede a aplicar el protocolo de determinación de senescencia celular (materiales y métodos 3.) a la segunda columna de pocillos (4d).

## 5. Estudio de radiación UVB como inductor de senescencia sobre fibroblastos humanos y efecto protector de la fisetina.

En este experimento se evaluará el efecto senescente de la radiación UVB y al mismo tiempo el efecto protector de la fisetina.

El esquema de trabajo es el siguiente:



**Fig 9:** Representación esquemática de la placa de 12 pocillos utilizada en este experimento. (Figura del autor).

Siguiendo el esquema de la **figura 7**, se inicia este experimento sembrando aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/mL. Esta figura muestra una representación la que se irradiaran las columnas 1 y 2 (UVB y UVB+Fis), mientras que en las columnas 3 y 4(C) no, ya que C actuará de control. La concentración de fisetina añadida es la misma en ambas columnas, 2  $\mu\text{M}$ .

Tiempo (segundos)	Dosis de irradiación ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )
300	1,8
900	5,6
1800	11,8
2700	16,8

**Fig 10:** Tabla que muestra la relación tiempo-irradiación para una distancia fija, ya que las muestras se mantienen a una distancia fija. Estas calibraciones han sido llevadas a cabo por este equipo previamente a través del instrumento GENTEC®SOLO2 y su detector UP®K19

Tras someter a la radiación UVB ( $1,8\text{J}/\text{cm}^2$ ) l: se tapan con papel de aluminio para evitar que sean irradiadas, para el control se utiliza la última columna con el fin de que este lo más alejada posible de la radiación

(disminuir la temperatura de la sala donde se encuentra la lámpara para que el papel de aluminio no acumule calor y dañe las células de los pocillos de la columna 4).

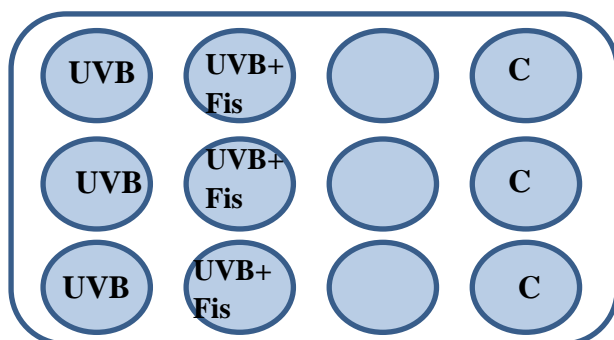
Posteriormente la placa se incuba en la estufa durante 72 horas y se procede a la determinación de senescencia con el reactivo fluorogénico C<sub>12</sub>FDG mediante el citómetro de imagen utilizando el protocolo diseñado anteriormente (materiales y métodos 3).

## 6. Estudio de radiación UVB como inductor de senescencia sobre queratinocitos HaCaT y efecto protector de la fisetina.

Este experimento es similar al anterior, pero variando el tipo de células para posteriormente poder comparar que células son más susceptibles a desarrollar senescencia por irradiación UVB.

Se evaluará el efecto senescente de la radiación UVB y al mismo tiempo el efecto protector de la fisetina.

El esquema de trabajo es el siguiente:



*Fig 11: Representación esquemática de la placa de 12 pocillos utilizada en este experimento. (Figura del autor).*

Siguiendo el esquema de la **figura 7**, se inicia este experimento sembrando aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/mL. Esta figura muestra una representación en espejo, es decir que se irradiarían las columnas 1 y 2 (UVB y UVB+Fis), mientras que las columnas 3 y 4 (C) no, ya que C actuará de control. La concentración de fisetina añadida es la misma en ambas columnas, 2  $\mu$ M.

Tras someter a la radiación UVB (1,8 J/cm<sup>2</sup> según la equivalencia mostrada en la **Fig10** las columnas 1 y 2, las columnas 3 y 4 se tapan con papel de aluminio para evitar que sean irradiadas (disminuir la temperatura de la habitación donde se encuentra la lámpara para que el papel de aluminio no acumule calor y afecte a las células de los pocillos de la columna 4).

Posteriormente la placa se incuba en la estufa durante 4 días y se procede a la determinación de senescencia descrita anteriormente (materiales y métodos 3).

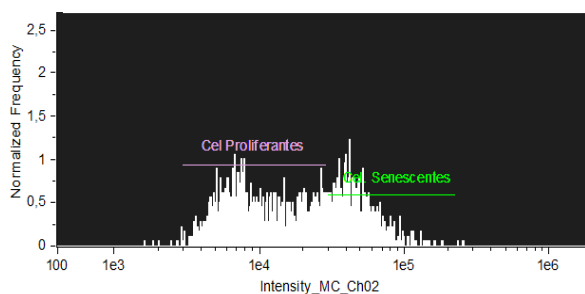
# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se han dividido en en tres bloques de experimentos. En el primero se estudia los efectos inductores de senescencia ocasionada por MN en función del tiempo sobre fibroblastos humanos.

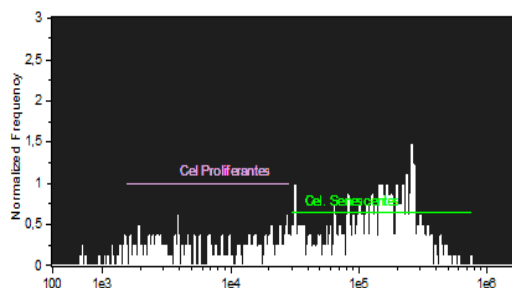
En el segundo y tercer bloque, se analizan tanto los efectos senescentes de la radiación UVB, como el efecto protector que ejerce la fisetina en cultivos de fibroblastos y de queratinocitos.

## 1. Efecto de mostaza nitrogenada como inductor de senescencia en cultivo celular de fibroblastos humanos.

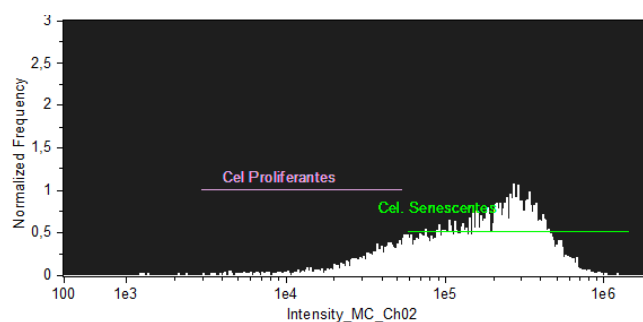
### A) Control *in situ* a los 2 días



### B) Células con MN a los 2 días



### C) Células con MN a los 4



**Fig12:** Diferencias en la actividad  $\beta$ -galactosidasa en fibroblastos determinada mediante citometría de imagen a los dos y cuatro días tras el tratamiento con mostaza nitrogenada. Cursor verde células senescentes; Cursor rosa células proliferantes.

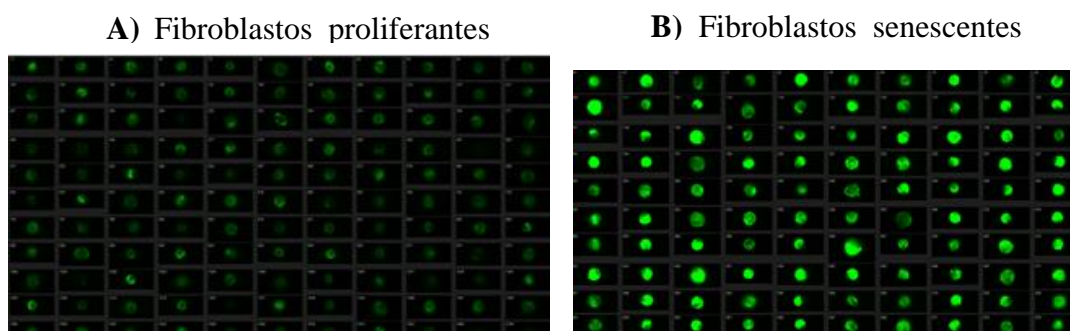
En la **Fig 12** se observan las imágenes obtenidas por citometría de imagen de las poblaciones celulares estudiadas en este experimento. En cada imagen se puede apreciar en el eje de abscisas la intensidad de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, la cual es medible gracias al reactivo  $C_{12}FDG$  en el canal 2 del citómetro (490-560 nm); Mientras que el eje de ordenadas muestra el número de células que emiten cada intensidad de la fluorescencia verde.

En función de la intensidad de la actividad enzimática se pueden apreciar dos poblaciones celulares diferenciadas, las células proliferantes y las senescentes; Esto es posible gracias a que en la hidrólisis del fluorocromo  $C_{12}FDG$  por la enzima  $\beta$ -



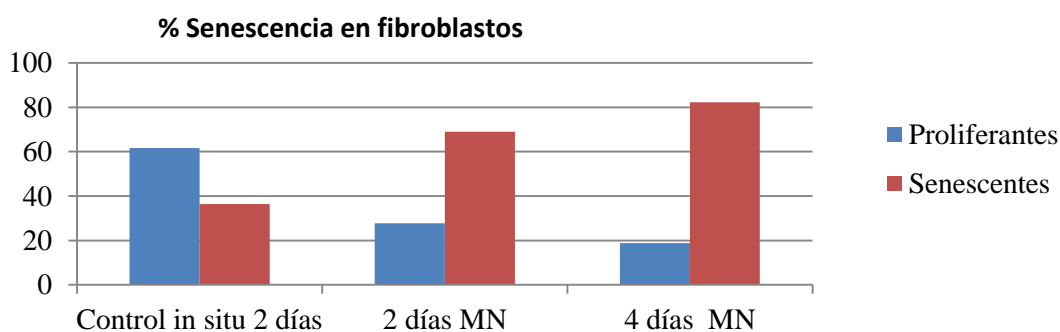
Galactosidasa, emite fluorescencia verde detectándose de este modo una mayor intensidad lumínica en el citómetro.

Este incremento de actividad  $\beta$ -galactosidasa se utiliza como marcador en las células senescentes (SA- $\beta$ -Gal). (**Fig13**)



**Fig 13:** Diferencias en la intensidad de fluorescencia verde entre células proliferantes (A) y células senescentes (B) mediante citometría de imagen utilizando el reactivo  $C_{12}FDG$ .

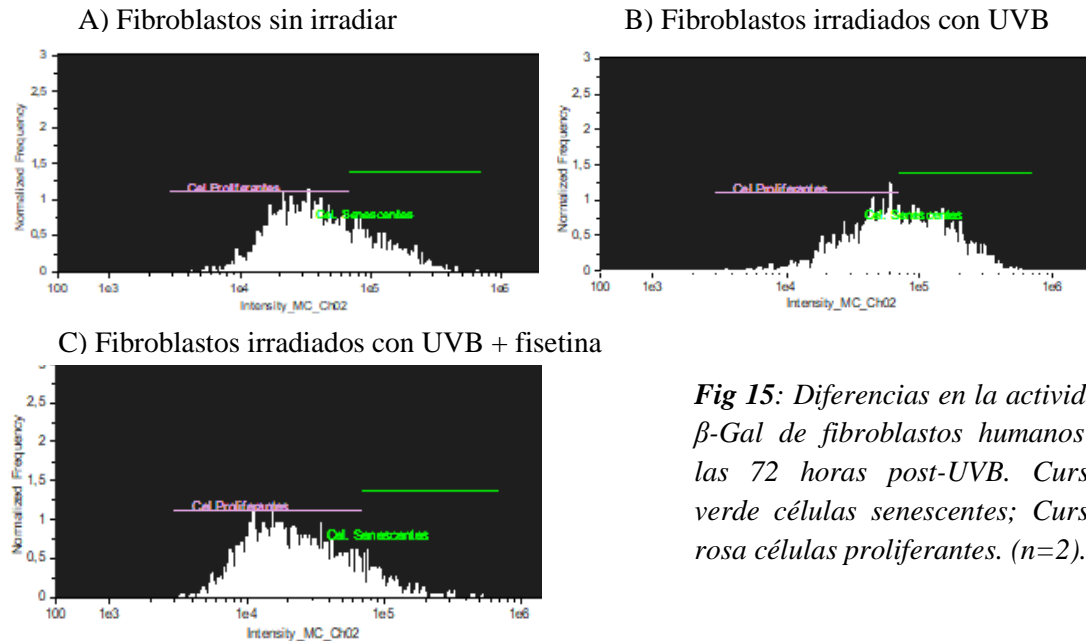
Este experimento se encuentra resumido en la siguiente figura (**Fig 14**), en la que se sugiere el efecto inductor de senescencia que tiene la MN (100  $\mu$ M) sobre un cultivo de fibroblastos humanos, tanto a los 2 como a los 4 días, mediante la técnica anteriormente comentada.



**Fig 14:** Efecto de la mostaza nitrogenada sobre fibroblastos humanos a los 2 y 4 días.

El resultado obtenido muestra que cuanto mayor es el tiempo que los fibroblastos están en contacto con MN, mayor cantidad de células senescentes se aprecian. Lo que sugiere a la MN cómo un posible inductor de senescencia, que podría ser debido a su efecto oxidante (Noren Hooten and Evans, 2017).

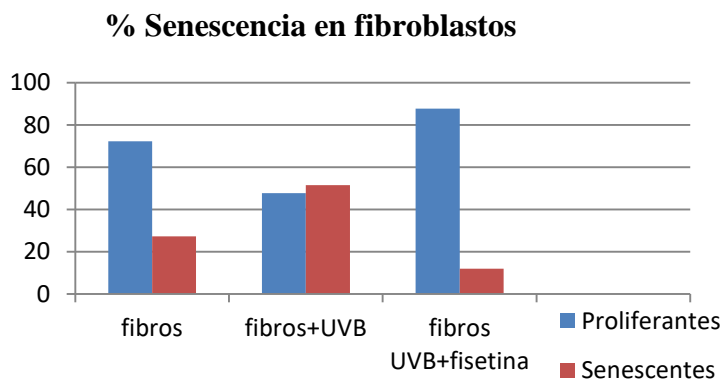
## 2. Estudio de la radiación UVB como inductor de senescencia sobre fibroblastos humanos y efecto protector de la fisetina.



**Fig 15:** Diferencias en la actividad  $\beta$ -Gal de fibroblastos humanos a las 72 horas post-UVB. Cursor verde células senescentes; Cursor rosa células proliferantes. (n=2).

En la **Fig 15** se observa lo comentado en la **Fig 12**, en cuanto a la fluorescencia producida por la actividad  $\beta$ -Gal, mediante la hidrólisis del reactivo C<sub>12</sub>FDG por citometría de imagen.

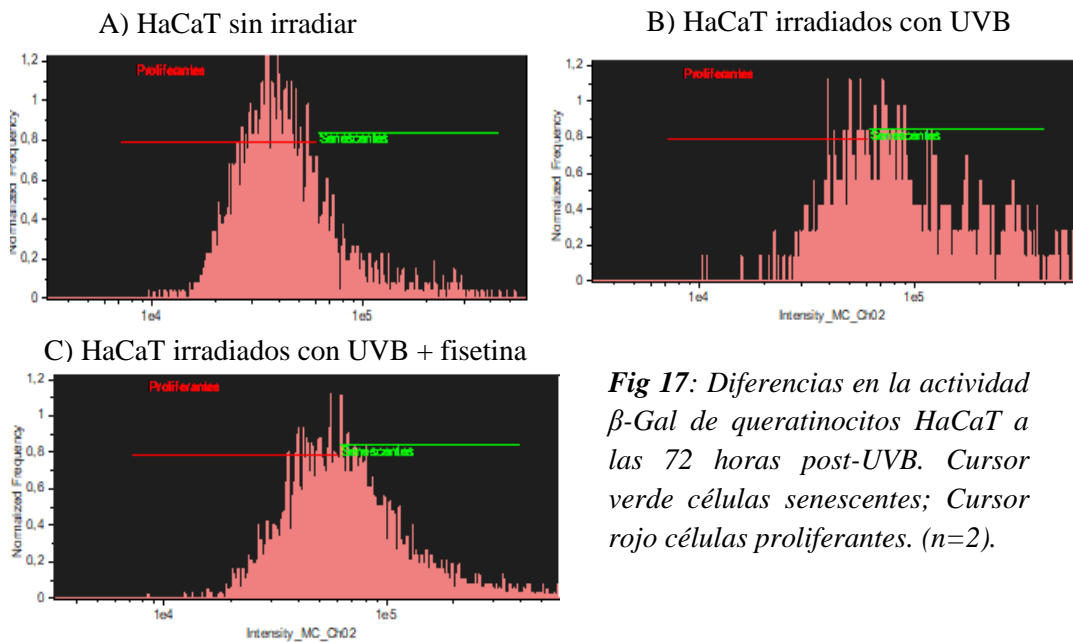
Este experimento se encuentra resumido en la **Fig 16**, en la que se sugiere la inducción de senescencia mediante la radiación UVB y el efecto protector ejercido por la fisetina.



**Fig 16:** Efecto de la radiación UVB a las 72 horas sobre fibroblastos humanos, tratados con y sin fisetina.

Los resultados obtenidos en la **Fig 16**, sugieren que *a priori* los fibroblastos presentan algo de senescencia (puede ser debido a que era una línea celular mantenida en el tiempo), pero que esta aumenta al ser tratados con radiación UVB; Por el contrario se aprecia que al ser tratados con fisetina, esta ejerce un efecto protector frente a la senescencia. (Kim et al., 2015).

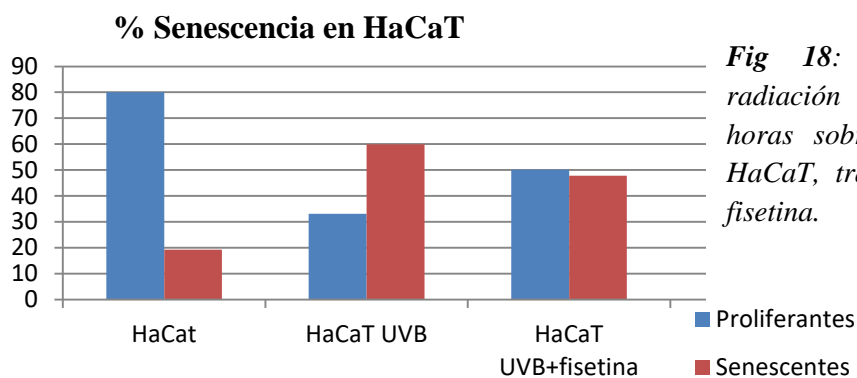
### 3. Estudio de la radiación UVB como inductor de senescencia sobre queratinocitos HaCaT y efecto protector de la fisetina.



**Fig 17:** Diferencias en la actividad  $\beta$ -Gal de queratinocitos HaCaT a las 72 horas post-UVB. Cursor verde células senescentes; Cursor rojo células proliferantes. (n=2).

En la **Fig 17** se observa lo comentado en la **Fig 12**, en cuanto a la fluorescencia producida por la actividad  $\beta$ -Gal, mediante la hidrólisis del reactivo C<sub>12</sub>FDG por citometría de imagen.

Este experimento se encuentra resumido en la **Fig 18**, en la que se sugiere la inducción de senescencia mediante la radiación UVB y el efecto protector ejercido por la fisetina.



**Fig 18:** Efecto de la radiación UVB a las 72 horas sobre queratinocitos HaCaT, tratados con y sin fisetina.

Los resultados obtenidos en la **Fig 18**, sugieren que los queratinocitos al ser tratados con radiación UVB aumentan la senescencia a las 72 horas, mientras que la muestra tratada con fisetina presenta un menor porcentaje de senescencia celular; Esto parece indicar un efecto protector de la fisetina frente a la senescencia en otro modelo celular distinto de los fibroblastos.

## CONCLUSIONES

---

- Se ha puesto en marcha una modificación de la técnica de medida de actividad  $\beta$ -Galactosidasa asociada a senescencia por citometría, con resultados coherentes con lo esperado.
- Se sugiere que la mostaza nitrogenada incrementa la senescencia celular, lo que puede ser utilizado como modelo de la inducción de la senescencia estable.
- La radiación UVB produce un incremento de la actividad  $\beta$ -Galactosidasa asociada a la senescencia *in vitro* tanto en fibroblastos humanos como en queratinocitos HaCaT. Una dosis única de 1,8 J/cm<sup>2</sup> de radiación UVB produjo un incremento relativo de la actividad  $\beta$ -Galactosidasa de 51,9 % y 59,9 % respectivamente.
- La fisetina a una concentración de 2  $\mu$ M proporciono en el experimento realizado una protección disminuyendo la inducción de senescencia por radiación UVB tanto en fibroblastos humanos como en queratinocitos HaCaT.

## CONCLUSIONS

---

- A modification of the technique about measure of senescence associated  $\beta$ -Galactosidase activity through cytometry has been launched, with results consistent as expected.
- It's suggested that nitrogen mustard increases cellular senescence, which can be used as a induction's model of stable senescence.
- UVB radiation produces an increase in senescence associated  $\beta$ -Galactosidase activity *in vitro* in human fibroblasts and HaCaT keratinocytes. A single dose of 1.8 J/cm<sup>2</sup> of UVB radiation produced a relative increase in  $\beta$ -Galactosidase activity of 51,9 % and 59,9 % respectively.
- Fisetin at 2  $\mu$ M concentration provided protection in the experiment reducing the senescence's induction by UVB radiation in human fibroblasts and HaCaT keratinocytes.

# BIBLIOGRAFÍA

---

## RECURSOS BIBLIOGRÁFICOS

Las referencias bibliográficas se muestran según el marco de referencia bibliográfica “Harvard”; Han sido citadas y utilizadas mediante el gestor bibliográfico “EndNote”.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBADIE, C., PLUQUET, O. & POURTIER, A. 2017. Epithelial cell senescence: an adaptive response to pre-carcinogenic stresses? *Cell Mol Life Sci*, 74, 4471-4509.
- BARTENEVA, N. S., FASLER-KAN, E. & VOROBEV, I. A. 2012. Imaging flow cytometry: coping with heterogeneity in biological systems. *J Histochem Cytochem*, 60, 723-33.
- BASIJI, D. A., ORTYN, W. E., LIANG, L., VENKATACHALAM, V. & MORRISSEY, P. 2007. Cellular image analysis and imaging by flow cytometry. *Clin Lab Med*, 27, 653-70, viii.
- 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, 661-671.
- CAHU, J. 2013. SASP: roadblock for tissue re-organization. *Aging (Albany NY)*, 5, 641-2.
- CAHU, J. & SOLA, B. 2013. A sensitive method to quantify senescent cancer cells. *J Vis Exp*.
- CALDWELL, M. E., DENICOLA, G. M., MARTINS, C. P., JACOBETZ, M. A., MAITRA, A., HRUBAN, R. H. & TUVESON, D. A. 2012. Cellular features of senescence during the evolution of human and murine ductal pancreatic cancer. *Oncogene*, 31, 1599-608.
- CHOI, S. Y., BIN, B. H., KIM, W., LEE, E., LEE, T. R. & CHO, E. G. 2018. Exposure of human melanocytes to UVB twice and subsequent incubation leads to cellular senescence and senescence-associated pigmentation through the prolonged p53 expression. *J Dermatol Sci*, 90, 303-312.
- DE MAGALHAES, J. P. & PASSOS, J. F. 2018. Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mech Ageing Dev*, 170, 2-9.
- DEBACQ-CHAINIAUX, F., ERUSALIMSKY, J. D., CAMPISI, J. & TOUSSAINT, O. 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*, 4, 1798-806.
- FERNANDEZ LARROSA, P. N., RUIZ GRECCO, M., ALVARADO, C. V., MICENMACHER, S., AGUIRRE, C., MARTINEZ NOEL, G., COSTAS, M. A. & RUBIO, M. F. 2011. [Rapamycin effect on senescence and autophagy processes in human cell lines]. *Medicina (B Aires)*, 71, 238-42.
- HAYAKAWA, T., IWAI, M., AOKI, S., TAKIMOTO, K., MARUYAMA, M., MARUYAMA, W. & MOTOYAMA, N. 2015. SIRT1 suppresses the senescence-associated secretory phenotype through epigenetic gene regulation. *PLoS One*, 10, e0116480.
- KIM, S. C., KIM, Y. H., SON, S. W., MOON, E. Y., PYO, S. & UM, S. H. 2015. Fisetin induces Sirt1 expression while inhibiting early adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 467, 638-44.
- KUILMAN, T., MICHALOGLU, C., MOOI, W. J. & PEEPER, D. S. 2010. The essence of senescence. *Genes Dev*, 24, 2463-79.
- KURZ, D. J., DECARY, S., HONG, Y. & ERUSALIMSKY, J. D. 2000. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, 113 ( Pt 20), 3613-22.
- 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 beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 5, 187-95.

- LUCIEN, F., HARPER, K., PELLETIER, P. P., VOLKOV, L. & DUBOIS, C. M. 2014. Simultaneous pH measurement in endocytic and cytosolic compartments in living cells using confocal microscopy. *J Vis Exp*.
- LUK, H. Y., MCFARLIN, B. K. & VINGREN, J. L. 2017. Using image-based flow cytometry to monitor satellite cells proliferation and differentiation in vitro. *Methods*, 112, 175-181.
- MAHER, P. 2015. How fisetin reduces the impact of age and disease on CNS function. *Front Biosci (Schol Ed)*, 7, 58-82.
- NOREN HOOTEN, N. & EVANS, M. K. 2017. Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence. *J Vis Exp*.
- SAHU, B. D., KALVALA, A. K., KONERU, M., MAHESH KUMAR, J., KUNCHA, M., RACHAMALLA, S. S. & SISTLA, R. 2014. Ameliorative effect of fisetin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats via modulation of NF-kappaB activation and antioxidant defence. *PLoS One*, 9, e105070.
- SINGH, M. & PIEKORZ, R. P. 2013. Senescence-associated lysosomal alpha-L-fucosidase (SA-alpha-Fuc): a sensitive and more robust biomarker for cellular senescence beyond SA-beta-Gal. *Cell Cycle*, 12, 1996.
- VAN DEURSEN, J. M. 2014. The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509, 439-46.
- WALLING, M. A. & SHEPARD, J. R. 2011. Cellular heterogeneity and live cell arrays. *Chem Soc Rev*, 40, 4049-76.
- YANG, H., BAUR, J. A., CHEN, A., MILLER, C., ADAMS, J. K., KISIELEWSKI, A., HOWITZ, K. T., ZIPKIN, R. E. & SINCLAIR, D. A. 2007. Design and synthesis of compounds that extend yeast replicative lifespan. *Aging Cell*, 6, 35-43.
- YOUSEFZADEH, M. J., ZHU, Y., MCGOWAN, S. J., ANGELINI, L., FUHRMANN-STROISSNIGG, H., XU, M., LING, Y. Y., MELOS, K. I., PIRTSKHALAVA, T., INMAN, C. L., MCGUCKIAN, C., WADE, E. A., KATO, J. I., GRASSI, D., WENTWORTH, M., BURD, C. E., ARRIAGA, E. A., LADIGES, W. L., TCHKONIA, T., KIRKLAND, J. L., ROBBINS, P. D. & NIEDERNHOFER, L. J. 2018. Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine*, 36, 18-28.



