



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA SENESCENCIA CELULAR SOBRE
EL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS DE ARILO EN
ASTROCITOS DE RATÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

TORRES AGUILAR PABLO

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MÓNICA ADRIANA TORRES RAMOS

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2021





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1.- DATOS DEL ALUMNO

Torres
Aguilar
Pablo
55 28 85 11 98
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
312312206

2.- DATOS DEL TUTOR

Dra.
Mónica Adriana
Torres
Ramos

3.- DATOS DEL SINODAL 1

Dr.
Octavio César
García
González

4.- DATOS DEL SINODAL 2

Dr.
Jorge Humberto
Limón
Pacheco

5.- DATOS DEL SINODAL 3

Dr.
Josué Orlando
Ramírez
Jarquín

6.- DATOS DEL SINODAL 4

Dra.
Gisele Olivia
Rosas
Solares

7.- DATOS DE LA TESIS

Efecto de la senescencia celular sobre el receptor de hidrocarburos de arilo en
astrocitos de ratón
pp.67
2020

Este trabajo fue realizado en la Unidad Periférica de Neurociencias del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” bajo el proyecto “Neuroinflamación crónica durante el envejecimiento como factor de riesgo de enfermedades neurológicas: Participación del receptor de hidrocarburos de arilo en astrogliosis y neurodegeneración” financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (CONACYT-FOSISS 262295) con número de registro INNN-156/16.

A mis maestros de la vida

Agradecimientos

A todos aquellos que me apoyaron para la realización de esta tesis.

A la Dra. Mónica Torres, que involucro su tiempo y esfuerzo para guiarme en la realización de este proyecto, así como su confianza y la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

A los miembros de mi jurado, el Dr. Octavio García, Dr. Jorge Limón, Dr. Josué Orlando Ramirez-Jarquín, Dra. Giselle Rosas y Dr. Fernando Fernández por su apoyo a la revisión de este trabajo.

A la Dra. Marisol y a la Dra. Norma Serrano por ayudarme con materiales y reactivos indispensables para el trabajo así como sus consejos y enseñanzas para el trabajo adecuado en laboratorio. A la Dra. Alma Ortiz, Dra. Juana Villeda y Dra. Francisca Fernández, del laboratorio de patología experimental, por los espacios, tiempo e instrucciones proporcionadas para el manejo adecuado del microscopio de fluorescencia.

A mis padres el médico José Francisco Torres y la Mtra. María Esther Aguilar y a mi hermano Andrés por ser parte de mi vida y apoyarme en cada una de mis decisiones, por su sudor y esfuerzo así como darme los momentos más felices de mi vida. A mis abuelos, Dr. Ariosto Aguilar y Francisco Torres que en paz descansen, que me inspiraron a entrar en el ámbito científico. Por sus consejos y por su guía así como un ejemplo a seguir de humanismo hacia la importancia de la enseñanza

A mi amigo de toda la vida Iván, por estar siempre a mi lado y ser de las personas más leales que conozco. Por ser un modelo a seguir, que no importa

cuánto la vida golpee, uno siempre debe levantarse y seguir luchando. Por darme recuerdos y vivencias que nunca voy a olvidar. A mi amigo de la carrera Joel por enseñarme muchas cosas que desconocía de la carrera, por ser un instructor, un maestro y un guía. A mi amiga de la carrera Mariana que me ayudó a superar momentos difíciles y a instruirme en el mundo musical. Y a todos mis amigos de facultad, instituto, Universum y preparatoria, parejas y sobre todo, a mis maestros de la vida que formaron a la persona que soy hoy. Gracias a todos ustedes y a mi país en el que nací, crecí y me dio la oportunidad de estar en la carrera.

Abreviaturas

UPS	Sistema ubiquitina proteosoma
SASP	Fenotipo de secreción asociado a senescencia
SNC	Sistema nervioso central
AHR	Receptor de hidrocarburos de arilo
β -gal	B-galactosidasa
GFAP	Proteína acida fibrilar glial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
VZ	Zona germinal ventricular
SVZ	Zona subventricular
SP	Zona subplata
CP	Placa cortical
EA	Enfermedad de Alzheimer
bHLH	basic Helix Loop Helix
PAS	Period/ARNT/Single minded
ARNT	Translocador nuclear del receptor de hidrocarburos de arilo
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo p-dioxina
IL-6	Interleucina-6

Contenido

Resumen.....	10
Marco Teórico	11
La Senescencia Celular.....	11
<u>El fenotipo de secreción asociado a senescencia</u>	<u>14</u>
<u>SASP como característica común de la senescencia independiente del tipo de inducción</u>	<u>16</u>
<u>El proteosoma en la senescencia celular</u>	<u>18</u>
Los Astrocitos.....	19
<u>Funciones de los astrocitos en el SNC y enfermedades asociadas</u>	<u>20</u>
<u>Efecto de la senescencia en los astrocitos.....</u>	<u>22</u>
Receptor de Hidrocarburos de Arilo	24
<u>Complejo de AHR (AHRC)</u>	<u>27</u>
<u>Ligandos de AHR.....</u>	<u>28</u>
<u>Activación del AHR.....</u>	<u>29</u>
<u>Funciones de AHR.....</u>	<u>33</u>
Antecedentes	34
Justificación.....	35
Hipótesis	35
Objetivo General.....	36
Objetivo Particulares.....	36
Material y Métodos	36
Cultivo primario de astrocitos corticales de ratón	36
Inducción de senescencia por inhibición de proteosoma.....	37
Ensayo de β-galactosidasa y conteo celular.....	38
Inmunofluorescencia	39
Análisis de intensidad de fluorescencia.....	41
Efecto de senescencia sobre AhR	41
Análisis estadístico	41
Resultados	42
Estandarización de cultivo celular de astrocitos de ratón y el sembrado en placas de cultivo	42
Efecto citotóxico del inhibidor de proteosoma MG132 en astrocitos corticales de ratón.....	44
La inhibición del proteosoma induce senescencia celular en astrocitos corticales de ratón.....	45
Cambio en la localización y aumento en la expresión del AhR en la senescencia inducida por estrés proteotóxico.....	50
Discusión.....	52
Inhibidor de proteosoma como generador de senescencia celular y SASP	52
AhR citoplasmático en astrocitos durante el estímulo proteotóxico.....	54
<u>Relación de la vía canónica de AhR y el proteosoma</u>	<u>54</u>
<u>Efecto de la densidad celular y su relación de AhR en astrocitos.....</u>	<u>55</u>
<u>Relación del AHR y la senescencia celular inducida por estrés proteotóxico</u>	<u>56</u>

Conclusión	60
Referencias.....	61

Resumen

La senescencia celular es un proceso natural asociada al envejecimiento en respuesta a diferentes tipos de estrés como lo es el oxidante y el proteotóxico. El sistema ubiquitina proteasoma (UPS, por sus siglas en inglés) es uno de los sistemas de degradación de proteínas disfuncionales, las cuales al no ser degradadas se acumulan, lo que puede conducir a senescencia celular. En la senescencia celular se desencadena una respuesta inflamatoria donde las células tienen un cambio fisiológico conocido fenotipo de secreción asociado a senescencia (SASP). El SASP es relevante en el sistema nervioso central (SNC), ya que se asocia con la aparición de enfermedades neurodegenerativas. Los astrocitos son células del cerebro que regulan al sistema inmune, cuando los astrocitos se alteran, como lo hacen cuando se presenta el SASP, generan diversas respuestas patológicas en el SNC. Existen diversas proteínas involucradas en la respuesta inflamatoria crónica que conduce a la senescencia. Una de estas proteínas es el receptor de hidrocarburos de arilo (AHR), quien también participa en la regulación de xenobióticos, en regulación del sistema ubiquitina proteasoma, diferenciación celular, proliferación celular, entre otras. La información de la participación de AHR en senescencia celular es escasa, por lo tanto, en este trabajo evaluamos la localización y expresión de AHR en la senescencia celular en astrocitos inducida por estrés proteotóxico. Después de estandarizar el cultivo de astrocitos corticales neonatos de la cepa de ratón C57BL/6, inducimos la senescencia celular mediante el inhibidor de proteasoma

MG-132. La senescencia de astrocitos se determinó con la actividad enzimática de la β -galactosidasa (β -gal) y con la expresión de la proteína pro inflamatoria interleucina 6 (IL-6) y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) usando la técnica de inmunofluorescencia, con la cual también se evaluó el AHR. En astrocitos con estrés proteotóxico confirmamos la senescencia al observar un aumento en la actividad de la β -gal y de expresión de IL-6 y GFAP. Los resultados muestran un aumento de la expresión y una localización predominantemente citoplasmática de AHR. Nuestros datos sugieren que el AHR, puede estar relacionados con mecanismos moleculares que desencadenan la respuesta senescente e inflamatoria.

Marco Teórico

La Senescencia Celular

La palabra senescencia deriva de la palabra en latín *senex*, cuyo significado indica anciano o edad avanzada, este término se usa indistintamente con el envejecimiento. Sin embargo, son dos procesos distintos. El envejecimiento se refiere generalmente a procesos de deterioro que siguen del desarrollo y maduración a través del tiempo; en cambio la senescencia celular se le ha definido como un proceso que se genera en respuesta ante el estrés o daño celular que a su vez se le atribuye como una vía alterna a la muerte celular programada (apoptosis) (Campisi, 2013). La senescencia celular fue descrita formalmente desde 1965 cuando Hayflick y cols., mostraron que las células normales tienen un límite en su habilidad de proliferación en cultivo (Hayflick, 1965). Este límite de proliferación empieza con el constante acortamiento de

telómeros con cada ronda de replicación, debido a que al final de este proceso los telómeros se replican de forma incompleta y como consecuencia se detiene el ciclo celular por el daño al DNA (Levy *et. al*, 1992). Otra causa para impedir la proliferación exitosa está en los altos niveles de cinasas dependientes de ciclina (a pesar de que las mismas células senescentes aún se estimulan para la proliferación) (Blagosklonny *et. al*, 2012), por ello un elemento genético que desempeña un papel principal en la regulación del ciclo celular, es la expresión de p16^{INK4a} producto del gen *cdkn2a* que inhibe selectivamente las cinasas 4 y 6 dependientes de ciclina D (CDK4 / CDK6). CDK4 / CDK6 fosforilan el supresor tumoral de retinoblastoma citoplasmático (RB) resultando en la disociación de RB y el complejo del factor de transcripción E2F. Esto propicia que E2F induzca la expresión de genes necesarios para la fase G1 (fase de crecimiento) y a la fase S (síntesis de DNA) del ciclo celular (Sharpless & Sherr, 2015) (Childs *et. al*, 2017). Por lo tanto, cuando p16INK4a inhibe CDK4 / CDK6, se impide que las células entren en el ciclo celular. Como evidencia de esto, estudios realizados en modelos de ratón con deficiencias en una proteína de punto de control mitótico (proteína BUBR1), codificada por el gen *Bub1b* demostraron una relación causal entre la aparición de células senescentes y el envejecimiento en tejidos envejecidos prematuramente como músculo esquelético, ojo y tejido adiposo que presentaron una acumulación en número de células senescentes positivas para p16^{INK4a} (Childs *et. al*, 2017). También se ha demostrado que la inactivación del gen *cdkn2a* bloquea la formación de células senescentes y atenúa el desarrollo de estos fenotipos de envejecimiento (Baker *et al.*, 2016).

La senescencia se visualiza como una etapa irreversible, que impide a las células nunca progresar a través del ciclo celular a pesar de que permanecen metabólicamente activas y se postula que esto previene la propagación del daño a generaciones celulares posteriores, por ejemplo, la transformación maligna de un cáncer (Pardo *et al.*, 2003). Sin embargo, para evitar la senescencia las células cancerígenas deben inhabilitar el control del ciclo celular ya sea por la pérdida de expresión de p16, p53, RB o la activación de c-myc (Blagosklonny *et al.*, 2012).

Las células senescentes se caracterizan por cambios en su morfología descritos como hipertrofia, es decir, aumento de volumen, alargamiento, adquisición de un citoplasma aplanado y altamente vacuolado. Además, son muy activas metabólicamente y su expresión génica se ve alterada. Estas alteraciones tienen efectos bivalentes en las células adyacentes es decir pueden ser benéficas o dañinas (Correira-Melo *et al.*, 2014) (González-Puertos *et al.*, 2015). Con el fin de observar estos cambios, se han desarrollado métodos para inducir el estado senescente celular, la mayoría mediante inducción de estrés fisiológico.

Acorde a los postulados de investigadores que sugieren que la senescencia es una vía que evita la aparición de neoplasias, existe evidencia que sugiere que la misma senescencia replicativa (“*Límite Replicativo de Hayflick*”) evolucionó para proteger a los eucariontes más derivados como son los mamíferos previniendo el desarrollo de un estado neoplásico es decir cáncer. La senescencia celular es un claro ejemplo de la pleiotropía antagónica evolutiva (un cambio puede favorecer algunas características de tantas y al mismo tiempo perjudicar otras),

por ejemplo, en humanos del sexo masculino es común desarrollar altos niveles de testosterona en edad fértil, pero en edad avanzada aumenta el riesgo de generar cáncer de próstata. En términos evolutivos debido al declive de la selección natural por la edad, los procesos de selección para promover la adecuación en organismos “jóvenes” puede tener efectos no deseables que no fueron seleccionados en organismos “viejos”. Esto explicaría por qué comúnmente no se desarrolla cáncer de forma temprana de manera común (Kirkwood, 1991).

El fenotipo de secreción asociado a senescencia

A pesar de que la senescencia celular representa una salida del ciclo celular que a su vez se le ha relacionado con varios procesos patológicos como el cáncer, podría parecer que su contribución fuera pasiva. Sin embargo, el descubrimiento de un fenotipo de secreción que afecta a las células contiguas ha demostrado una contribución más activa y patológicamente diversa. Este estado de secreción en la célula senescente se le ha denominado como “fenotipo de secreción asociado a senescencia” o por sus siglas en inglés “SASP” (senescence-associated secretory phenotype. Young, 2019). El SASP en las células se caracteriza por el aumento en la actividad metabólica pero con alteraciones importantes en la secreción y expresión de sus proteínas generando un ambiente inflamatorio (Fig. 1).

El SASP incluye elementos de distintas categorías que la definen: factores solubles e insolubles que por lo general son componentes de la matriz extracelular (ECM) y proteasas, estas últimas pueden incrementar o disminuir su

concentración. Como factores solubles se conocen a las interleucinas (IL-6, IL-7, IL-8 e IL-1 β), quimiocinas que son atrayentes de monocitos (MCP-2, MCP-4 y MIP-1a) y factores de crecimiento (IGF y VEGF). Por otra parte los factores no solubles que se conocen en SASP son la fibronectina, colágenas y laminina. En el caso de las proteasas se presentan tres efectos durante la senescencia como: desprendimiento de proteínas asociadas a la membrana, es decir escisión/degradación de moléculas de señalización y degradación o procesamiento de la matriz extracelular (Coppé *et. al*, 2010). Aunque se ha observado que ciertas citocinas y otros productos de diferenciación y proliferación no presentan cambios en expresión, la regulación de ninguno de los factores (solubles e insolubles) disminuye significativamente en diferentes estados senescentes (Coppé *et. al*, 2010; Coppé *et al.*, 2008).

El secretoma de las células senescentes es complejo, consiste de una gama de citocinas, quimiocinas y proteasas, entre otras. Este SASP refleja la funcionalidad celular no autónoma de las células senescentes y puede apuntalar su función *in vivo* en la fisiopatología del envejecimiento y los trastornos relacionados con la edad. Sin embargo, la gama de funciones atribuidas a los miembros de la SASP es extremadamente diversa e incluye señales tanto autocrinas como paracrinas, efectos supresores de tumores y supresores de tumores, y señales proinflamatorias (Salama, 2014).

La regulación del secretoma en células senescentes se realiza a través de varios niveles; desde la regulación transcripcional hasta los circuitos de retroalimentación autocrina. Sin embargo, la persistencia en respuesta al daño

del DNA parece ser crítico para la regulación. Muchos componentes del SASP (citocinas, quimiocinas y proteasas) están regulados positivamente a nivel transcripcional y dos factores de transcripción NF- κ B y C/EBPB muestran este comportamiento, al activarse parecen unirse a la cromatina durante la senescencia inducida por oncogenes y para regular los componentes inflamatorios del SASP.

SASP como característica común de la senescencia independiente del tipo de inducción

El estrés de la célula aumenta conforme envejecemos provocando vías de respuesta ante tal estrés. Estos mecanismos de respuesta son altamente conservados como lo son las vías IGF-1, TOR, AMPK y sirtuinas (Haigis & Yanker, 2010). Estas vías están implicadas en el metabolismo de redox, en respuesta al daño en el DNA, en proteostasis y en autofagia (Haigis & Yanker, 2010). En las células se puede inducir distintos tipos de estrés para alcanzar el estado senescente, que pueden inducir el "*Límite Replicativo de Hayflick*". Los tipos de estrés celular característicos son el estrés oxidante al que se le reconoce como el principal estrés celular en el envejecimiento (Harman, 1956); el estrés proteotóxico ocasionado por la acumulación de proteínas, el estrés metabólico y el endocrino, entre otros (Salminen et. al., 2011) (Fig. 1).

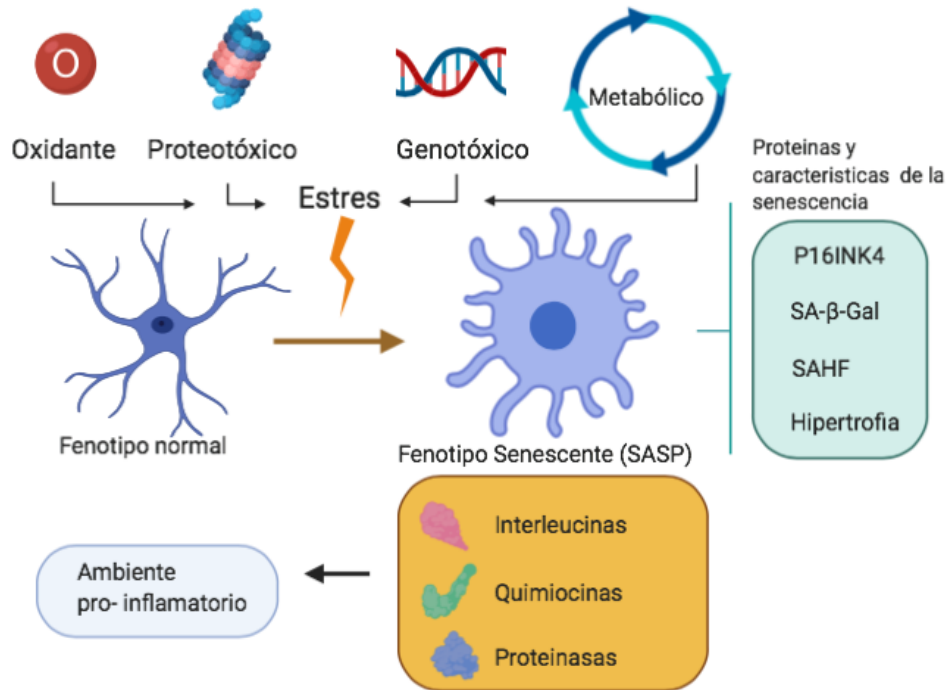


Figura 1. Representación esquemática del SASP de senescencia inducida por el estrés en diferentes tipos de células. Entre los biomarcadores más típicos de células senescentes inducidas por estrés se encuentra el fenotipo celular plano, el incremento de la expresión de P16INK4, así como el aumento en la actividad de la β -galactosidasa. El SASP libera una gran cantidad de citocinas, quimiocinas y proteasas. Modificado de Salminen et al., 2011.

Independientemente del tipo de estrés involucrado para inducir en la célula un estado senescente, el SASP es un común denominador, aunque puede tener diferencias. En un estudio realizado por Purcell et al., (2015) se caracterizó un perfil de expresión génica muy completo de la senescencia replicativa e inducida por otros tipos de estrés como el oxidante y genotóxico. En este estudio se observó que los genes expresados en el SASP tienden a tener diferentes niveles de expresión entre los tipos de inducción, ocasionando que el uso de marcadores tenga que ser más específico dependiendo del tipo de senescencia inducida.

El proteasoma en la senescencia celular

Las células senescentes presentan varios cambios morfológicos y bioquímicos. Entre estos cambios bioquímicos se encuentra la acumulación de proteínas dañadas (estrés proteotóxico) indicando un problema en la degradación de proteínas. Esta función no solo es responsable por la limpieza, sino también de la regulación de funciones celulares importantes tales como la homeostasis y la supervivencia (Campisi et. al., 2001). La encargada de la degradación de muchas proteínas intracelulares, anormales, mal plegadas desnaturalizadas y dañadas es un complejo proteico conocido como el proteasoma (Grune et. al., 1997). El proteasoma es un componente esencial de la vía proteolítica dependiente de ATP y ubiquitina. Para que el proteasoma pueda degradar a las proteínas, estas deben haber pasado por un proceso de ubiquitinación o de oxidación (Carrard et. al., 2002). Las proteínas oxidadas se degradan preferentemente por el proteasoma 20S independiente de ATP mientras que las proteínas marcadas por la unión covalente de ubiquitina son degradadas por el proteasoma 26S dependiente de ATP (Ciechanover et. al., 2000, Grune et. al., 1997). Ciechanover y col. en 2000 proponen que con el envejecimiento se observa una acumulación de estas proteínas ubiquitinadas, sin embargo, no hay cambios en la actividad de enzimas ubiquinantes y esto nos sugiere que pudiera existir un defecto en el funcionamiento del proteasoma. (Ciechanover et. al., 2000). Estos defectos pueden deberse a una disminución de la expresión de subunidades (20S y 26S), a modificaciones estructurales causadas por exposición al sistema generador de especies reactivas de oxígeno (ROS, por

sus siglas en ingles), aunque se han observado diferencias entre las diversas subunidades, siendo el proteasoma 26S, más a esta exposición de ROS (Conconi et. al, 1998) (Reinheckel et. al, 1998), y a efectos inhibitorios de proteínas dañadas.

La inhibición de la actividad del proteasoma tiene como consecuencia la acumulación de varios tipos de proteínas produciendo estrés en la célula (Morimoto,2011). Otra consecuencia de la inhibición de la actividad del proteasoma es la translocación nuclear y activación transcripcional de receptores de dioxinas tales como el receptor de hidrocarburo de arilo (AHR) (Santiago et. al., 2001, Santiago et. al., 2003).

Los Astrocitos

El término astrocito se deriva de una combinación de una palabra griega para estrella (*astron*; plural, *astra*) y la palabra científica para celular (*cyte*, que a su vez se deriva de la palabra griega *kytos*, que significa vaso) (Kimmelberg et. al, 2010). Este tipo celular pertenece a las células de la glía en el sistema nervioso central (SNC). Este linaje celular es derivado del neuroectodermo, así como los oligodendrocitos y neuronas. Se les da el nombre de células gliales, ya que a diferencia de las neuronas estas no propagan potenciales de acción y sus procesos no reciben o transmiten señales eléctricas. Por ello que también se les llegó a conocer como células neuronales no excitables (Kierszenbaum et. al., 2015, Kimmelberg et. al., 2010).

Funciones de los Astrocitos en el SNC y enfermedades asociadas

Desde finales del siglo XIX los astrocitos se han dividido en dos subtipos principales en base a sus diferencias morfológicas y su localización anatómica: los astrocitos protoplasmáticos y fibrosos. Los astrocitos protoplasmáticos se encuentran en toda la materia gris mientras los astrocitos fibrosos en la materia blanca (Sofroniew et. al., 2010, Oberheim et. al., 2006). Aunque difieren en su morfología, se han estudiado las diversas funciones que poseen, entre ellas se pueden encontrar: su papel en el desarrollo donde los astrocitos producen moléculas que pueden dirigir a las neuritas en crecimiento a sus blancos (Powell et. al., 1999), y modificación del diámetro en el vaso sanguíneo regulando el flujo sanguíneo (Gordon et. al., 2007). También se les atribuye un papel fundamental en el mantenimiento del metabolismo del SNC, debido que los astrocitos poseen predominantemente el glucógeno del cerebro (Brown et. al., 2007). Además los astrocitos detectan e integran la actividad sináptica y, dependiendo de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , liberan gliotransmisores (por ejemplo, glutamato, d-serina y ATP), que tienen acciones de retroalimentación en las neuronas, este fenómeno recibe el nombre de sinapsis tripartita (Halassa et. al., 2007). Los astrocitos también son reguladores cruciales para la respuesta adaptativa e innata en el sistema nervioso central en caso de alguna lesión. Esto debido a que son células inmunocompetentes capaces de detectar señales de peligro y responder secretando citocinas y quimiocinas activando las células inmune adaptativas (Cordiglieri et. al., 2010; Farina et. al., 2007).

Se ha descrito que ante un daño infligido al SNC, desencadena la generación de cicatrices alterando la homeostasis del tejido de manera ambivalente ya que los mediadores inflamatorios que se generan en el sitio de la lesión son confinados por la cicatriz glial. Ante este daño los astrocitos generan una respuesta, al cambiar su estado normal a uno denominado como reactivo. Este cambio se le conoce como gliosis reactiva que se distingue por cambios morfológicos (hipertrofia) y funcionales. Es un fenómeno asociado a ciertas patologías como: isquemia, neurodegeneración y trauma que se caracterizan por la sobreexpresión de proteínas de filamentos intermedios como: vimentina, nestina y GFAP, siendo esta última la más estudiada por su relevancia en enfermedades neurológicas (Middeldorp et. al., 2011, Burda et. al., 2014).

La astrogliopatía abarca fenotipos de astrocitosis reactiva que se presentan como hipertrofia, atrofia/degeneración, pérdida de función y remodelación. Estas características junto con el fenotipo senescente de los astrocitos, contribuyen a la presencia de astrogliopatía en enfermedades relacionadas con el envejecimiento y neurodegenerativas. Su contribución principal yace en la formación de agregados proteicos anormales con el pasar de los años, observado en la enfermedad de Alzheimer (Verkhatsky et. al., 2017). Actualmente a los astrocitos se les considera un elemento de estudio primordial para enfermedades neurológicas puesto que pueden ser causa primaria de una enfermedad al disminuir su población en el sistema nervioso central, atrofiarse o degenerarse resultando en pérdida de funciones; también pueden ser un factor

que contribuye al desarrollo progresivo de una enfermedad neurológica en particular (Verkhatsky et. al., 2017, Pekny et. al., 2016).

La astrogliosis reactiva se interpreta como una reacción benéfica orientada a proteger el sistema nervioso de estímulos internos y externos nocivos. Sin embargo, ciertas respuestas de comportamiento crónico, como la inflamación, puede aumentar el daño neuronal, es decir, que los astrocitos son capaces dependiendo del momento y el contexto, de exacerbar las reacciones inflamatorias y el daño tisular, o promover la inmunosupresión y la reparación tisular (Colombo & Farina et. al., 2016). Este aspecto es relevante en las enfermedades neurodegenerativas de larga duración asociadas con el envejecimiento (Pekny et. al., 2016, Voskuhl et. al., 2009). La astrogliosis reactiva puede proteger a las neuronas del daño excitotóxico, el agua y el desequilibrio iónico, el daño por estrés oxidante e infecciones. Pero también puede tener efectos adversos al aumentar el daño excitotóxico, como aumentar la concentración de ROS, facilitar la producción de citocinas proinflamatorias e inflamación crónica, y aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, la disminución de funciones particulares en astrocitos reactivos facilita el daño neuronal (Verkhatsky et. al, 2017).

Efecto de la senescencia en los astrocitos

El aumento en la expresión de la GFAP ha sido el cambio más común observado en los astrocitos en el envejecimiento y en la senescencia. La GFAP es un componente proteico estructural fibroso perteneciente al citoesqueleto en específico a filamentos intermedios tipo III, presente principalmente en

astrocitos, aunque también se reporta en pericitos y en células precursoras neurales. La GFAP junto con proteínas como vimentina, nestina y sinemina, participan en el soporte estructural de la célula pero la GFAP está involucrada en la regeneración, plasticidad sináptica y gliosis reactiva (Middeldorp et. al., 2011). Durante el envejecimiento, se ha reportado que la GFAP presenta un cambio en su expresión de manera distinta en diferentes partes del cerebro. Esto sugiere que los factores de regulación a nivel transcripcional o post-transcripcional de la GFAP sean causas posibles de ciertas enfermedades neurodegenerativas, dado que esta proteína se ha encontrado expresada mayoritariamente en astrocitos (O'Callaghan et. al., 1991, Nichols et. al., 1993). Como consecuencia a la elevada expresión de la GFAP en astrocitos es posible que esté asociada a senescencia. La participación de esta proteína en el SNC implica que la senescencia posee la capacidad de reprimir el mejoramiento de neurogénesis y la protección neuronal del cerebro (Salminen et al, 2011). Además se le relaciona con enfermedades como Enfermedad de Alzheimer (EA), Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, Encefalomiелitis Alérgica, Esclerosis Lateral Múltiple, Enfermedad de Alexander y daños ocasionados por accidentes cerebrovasculares (Ferrer, 2017).

En cuestión estructural o morfológica se pueden observar ciertos cambios en los astrocitos de cerebros envejecidos, tales como la acumulación de material de inclusión unido a la membrana en el citoplasma, también se han reportado aumento en el tamaño del núcleo e incremento en el número cuerpos nucleares,

así como una modificación en la organización nuclear. Similar al GFAP, los filamentos intermedios presentan una hipertrofia (Salminen et. al., 2011).

Hay evidencias experimentales de que los astrocitos y otras células senescentes acumuladas en los tejidos de mamíferos que envejecen, presentan el fenotipo alterado que genera un ambiente proinflamatorio, llamado SASP (fenotipo secretor asociado a la senescencia), que aparentemente contribuye a varias enfermedades del envejecimiento, incluida la EA (Salminen et. al., 2011) (Muñoz & Serrano et. al., 2014) (Kuilman & Peeper et. al., 2009). El SASP contribuye al "envejecimiento inflamatorio" (el desarrollo de un estado proinflamatorio sistémico con el envejecimiento normal), que implica un aumento de los niveles plasmáticos sanguíneos de citocinas inflamatorias como la IL-6 (Franceschi et al, 2000). Se han reportado la participación de diversos factores de transcripción involucrados en la regulación del sistema inmune y en la producción de proteínas pro- y anti – inflamatorias, entre ellos se encuentra al AHR.

Receptor de Hidrocarburos de Arilo

El receptor de hidrocarburos de arilo (AHR), es una proteína que actúa comúnmente como factor de transcripción activado por ligando que es requerido para inducir la expresión de varios genes de desintoxicación (Tan et al, 2002). Este receptor fue reportado por primera vez en 1976 por el laboratorio de Alan Poland de la Universidad de Rochester bajo el nombre de AH receptor (AHR) y se tiene registro que desde entonces y hasta 2012 se publicaron cerca de 6000 artículos detallando características, funciones y regulación de esta proteína así

como consecuencias de su activación en los sistemas biológicos. (Pohjanvirta, 2012).

El AHR pertenece a una familia de proteínas que actúan como factores de transcripción de la denominada bHLH-PAS (hélice-bucle-hélice básica-Per/ARNT/Single minded), que están involucradas en el control de diversas funciones fisiológicas tales como ritmo circadiano, neurogénesis y metabolismo, entre otras (Barouki et al, 2007). Los miembros de la superfamilia bHLH poseen dos dominios muy conservados y funcionalmente distintos, cuya longitud es de aproximadamente 60 aminoácidos (basic y HLH), sin embargo, diferencias en estas secuencias han generado 6 clases de estas proteínas, cada una con funciones distintas. (Jones, 2004, Massari et al, 2000). El dominio proteico PAS es altamente conservado ya que lo podemos encontrar en todos los reinos incluyendo a las bacterias y a las arqueas (aunque en menor proporción: Henry et al, 2011). Este dominio lleva su nombre por las tres proteínas que contiene: proteína de periodo circadiano (Per), el translocador nuclear del receptor de hidrocarburos de arilo (ARNT) y proteína *single-minded* (Sim; Jones, 2004).

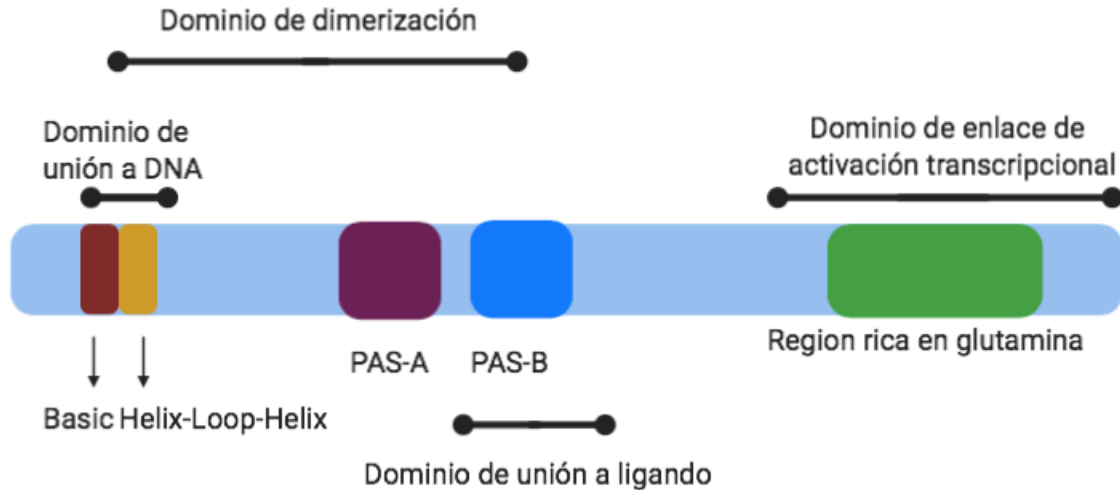


Figura 2. Diagrama de la proteína de AHR. En ella se puede apreciar los dominios y las funciones que desempeñan en la proteína: Estructura hélice-bucle-hélice básica; PAS con repeticiones degeneradas (A y B); Región rica en glutamina denominada Q. Modificado de Mimura et. al., 2002 y Larigot et. al., 2018.

El AHR posee diversos dominios, cada uno con importantes funciones (Fig. 2). El dominio bHLH que se encuentra en el extremo N-terminal. En el extremo amino terminal se encuentra el dominio básico que une el factor de transcripción al DNA en una secuencia consenso de hexanucleótidos conocida como E-box (diferentes familias de proteínas bHLH reconocen distintas secuencias consenso de E-box). En el extremo carboxilo terminal se encuentra el dominio HLH que facilita las interacciones con otras subunidades de proteínas para formar complejo homo y heterodímeros (Jones, 2004). El siguiente dominio corresponde a PAS (que se encuentra en el carboxilo terminal de la región de bHLH), con una longitud de aproximadamente de 260 a 310 residuos de aminoácidos, y forma una dimerización superficial secundaria para la interacción heterodimérica comúnmente con ARNT u otras proteínas no PAS, pero también con proteínas PAS y algunas moléculas pequeñas como las dioxinas (Hahn et. al., 1997) (Kewley et. al., 2004). Este mismo dominio posee dos repeticiones

imperfectas de 51 aminoácidos, separados por una secuencia de 110 aminoácidos, estos son PAS-A y PAS-B. La repetición del PAS-B es importante ya que esta región es parte del dominio unión a ligando de AHR. Por último en la estructura del gen AHR en la región C-terminal, se encuentra un dominio de transactivación. Este dominio es complejo ya que se encuentra formado por segmentos (subdominios) que funcionan de manera independiente y exhiben niveles de activación variables, estos son: subdominio ácido (500-600 aa), subdominio rico en glutamina (Q-rich) (600-713 aa) y el subdominio P/S/T (713-848 aa; Rowlands et. al., 1996). El subdominio Q-rich es crítico para potenciar la transactivación del AHR, el subdominio ácido por sí solo no es capaz de activar genes, por lo que su capacidad transcripcional es muy baja y el subdominio P/S/T actúa como un represor ante la actividad de los demás dominios, por lo que se considera que está involucrado en reclutar ciertos co-reguladores moderando la actividad transcripcional (Kumar et. al., 2001).

Complejo de AHR (AHRC)

El AHR es un factor de transcripción activado por ligando que actúa en conjunto con ARNT formando un heterodímero para unirse a una secuencia de genes conocidos como elementos de respuesta a xenobióticos (XRE). A esta vía de señalización se le conoce como la vía genómica (Larigot et. al., 2018). Sin embargo, antes de que empiece a transcribir genes, esta proteína se encuentra secuestrada o no activada en el citoplasma junto con otras proteínas chaperonas formando el complejo de AHR. Este complejo tetramérico está compuesto por una subunidad de unión a ligando de 95-105 kDa, un dímero de Hsp90, y la

inmunofilina similar a la proteína 2 asociada a X (XAP2), aunque también se ha encontrado que múltiples co-chaperonas se asocian con este complejo durante diversas etapas de la vida del receptor como son: p23, Hsp70, p60. (Petrulis et. al., 2002). Cada una de estas chaperonas juega un papel en el complejo AHR, la Hsp90 parece estar involucrada en el plegamiento de AHR cuando recién está sintetizado, permite la estabilización de la conformación de unión a ligando al receptor y la inhibición de la dimerización constitutiva con ARNT. XAP2 es una proteína más dinámica, ya que puede interactuar con el AHR sin necesidad de hsp90 y viceversa (Petrulis et. al., 2002). No se ha establecido un papel exacto pero se postula que posiblemente esté involucrado en la regulación de la tasa de recambio de AHR, mejorando la localización plasmática del receptor, aunque también se ha observado que puede intervenir reduciendo la degradación proteasomal (Meyer et. al. 1999; Petrulis et. al., 2002; Kazlauskas et. al., 2000). Las co-chaperonas como p23 se mantienen aún en investigación, sin embargo, en ciertos estudios se ha observado que la sobreexpresión de esta proteína afecta significativamente la señalización del receptor y en conjunto con hsp90 mejora la formación de otro complejo, el del AHR con el DNA (Cox et. al., 2004; Kazlauskas et. al., 1999).

Ligandos de AHR

Se han descrito numerosos ligandos de AHR, los cuales se clasifican como ligandos exógenos (contaminantes y aquellos proveniente de la dieta) y endógenos (compuestos provenientes de metabolismo secundario de moléculas como el triptófano o de la microbiota). Los primeros son aquellos de

naturaleza sintética (resultado de actividad antropogénica) o ajenos al cuerpo, los cuales incluyen a los hidrocarburos aromáticos halogenados (HAH) e hidrocarburo aromáticos policíclicos (PAH), además estos compuestos curiosamente son los que presentan mayor afinidad (Deniso,2003). Mientras tanto en nuestro cuerpo debido a nuestro metabolismo generamos ciertas moléculas como es el FICZ (formil-indol [3,2-b] carbazol), indirrubina, índigo, metabolitos del ácido araquidónico o quinurenina, los cuales se han descrito como ligandos de AHR (Larigot et. al., 2018).

Activación del AHR

Existen diferentes rutas para la activación de AHR, una de ellas es la vía genómica. Esta vía comienza con el AHR secuestrado en el citoplasma celular por proteínas como Hsp90, XAP2 y otras co-chaperonas (AHRC). Cuando un ligando logra penetrar la membrana celular mediante difusión pasiva, este se une al AHR, específicamente en el dominio PAS-B (**Fig. 3**).

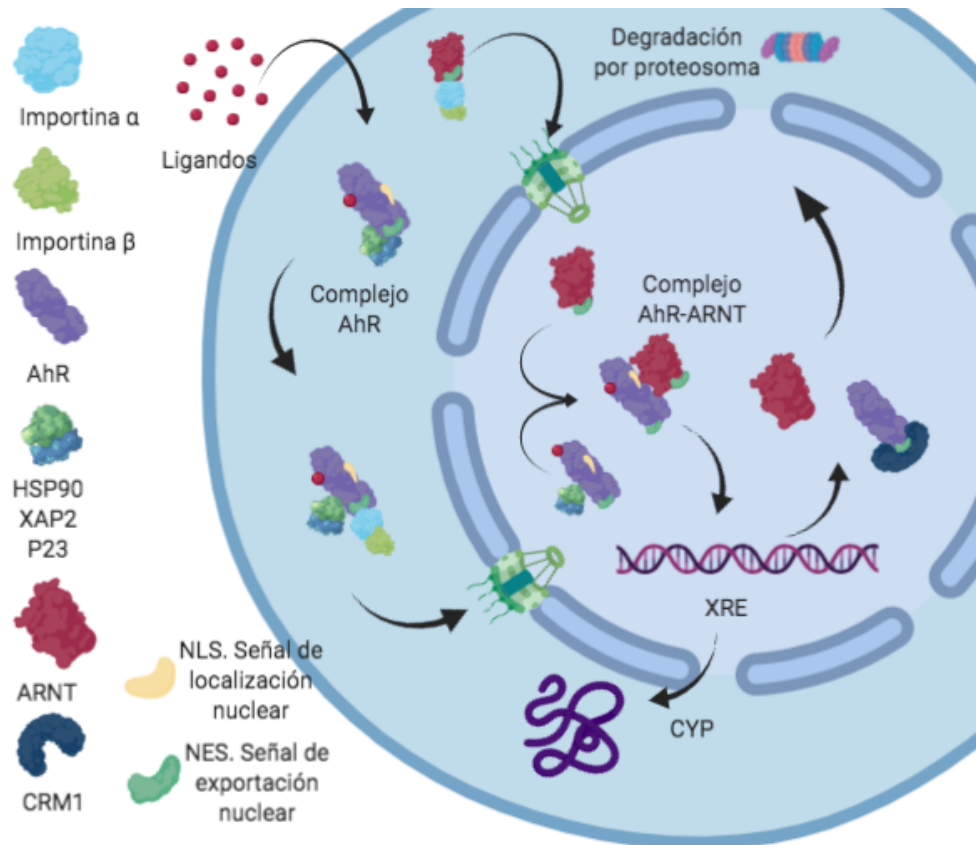


Figura 3. Diagrama del mecanismo de activación transcripcional mediado por AHR. Vía canónica. Cómo forma inactiva el AHR es citosólico en el AHRC, tras la presencia de un ligando cambia la conformación del complejo permitiendo la translocación nuclear. En el núcleo se forma un nuevo complejo con ARNT permitiendo la transcripción. Modificado de Ikura et al, 2000.

Después, ocurre una translocación al núcleo de todo este complejo, ya que la unión del ligando provoca un cambio conformacional en el complejo dejando expuesta la señal de localización nuclear (NLS), en donde las importinas alfa y beta se unen para ayudar en la translocación; mientras tanto el ARNT (que también posee un NLS), se mueve de manera independiente al núcleo (Ikuta et al., 2000, Hankinson, 1995). Una vez en el núcleo el AHRC se desacopla y mediante la señal de exportación nuclear (NES) se une con el ARNT para formar un heterodímero. El NES es a menudo una secuencia rica en leucinas, en donde los residuos de esta permiten dirigir proteínas fuera del núcleo, sin embargo ya

que ARNT posee una secuencia homóloga puede unirse a este (Ikuta et al, 2000). Posteriormente lo que sucede es la unión del heterodímero con DNA y la activación de genes, para esto se necesita una secuencia de pasos donde se incluye la heterodimerización de la AHR y ARNT, la formación de los contactos apropiados de aminoácidos/nucleótidos en el sitio de reconocimiento de GCGTG e interacciones entre AHR o ARNT con proteínas que facilitan los cambios en la cromatina estructural. La mayoría de estos pasos probablemente están modulados por cambios en la fosforilación, estado de oxidación de la AHR, ARNT y proteínas asociadas (Swanson, 2002). Después de la transcripción de los genes, el dímero se disocia haciendo accesible de nuevo el NES. Entonces el CRM1 se une al AHR (específicamente al NES) exportándolo del núcleo al citoplasma. Aunque no es la única opción, se ha observado que en ocasiones el AHR puede permanecer en el núcleo reprimiendo la transcripción de algunos genes, cuando se mantiene aún bloqueada la NES (Ikuta et. al., 2000). Una vez en el citoplasma, el AHR es degradado por el sistema ubiquitina proteasoma (Larigot et. al., 2018).

Otras rutas en las cuales el AHR puede activarse sin la necesidad de activar genes, se denominan vías no genómicas (Fig. 4). En diferentes estudios se había sugerido que la unión a ligandos al AHR también activa Src tirosina cinasa (liberándola de AHRC) y posteriormente se demostró cómo a través de la Src tirosina cinasa activa la cinasa de adhesión focal (FAK) y promueve la agrupación de integrinas (Tomkiewicz et. al., 2013).

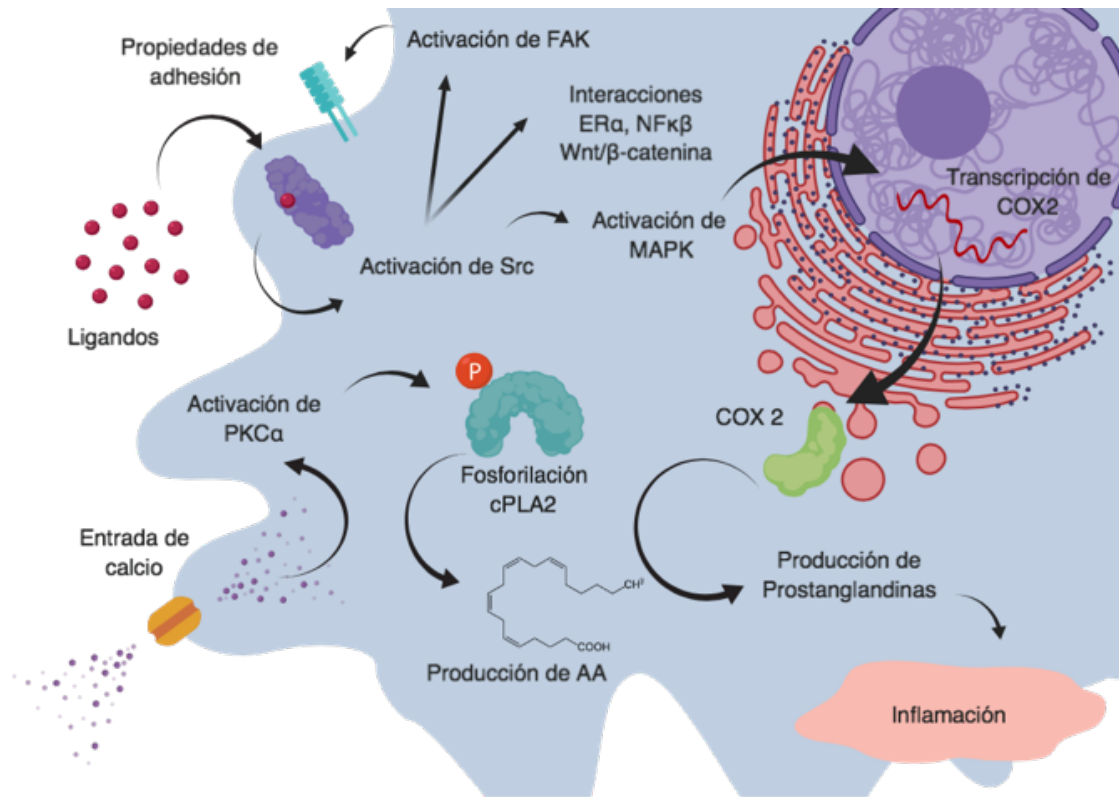


Figura 4. Diagrama de la vía activación alternativa de AHR. Vías no canónicas o no genómicas. Ligandos como el TCDD pueden causar dos efectos: el incremento del calcio intracelular, activar vías como las MAPK o propiedades celulares funcionales (adhesión y migración). El AHR es capaz de interactuar con otros factores de transcripción regulatorios. Modificado de Larigot et al, 2018.

Todos estos eventos pueden converger para regular procesos patofisiológicos, como la inflamación (**Fig. 4**). De hecho, el flujo de calcio causa la activación de la proteína quinasa C (PKCα) que fosforila un serineridido de una enzima citosólica, la fosfolipasa A2 (cPLA2) con la producción posterior de ácido araquidónico. La paralización de MAP quinasas por Src conduce a la transcripción de la ciclooxigenasa 2 (COX2) que utiliza ácido araquidónico para producir prostaglandinas que pueden causar inflamación (Larigot et. al., 2018; Tan et al, 2002).

Funciones de AHR

Su función más conocida y caracterizada es la generación de elementos de respuesta a xenobióticos por su vía canónica mediante la activación por ligando que en su mayoría son exógenos (el más común, el TCDD). Estos elementos de respuesta a xenobióticos o dioxinas en conjunto se le conoce como batería genética en donde se pueden encontrar hasta 26 genes, de los cuales podemos mencionar 7 importantes. Entre ellos están dos genes de citocromo P450 (*CYP1a1* y *CYP1a2*) y los otros cuatro corresponden a: NAD(P)H quinona oxidoreductasa (*Nqo1*), Aldehído deshidrogenasa citosólica 3 (*Aldh3a1*), Glucoronosiltransferasa UDP (*Ugt1a6*) con el 4- metilumbeliferona como sustrato, glutatión transferasa (*Gsta1*) con el 2,4-dinitro-1-clorobenceno como sustrato y finalmente ubiquitina conjugado de enzima o proteína E2 (*Ubc4*). Con la información anterior podemos ver que el AHR parece estar involucrado en la respuesta al estrés oxidante, control del ciclo celular, migración, apoptosis y degradación (Nebert et. al., 2000; Sutter, 1992; Mejia-Garcia, 2015).

El AHR está involucrado en diversos procesos fisiológicos, en las células se ha determinado que los efectos del TCDD, su principal ligando, pueden alterar el crecimiento y proliferación celular. Estos eventos a su vez son regulados por numerosos péptidos multifuncionales conocidos como factores de crecimiento y citocinas; ya que también están involucrados en diversas tareas poseen una red compleja de señalización, donde el AHR puede intervenir en esta red de una manera multifacética (Haarmann-Stemmann et. al., 2009).

De las funciones del AHR que más podemos destacar, a partir de estudios en ratones AHR knockout, es que éstos muestran anomalías durante el desarrollo donde resaltan su papel en crecimiento perinatal, regulación de presión arterial, producción de linfocitos periféricos, mayor susceptibilidad en colitis etc. (Larigot, et. al., 2018). También se ha destacado la participación del AHR en la inflamación al regular factores como son: IL-6 y TNF- α (Kimura et. al., 2009).

Antecedentes

En el cerebro humano la proteína AHR se expresa con niveles similares a los de otros tejidos, pero con los niveles de expresión de RNA considerablemente bajos (Human Protein Atlas). En otros estudios se ha descrito que podemos encontrar AHR en células de la glía, específicamente astrocitos (Filbrandt, 2004). Se han detectado diversas funciones de esta proteína en el SNC, de las cuales podemos destacar: diferenciación celular, mantenimiento de la barrera hematoencefálica y neuroprotección (Filbrandt et. al., 2004; Akahoshi et. al., 2006; Rzemieniec et al, 2016).

Como se mencionó anteriormente, el AHR es capaz de transcribir una gran cantidad de genes (batería genética) mediante su vía canónica. Entre estos se encuentran principalmente los genes de citocromo P450.

Otros trabajos indican a AHR en astrocitos como un blanco para regular la neuroinflamación, ya sea a través de mediar la señalización de algunas moléculas como el IFN-1, donde el AHR parece estar regulando las expresiones de citocinas pro inflamatorias de manera negativa junto con el supresor de la

señalización de citocinas 2 (SOCS2) a través de IFN-1 (Rothhammer, 2016), lo cual indicaría la participación de las vías no genómicas del AHR por su estrecha relación con la activación de la inflamación.

Por otro lado, la senescencia astrocitos se puede inducir metodológicamente, acuerdo con el trabajo de Bitto y col., 2010; para inducir senescencia celular mediante estrés oxidativo y proteotóxico en astrocitos de ratón, rata y humano, comprobando el estado senescente en astrocitos a través de pruebas como la actividad de la β -galactosidasa (SA- β gal) y análisis de Western-blot o inmunocitoquímica de proteínas como p16, p53 y p21.

Justificación

Con base en la problemática actual de las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento, es necesario establecer nuevos estudios enfocados en la investigación del AHR y sus efectos en la inflamación crónica y la senescencia celular asociadas al desarrollo de estas enfermedades, con el fin de encontrar nuevas dianas moleculares para futuras terapias.

Hipótesis

La senescencia celular inducida por estrés proteotóxico promueve la translocación nuclear de AHR como evidencia de su activación.

Objetivo General

- Determinar la localización de AHR en la senescencia celular inducida en astrocitos por estrés proteotóxico.

Objetivo Particulares

- Estandarizar el cultivo primario de astrocitos corticales de ratón.
- Establecer el modelo de senescencia celular en los astrocitos corticales de ratón.
- Determinar la localización celular de AHR en astrocitos senescentes.

Material y Métodos

Cultivo primario de astrocitos corticales de ratón

Para la elaboración de este trabajo se utilizaron células de astrocitos corticales de ratones neonatos (*Mus musculus*) de la cepa C57BL/6 del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velázquez Suárez (INNN). Esta tesis forma parte del protocolo titulado “Neuroinflamación crónica durante el envejecimiento como factor de riesgo de enfermedades neurológicas: Participación del receptor de hidrocarburos de arilo en astrogliosis y neurodegeneración” con número de registro del INNN #156/16, avalado por el CICUAL del Instituto.

El protocolo y los experimentos realizados en este proyecto fueron realizados de acuerdo a la NOM-062-ZOO-199 correspondiente al cuidado y uso de animales

de laboratorio. Se usaron las cortezas cerebrales de ratones neonatos, que fueron colocadas en cajas petri con solución Hanks estéril a 37°C. Las cortezas se disociaron mecánicamente y enzimáticamente. El tejido se centrifugó y se resuspendió en 2 ml de medio DMEM (SIGMA, Dulbecco's Modified Eagle Medium D1152-1L) suplementado con suero fetal bovino (Bio-West SBF S1650) al 10 % y antibiótico y antimicótico al 5 %. Se sembró en frascos de cultivo de 25 cm³ pre-tratados poli-D-lisina (PDL, SIGMA, P0899; 1:50) se mantuvo a 37°C y 5% de CO₂. Se utilizaron 2 cerebros por frasco de cultivo de 25 cm³. Se monitoreó el cultivo hasta presentar una confluencia de 90-100%, posteriormente las células fueron trasladadas a placas de 24 pozos.

Las condiciones de sembrado en placas de 24 pozos fueron diferentes dependiendo de las pruebas que se realizaron. Para las pruebas de inmunofluorescencia se sembraron 30,000 células (usando la cámara de Neubauer) en cubreobjetos tratados previamente con PDL y para las pruebas de β-galactosidasa también se sembraron 30,000 células en cada pozo pero sin cubreobjetos tratados previamente con PDL.

Inducción de la senescencia por inhibición de proteasoma

Posterior al sembrado, a las células se les trató con el reactivo para inducir senescencia, Mg132(R) (Sigma Aldrich SM 1135), dos días después del sembrado. El Mg132(R) es un inhibidor de proteasoma, pertenece a la clase de aldehídos peptídicos sintéticos, reduce la degradación de proteínas marcadas con ubiquitina por el complejo 26S (Ito et. al., 1975; Hayashi et. al., 1992). Se preparó partir de una concentración de 5 μM diluida en DMSO a una

concentración de 0.2 y 0.3 μM en medio DMEM. El tratamiento de Mg132 en los pozos fue por 3 días sin retirar el tratamiento.

Ensayo de β -galactosidasa y conteo celular

Para confirmar el estado senescente en las células, uno de las pruebas más usadas es el ensayo de la β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β gal). Este ensayo permite observar el estado de la actividad de la enzima β -galactosidasa detectable a pH 6.0, ayudando a la identificación de células senescentes en cultivos y tejidos de mamíferos. Las células senescentes en este ensayo son marcadas de un tono azul indicando un incremento en la biogénesis lisosomal de esta enzima (Debacq et. al., 2009).

Finalizando los días de tratamiento de senescencia, a las placas sembradas sin cubreobjetos se les realizaron las pruebas de β -galactosidasa. Al término de los tratamientos de senescencia se removió el medio DMEM y se lavó las placas con PBS 1X al menos 2 veces. Se añadió a cada pozo aproximadamente 200 μM de solución de fijación 1X y se esperó aproximadamente de 10-15 minutos a temperatura ambiente y enseguida se lavó los pozos nuevamente 2 veces con PBS 1X. Posteriormente se añadió a cada pozo aproximadamente 300 μM de solución de tinción β -galactosidasa. Se incubo la placa a 37°C toda la noche sin CO₂, sellando la placa con parafilm para evitar la evaporación. Al día siguiente se observó las células marcadas de azul y se realizó el conteo con ayuda del microscopio óptico invertido Olympus Modelo CKX41SF, acoplada a una cámara digital (microscope eyepiece camera AmScope MU500) y con el programa: ToupView (X64, 2015, China) y la cuantificación en el porcentaje positivo y a su

vez el conteo para determinar la cantidad de células en los controles y tratamientos.

Inmunofluorescencia

Después de los tratamientos, a las placas cuyo sembrado se hizo en cubreobjetos se realizaron las pruebas de inmunofluorescencia para evaluar la presencia y localización de AHR, así como la expresión de GFAP e IL-6.

Los pozos se lavaron 3 veces con PBS 1X y posteriormente se incubaron por 20 min las células a 4°C con paraformaldehído a 4%. Terminado este tiempo, las células se volvieron a lavar 3 veces nuevamente los pozos con PBS 1X 3 veces y se permeabilizaron las células con metanol por 10 min a -20°C con la finalidad de permitir el paso los anticuerpos primario y secundario. Se retiró el metanol y se realizaron 3 lavados con PBS 1x.

Para bloquear proteínas inespecíficas se preparó una solución de bloqueo, con suero de cabra al 4% (Equitech-Bio Inc. SG30-0100) o BSA al 2% y se incubó en los cubreobjetos por lo menos 2 horas a temperatura ambiente. Durante este lapso se preparó el anticuerpo primario de la proteína AHR (M-20 igG policlonal de cabra, SC-8088, Santa Cruz Biotechnology), GFAP (Policlonal de conejo, Z0334, Dako) e IL-6 1 (mouse monoclonal SC-130326) y una cámara húmeda para incubar (**Tab. 1**)

Finalizadas las 2 horas se retiró la solución de bloqueo e incubó con el anticuerpo primario en la cámara húmeda por 12 horas a 4°C. Terminado el tiempo, se retiró el anticuerpo primario, y se preparó el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488, donkey anti-goat IgG con referencia A11055 de Life

Technologies y Alexa Fluor 488, goat anti-rabbit igG H&L con referencia A11034 de Life Technologies y Alexa Fluor 488, goat anti-mouse IgG H&L con referencia 201202 de Life Technologies) (**Tab. 1**) y lo incubamos en completa oscuridad por 1 hora. Posteriormente, se realizaron 7 lavados con PBS 1X y los cubreobjetos se montaron en el portaobjetos con medio de montaje Vectashield con DAPI (EMS Shield Mounting Medium con 4,6-diamidino-2-phenylindole [DAPI] y DABCO número de catálogo 17989-20). Finalmente se sellan alrededor con esmalte y se observaron en el microscopio de fluorescencia NIKON KCC-REM-NCY-E200 DMV modelo Eclipse E200LED MV R del Laboratorio de Patología Experimental del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Las fotos se tomaron con una cámara Evolution VF Cooled Color/Media Cybernetics model F-CLR-12-C y el programa V.

Tabla 1. Concentraciones y tipos de anticuerpo primarios y secundarios usados para cada proteína

Proteína	Concentración de anticuerpo primario	Anticuerpo primario	Concentración de anticuerpo secundario	Anticuerpo secundario
AHR	1:200 (Diluido en suero de cabra 4%)	AHR SC80888 Santa Cruz	1:500 (Diluido en PBS 1x)	Anti-goat Alexa Fluor 488
GFAP	1:200 (Diluido en BSA al 2%)	GFAP Z 0334 Dako	1:200 (Diluido en PBS 1x)	Anti-rabbit Alexa Fluor 488
IL-6	1:200 (Diluido en BSA al 2%)	IL-6 (1) SC 130326 Santa Cruz	1:500 (Diluido en PBS 1x)	Anti-mouse Alexa Fluor 488

Análisis de intensidad de fluorescencia

Al terminar la inmunofluorescencia se llevó a cabo un análisis de cuantificación de fluorescencia usando el programa imageJ 1.52k (Jensen, 2013). La imagen se transforma a un formato 8-bit para medir la intensidad. Se ajusta el umbral en el control de modo que se seleccione todas las áreas teñidas y se escoge un fondo oscuro, se analiza la imagen con la opción de limitar al umbral, de lo contrario la imagen completa se analiza y no solo las áreas seleccionadas. Se toma en cuenta el promedio de gris que indica el valor de la intensidad de fluorescencia. El valor del umbral se mantiene en todas las imágenes.

Efecto de senescencia sobre AHR

Para medir el efecto del AHR se usa un conteo en la localización del AHR. Se usaron dos categorías, nuclear o citoplasmático. Este conteo se realizó en un campo, de tres campos aleatorios para cada tratamiento de tres experimentos independientes, por duplicado. La cuantificación se expresó en porcentaje.

Análisis estadísticos

Se realizó la estadística usando el programa GraphPad Prism (Versión 6.0). Se realizaron pruebas de normalidad para cada experimento. En los resultados de conteo celular post tratamiento y ensayo de β -galactosidasa, se utilizó la prueba no paramétrica para análisis de varianza (Kruskal Wallis) junto con pruebas de comparaciones múltiples (Dunn) (**Fig. 6**). En los resultados de intensidad de fluorescencia del GFAP e IL-6 se utilizó la prueba U de Mann Whitney (**Fig. 8** y

Fig. 9). En los resultados de intensidad de fluorescencia del AHR se utilizó la T-student de dos colas (**Fig. 10**).

Resultados

Estandarización de cultivo celular de astrocitos de ratón y el sembrado en placas de cultivo

Para el cultivo de astrocitos corticales, se observó que la cantidad de tejido es importante para determinar la confluencia > 85% y tiempo necesario de cultivo (**Tab. 2**). Respecto al tejido, se requiere las cortezas de 2 cerebros de ratón P0. El tiempo para alcanzar una confluencia de al menos 85 % puede depender de una buena disección. En la **Tabla 3** se observa el tiempo necesario para alcanzar una confluencia de 95-100%.

Tabla 2. Cambios de condiciones en los cultivos dependiente del número de cerebros usados en un frasco de cultivo. Con 2 cerebros aumenta la cantidad de detritus celulares en cultivo sin embargo se obtiene mayor número de células.

Marca	Tiempo en cultivo (días <i>in vitro</i>)	No. cerebros
Sigma® D1152-1L	16 ±2	1
	12 ±2	2

En el 1 día *in vitro* las células se encuentran indiferenciadas y con una gran cantidad de detritus, en el 4 día *in vitro* el cultivo y el 7 día *in vitro* observamos la morfología clásica estrellada de los astrocitos, además de la presencia de células como la microglia o células gliales precursoras que se identifican por su intensa luz. En los 12 días *in vitro* la morfología de los astrocitos se pierde para

dar paso al tapiz que cubre la mayoría de la superficie (confluencia > 85% de confluencia) del frasco de cultivo.

Para realizar los experimentos es necesario conocer el número de células sembradas en una superficie determinada para un control adecuado. Con este fin, se estimó la cantidad de células necesarias para alcanzar una confluencia de aproximadamente > 80 %, densidad óptima para realizar los estímulos. Debido a esto, se probaron diferentes cantidades de células sembradas para determinar el número conveniente y este depende del tamaño de las células, viabilidad de las mismas, su tasa de proliferación y su capacidad de adhesión a la superficie de la placa o de cubreobjetos de vidrio. El número de células sembradas fue de 30,000 por pozo. De acuerdo con nuestro estudio, el tiempo necesario para aplicar el estímulo requerido sobre los astrocitos corticales de ratón sembrados es de dos días (**Fig. 5**).

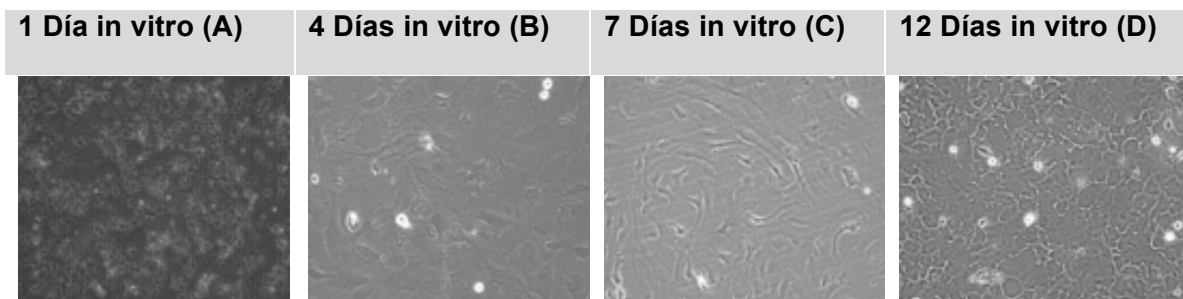


Figura 5. Cambios en la proliferación en distintos días *in vitro*. Se puede notar la disminución de detritus celulares y los cambios en la morfología. A) Los detritus celulares cubren la mayor parte del frasco y solo se logra observar unas cuantas células (forma esférica e intensa luz). B) Los astrocitos se identifican por su extensión de citoplasma, en cambio la microglia permanece en una forma esférica. C) Los astrocitos alcanzan la forma de estrella característica. D) Se pierde la forma de estrella de los astrocitos para dar paso a un tapete que cubre toda la superficie. La microglia continua en la misma morfología sin embargo su densidad celular es mínima.

Efecto citotóxico del inhibidor de proteasoma MG132 en astrocitos corticales de ratón

Se ha reportado que el inhibidor del proteasoma MG-132 induce el proceso de toxicidad y la inducción del proceso de senescencia celular a través de un estímulo, exponiendo las células al MG-132 durante 5 días en una concentración de 1 μM (Bitto *et. al.*, 2010); para comprobar este efecto se realizó un conteo celular entre el control y las dos concentraciones de MG-132, en fotografías de campo claro tomadas en microscopio óptico invertido a un aumento de 10x. Cómo se puede observar en la **figura 6** en el tratamiento de MG132 (0.2 y 0.3 μM) el número de células disminuye aproximadamente entre 37 a 50 % respecto al control siendo significativamente diferente. Esta disminución la podemos interpretar como muerte celular ya que se siembra tanto en control cómo entre tratamientos la misma cantidad de células.

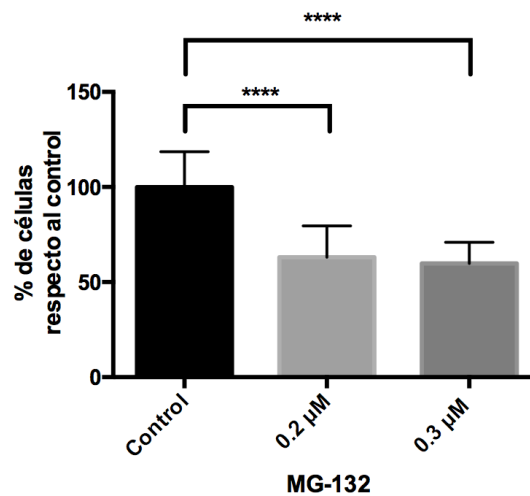


Figura 6. Efecto citotóxico del MG-132. Conteo celular post-tratamiento del inhibidor del proteasoma MG-132. Los cambios en el número de células se comparan entre los tratamientos y control se calcularon por la cuantificación de las células en 36 fotografías de cada tratamiento y controles. Los resultados mostraron una distribución no normal por lo tanto, se usó la prueba estadística de Kruskal-Wallis $N=3$ con un valor de $p < 0.01$, los asteriscos marcan la significancia estadística.

Entre tratamientos (0.2 y 0.3 μM) se observa que no existe diferencia significativa, esto indicaría que no existe mayor cantidad de muerte celular entre ambas concentraciones del inhibidor. Las concentraciones evaluadas se decidieron acorde a reportes anteriores en la literatura (Bitto *et. al.*, 2010).

La inhibición del proteasoma induce senescencia celular en astrocitos corticales de ratón.

Para comprobar el estado senescente de las células, uno de los métodos más utilizados es el ensayo de la β -galactosidasa donde las células teñidas de azul indica un aumento en la actividad de esta enzima en un pH de 6, por el mismo estado senescente. Como se observa en la **figura 7A** los cambios morfológicos, inducidos por el tratamiento con la concentración de 0.3 μM de MG-132 se describen como un citoplasma más alargado y disminuido respecto al control. En el tratamiento de 0.2 μM se encontraron algunas células con esta morfología sin embargo la mayoría de ellas parecen continuar con una morfología clásica de un astrocito (forma estrellada) misma que hallamos en los controles. En cuanto a las marcas de tinción azul en el control de la **figura 7A** solo se encuentran 2 marcas del total de células, en la concentración de 0.2 μM se encuentran 4 marcas y finalmente en 0.3 μM podemos observar a todas las células teñidas. Para comprobar esta tendencia en aumento de tinción observemos la gráfica de la **figura 7B** donde se comparan el porcentaje de células teñidas. El tratamiento de 0.3 μM tiene el más alto porcentaje de células teñidas (95.57%) y con respecto a la concentración 0.2 μM (35.5%), siendo significativamente diferente por 60%. Por ello elegimos que para pruebas posteriores 0.3 μM es la concentración ideal asegurando que la mayoría de células se encuentren

senescentes, además que entre las concentraciones de 0.2 y 0.3 μM no hay disminución en el número de células (**Fig. 5**).

También podemos observar que en la **figura 7** se localiza la presencia de células senescentes sin ningún tipo de estímulo (controles). Lo que indica una presencia de senescencia replicativa, por ello en estas pruebas se tuvo que llevar un control de tiempo estricto. Logrando en el menor número de días la proliferación celular en los cultivos primarios (**Tab. 2**). Con el fin de obtener el menor número de células senescentes de tipo replicativo. El número de células sembradas es importante debido a que se ha observado que a una alta confluencia, las pocas células senescentes pueden estimular de forma paracrina la generación de un fenotipo senescente en las demás. Con la **figura 5** determinamos que el tiempo ideal para la proliferación celular fueran 12 días *in vitro*, basándonos en el reducido tiempo y el número ideal de células sembradas (30,000 células por pozo). Evitando lo menor posible el estímulo paracrina.

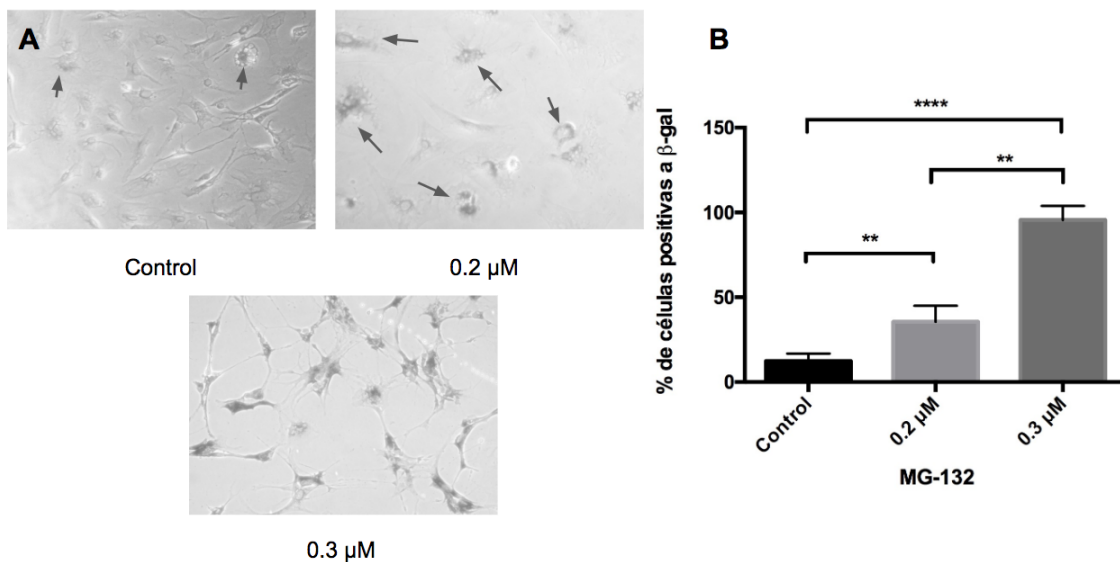
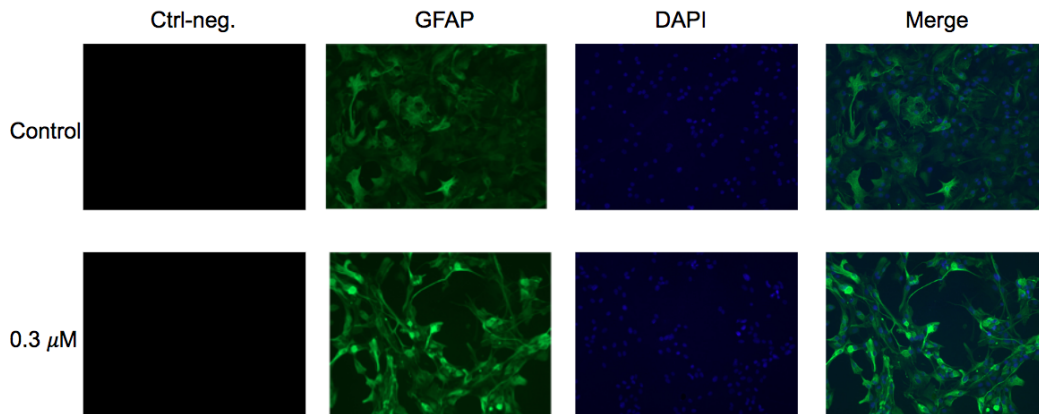


Figura 7. Senescencia celular inducida por estrés proteotóxico. Ensayo de la β galactosidasa. A) Tinción de actividad de β -galactosidasa en las células de astrocitos corticales control y tratadas con 0.2 μ M y 0.3 μ M del inhibidor de proteasoma MG-132. Las flechas señalan las células teñidas por la actividad (en la concentración de 0.3 μ M no se colocaron debido a que todas las células se encuentran teñidas). Se puede observar un cambio significativo en la morfología entre el control y 0.2 μ M. B) Ensayo de la prueba de β -galactosidasa en el tratamiento de MG-132. Los cambios del porcentaje de células teñidas se comparan entre tratamientos y control de 36 fotografías. Los resultados mostraron una distribución no normal por lo tanto, se usó la prueba estadística de Kruskal-Wallis con una N=3 y un valor de $p<0.01$, los asteriscos marcan la significancia estadística.

También se ha registrado que durante la senescencia en astrocitos existen cambios en la expresión de ciertas proteínas, entre ellas la GFAP, en la cual se conoce el aumento de expresión, a este efecto se le conoce como gliosis reactiva (Salminen et al, 2011). La gliosis reactiva es un estado “activo” de los astrocitos en respuesta a un trauma en el SNC (en este caso, la senescencia) cuya marcador más característico es la regulación al alza de filamentos intermedios, tales como el GFAP (Salminen et al, 2011; Pekny & Nilsson et al, 2005). Como se observa en la **figura 8**, existe un aumento en la intensidad de fluorescencia en presencia del inhibidor de proteasoma.

A



B

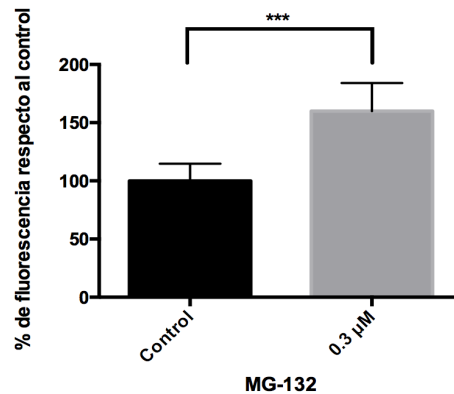
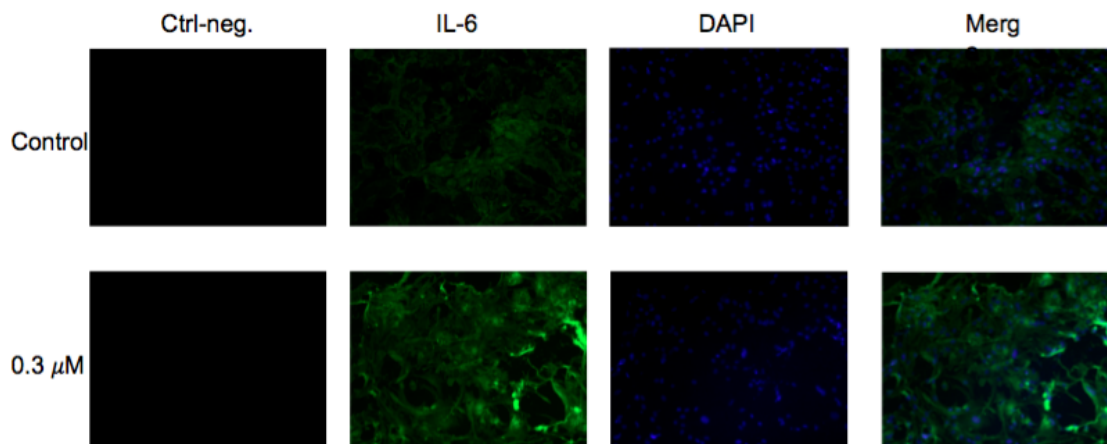


Figura 8. Gliosis reactiva inducida por estrés proteotóxico. Ensayo de Inmunofluorescencia en GFAP. A) Fotografías de la inmunofluorescencia de la proteína GFAP a 100x. Se compara los controles negativos, la marca de la proteína GFAP, la marca DAPI y colocalización de la marca GFAP y DAPI. Se comparan control (primera fila) y tratamiento con 0.3 μ M (segunda fila). B) Intensidad de fluorescencia de GFAP. Los cambios del porcentaje de fluorescencia se comparan entre tratamientos y control respecto al mismo. Los resultados mostraron una distribución no normal por lo tanto, se usó la prueba estadística U de Mann-Whitney con una N=3 (con 12 fotos por experimento) y un valor de $p < 0.01$, los asteriscos marcan la significancia estadística.

Toda célula senescente presenta un fenotipo de secreción el cual se caracteriza por el aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias, tales como la IL-6. En la **figura 9A** se observó una baja intensidad de fluorescencia en el control en comparación al tratamiento. La fluorescencia de la IL-6 fue considerablemente baja en el control respecto al tratamiento. Por ello se ajustaron parámetros para tener una mejor resolución de la fotografía sin que afectaran la intensidad de la fluorescencia del tratamiento.

A



B

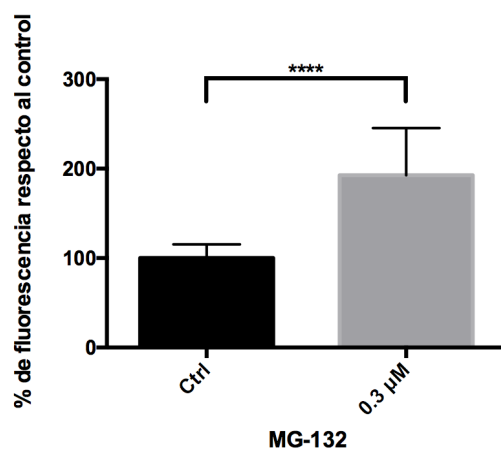


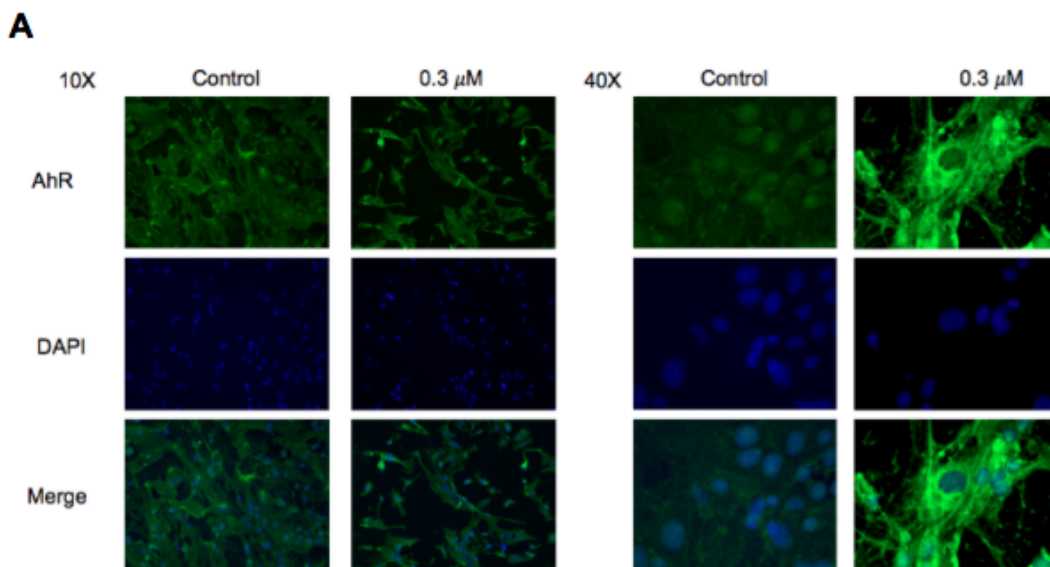
Figura 9. Los astrocitos senescentes incrementan su producción de IL-6. Ensayo de inmunofluorescencia de la IL-6 A) Fotografías de la inmunofluorescencia de IL-6 en 100x. Se compara los controles negativos, la marca de la citocina IL-6, la marca DAPI y el sobrelape de la marca IL-6 y DAPI. Se comparan control (primera fila) y tratamiento con 0.3 μ M (segunda fila). B) Intensidad de fluorescencia de IL-6. Los cambios del porcentaje de fluorescencia se comparan entre tratamientos y control respecto al mismo (número de fotos por experimento). Los resultados mostraron una distribución no normal por lo tanto, se usó la prueba estadística U de Mann-Whitney con una N=3 y un valor de $p < 0.01$, los asteriscos marcan la significancia estadística.

Se midió la intensidad de la fluorescencia (**figura 9B**) y considerando al control en porcentaje aproximado del 100%, en los tratamientos se observó una diferencia de 100% mayor al control, siendo estadísticamente significativa la diferencia entre ambos de acuerdo con la prueba U de Mann Whitney con un

valor de $p < 0.0001$. Como resultado de la cuantificación de fluorescencia, confirmando que el estado senescente en el que se encuentra la célula presenta el fenotipo de secreción.

Localización celular y aumento en los niveles de expresión del AHR en la senescencia inducida por estrés proteotóxico.

En la vía canónica del AHR, esta proteína puede cambiar de una localización citosólica a una localización nuclear para activar genes. Para verificar este cambio en el estado senescente se realizó una inmunofluorescencia para conocer su localización. Como podemos observar en la **figura 10A** las células senescentes con el tratamiento con $0.3 \mu\text{M}$ presentan una localización de tipo citoplasmático, se puede confirmar esta localización nuclear al observar el sitio donde se concentra la intensidad de fluorescencia en conjunto con la colocalización del DAPI marcando los núcleos de las células.



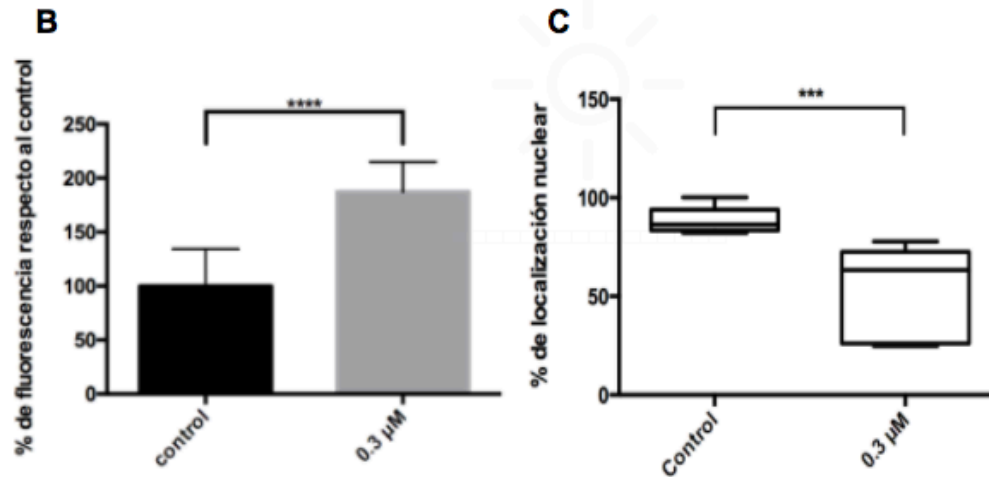


Figura 10. La inhibición del proteasoma induce una localización citosólica y un aumento en la expresión de AHR. A) Inmunofluorescencia de AHR en 10x y 40x. Se compara entre controles y tratamientos la marca de la proteína AHR, la marca de DAPI y la colocalización de ambas. B) Intensidad de fluorescencia de AHR. Los cambios de porcentaje de fluorescencia se comparan entre tratamiento y control respecto al mismo. Los resultados mostraron una distribución normal, por lo tanto se usó la prueba estadística T-student no pareada con una N=3 y un valor de $P < 0.01$. C) Número de células con localización nuclear de AHR. Los cambios de porcentaje de localización nuclear se comparan entre tratamiento y control respecto al número total de células. Los resultados mostraron una distribución normal, por lo tanto se usó la prueba estadística T-student no pareada con una N=3 y un valor de $P < 0.01$.

Para confirmar el cambio entre la localización tipo nuclear y citosólico en las células tratadas y control en la gráfica de la **figura 10C** podemos observar la disminución en el porcentaje de localización nuclear. En la columna del tratamiento se observó una disminución en el porcentaje, la mayoría de los datos se concentró entre 60-50 % y algunos más bajos de 25%. De acuerdo con el análisis estadístico este cambio logra ser significativo, por lo que encontramos que en los astrocitos el movimiento de la proteína AHR parte de una localización nuclear predominante a una localización citosólica total en respuesta al tratamiento. Otro dato que sobresale es el análisis de fluorescencia, donde se observa un aumento en la intensidad. De acuerdo con la **figura 10B** podemos observar que en el tratamiento existe un aumento en la intensidad del 100%.

Discusión

Inhibidor de proteasoma como generador de senescencia celular y SASP

Durante la vida celular, la transcripción de genes da lugar a la traducción para sintetizar proteínas y éstas posteriormente realizaran diversas funciones. Sin embargo las proteínas tienen un tiempo de vida media útil para luego ser degradadas y con la activación de otros genes se generan proteínas suplentes. El estrés proteotóxico rompe con este ciclo. Como mencionamos anteriormente este tipo de estrés se define como la acumulación de proteínas dañadas indicando un problema en la degradación de proteínas lo que conlleva a pérdida de funciones celulares importantes (Campisi et. al, 2001) lo que pueden conducir a muerte celular, pero cuando las células no mueren por el estrés proteotóxico, éste genera senescencia en diferentes linajes celulares.

Este trabajo se enfocó en el estudio de la inducción de la senescencia a través del estrés proteotóxico y en los cambios celulares que induce la acumulación de proteínas sobre el receptor de hidrocarburos de arilo de astrocitos de ratón. Previamente nuestro equipo de trabajo se había determinado que las concentraciones ideales para trabajar con el inhibidor de proteasoma es de 0.1 μ M, 0.2 μ M y 0.3 μ M en astrocitos de rata y se observó que mayores concentraciones presentaban muerte celular de 100%. También está reportado que otros inhibidores de proteasoma como lactasistina y epoxomicina generan senescencia celular Bitto *et. al.*, (2010), lo demostraron mediante pruebas de β -

galactosidasa y el aumento en los niveles de expresión de las proteínas p21 y p53 asociados a la senescencia.

Al probar las concentraciones del inhibidor de proteasoma, se determinó que al 0.1 μM no hay ningún efecto. Sin embargo en 0.2 μM y 0.3 μM el porcentaje de células disminuye respecto a su control, pero no entre ellas. Este efecto de muerte celular no es mencionado en el trabajo de Bitto y cols, en 2010. En las pruebas de β -galactosidasa, entre 0.2 μM y 0.3 μM se observó una diferencia significativa en el porcentaje de células teñidas, donde 0.3 μM tuvo el porcentaje más alto (96%). Con base en estos resultados, se usó la concentración de 0.3 μM para las pruebas posteriores. Se recomienda tener siempre precaución con las concentraciones, el número de células que se deben sembrar y el tiempo para la realización del experimento.

La senescencia es un fenómeno complejo que se caracteriza por presentar varios cambios fisiológicos que nos ayudan a determinarla, entre ellos se encuentra el cambio en la actividad de la enzima β -galactosidasa, la cual tiene una actividad normal en pH 4, sin embargo en la senescencia aumenta, siendo detectable en un pH 6 (Dimri *et. al.*, 1995). Otros cambios se presentan cuando la senescencia tiene un papel más activo, derivando en el fenotipo de secreción de senescencia o SASP. En el SASP aumentan los niveles de expresión de citocinas como IL-6 o IL-8 (Rodier. F, 2013). En los astrocitos un cambio característico durante la senescencia es el aumento de la proteína GFAP que en varios trabajos se ha confirmado esta relación y su implicación en enfermedades neurodegenerativas (O'Callaghan *et. al.*, 1991, Nichols *et. al.*,1993). Sin

embargo no todos estos cambios fisiológicos son una regla, como demuestra Purcell y cols, (2014), al evaluar los perfiles de expresión génica en diferentes tipos de inducción a senescencia, concluyen que citocinas como IL-6 no presentaban cambios en su expresión durante la senescencia. Aunque se debe aclarar que dicho estudio no presentó una inducción a senescencia mediante estrés proteotóxico. Recomendamos usar otro marcador pro inflamatorio relacionado con la senescencia, como miR-146 (Olivieri et. al., 2013).

AHR citoplasmático en astrocitos durante el estímulo proteotóxico

Relación de la vía canónica de AHR y el proteasoma

La vía canónica del AHR indica que éste al tener contacto con los ligandos, cambia su conformación y abandona su complejo en el citoplasma para trasladarse al núcleo y empezar la transcripción de su batería génica. De acuerdo con el trabajo de Mejía et al., (2015) se menciona que al activarse AHR se induce la expresión del gen *UbcM4*, el cual traduce a una enzima conjugadora de ubiquitina que trabaja en conjunto con enzimas ubiquitin ligasas para promover la ubiquitinación y degradación de proteínas por el proteasoma 26S. A su vez, terminado su ciclo de transcripción de genes el AHR también es degradado, de acuerdo con el estudio de Ma et al., 2000. Además, en ese mismo estudio se demostró en la línea celular de ratón hepa1c1c7 que la inhibición del proteasoma (usando MG132 en un estímulo de 5 horas o menos) aumenta la producción de citocromo P450 indicando que el mismo proteasoma regula de forma positiva la transcripción de los genes en AHR, lo que conlleva a que el AHR sufra una translocación nuclear, en contraste con los resultados

presentados en este estudio. Mientras que en esta tesis se analizó el comportamiento de AHR, en células senescentes por inhibición de proteasoma sin estímulo de TCDD, en el reporte de Ma et al., (2000), estimularon a las células con TCDD para activar al AHR, lo que explicaría las diferencias de localización del AHR.

Sin embargo es necesario evaluar la respuesta de AHR con TCDD en células senescentes para determinar si el AHR es capaz de funcionar canónicamente, esto es, que el AHR funcione como factor de transcripción y migre el núcleo.

Efecto de la densidad celular y su relación de AhR en astrocitos

La permanencia citosólica del AHR depende de diferentes factores, entre ellos se encuentra la densidad celular. En el estudio realizado por Ikuta y Cho en (2004) se determinó que en líneas celulares de queratinocitos (HaCaT) y fibroblastos (10T 1/2) presentan la activación y translocación de AHR al núcleo independientemente de la presencia de un ligando, ocasionado por densidades dispersas. Contrario al estudio elaborado por Benítez (2019), la localización de AHR en una densidad alta de entre 95-100% es nuclear. En el estudio de Ikuta y Cho (2004) se demostró que la localización es modulada por la actividad de exportación nuclear, debido a una fosforilación de la señal de exportación nuclear (NES) mediada por MAPK p38, así como su desfosforilación mediada por el contacto célula-célula. Con base a estos datos se trabajó con una confluencia entre 85-90% para evitar sesgos en la localización del AHR con tratamiento de inhibidor de proteasoma.

Relación del AHR y la senescencia celular inducida por estrés proteotóxico

De acuerdo con los estudios del grupo Santiago y col (2001, 2002), la inducción de inhibidor de proteasoma mostraba una translocación nuclear del AHR así como su activación demostrada a través de la expresión de CYP1A1. De acuerdo con el grupo de estudio de Santiago y cols. (2003) el tratamiento de inhibidor de proteasoma ocasionó un aumento en la fosforilación de Sp1, una proteína con diferentes puntos de unión al DNA y actividad transcripcional, ocasionando la unión al promotor del ARNT y generando una sobreexpresión, el cual forma un heterodímero con el AHR para la transcripción de genes, a su vez esto se pudo interrumpir usando un inhibidor de proteína cinasa C, la cual también es aumentada debido al tratamiento por MG132, esto sugiere que el control celular a través de la proteína cinasa C puede regular la actividad transcripcional de AHR en ausencia de xenobióticos. Este punto de partida ayuda a hipotetizar que el AHR puede ser traslocado al núcleo o no independientemente de un ligado cómo reportó Ikuta y Cho (2004) anteriormente con la densidad celular. Esto también se refleja en este trabajo debido a que no se proporcionó al AHR ningún tipo de ligando exógeno o endógeno extra. Sin embargo, las diferencias entre nuestros resultados y los de Santiago y cols. (2003) son que en los cultivos primarios de fibroblastos de embriones de ratón (cepa C57BL/6) el tratamiento con 8 μ M MG132 por 6 horas induce translocación nuclear del AHR y nuestros resultados con astrocitos de ratón de la misma cepa con 3 μ M MG132 presenta localización citoplasmática y las muestras control muestran localización nuclear, cabe recalcar que el propósito

de la inhibición del proteasoma en nuestro trabajo es generar senescencia celular por estrés proteotóxico por lo tanto las concentraciones, tiempos de tratamiento y tipo celular varían, del trabajo realizado por Santiago y cols. en 2003 para generar el estado celular deseado (la senescencia).

De acuerdo en el trabajo de Davarinos y cols., en 1999 el inhibir el proteasoma y activarlo con TCDD (agonista exógeno de AHR) provoca que el AHR permanezca nuclear al AHR pero inhibir el proteasoma sin activarlo (Ej. TCDD), la localización del AHR es citoplasmático, contrario a lo expuesto con Santiago y col en 2003. Aunque Davarinos no menciona una vía o causa de la localización citoplasmática, otros estudios podrían demostrar la vía a través de dos proteínas, XAP-2 (forma parte del AHRC) la cual evita que el AHR se extrapole al núcleo, sin embargo, no se ha establecido un papel exacto, pero se postula que posiblemente esté involucrado en la regulación de la tasa de recambio de AHR, mejorando la localización plasmática del receptor, aunque también se ha observado que puede intervenir reduciendo la degradación proteasomal (Meyer et. al. 1999; Petruilis et. al., 2002; Kazlauskas et. al., 2000). Otra proteína es la CRM1 que permite al AHR salir del núcleo para ser degradado por el proteasoma, es posible que el AHR al ser activado, como consecuencia se lleve a la localización nuclear sin embargo la alta concentración de CRM1 (ocasionado por la inhibición del proteasoma) genere el desplazamiento del núcleo al citoplasma nuevamente. Ambas proteínas pueden interactuar independientemente de la otra, sin embargo XAP-2 a diferencia de CRM1

depende de la presencia de ligando para mantener a AHR en el núcleo (Berg & Pongratz, 2002)

De acuerdo con una revisión de Ray & Swanson (ver revisión de 2008) determinaron que usando TCDD (uno de los ligandos con mayor afinidad de AHR) hubo un aumento en la β -galactosidasa en queratinocitos por lo que se concluyó que el TCDD al activar a AHR genera la senescencia celular sin embargo no se determinó que vía de activación fue usado. Los datos presentados en el trabajo de Ray & Swanson cols. en 2008, nos sugieren a determinar que el AHR está involucrado en la senescencia al activar el receptor por medio de ligando, en cambio, el trabajo de Davarinos cols. en 1999, nos explica que el AHR en presencia del inhibidor se concentra de manera citoplasmática. Esto nos hace pensar que el AHR está involucrado en la senescencia, pero no por la vía genómica (transcripción de su batería genética) si no por las vías no genómicas donde el receptor se involucra en otras rutas de señalización como la activación de MAPK, FAK, PKCa e INF1.

Larigot y cols. en 2018 mencionan que el AHR al ser activado por ligando puede tener diferentes vías de señalización sin tener que traslocarse al núcleo. En este trabajo se buscaron vías que estén relacionadas con la senescencia y el SASP por lo tanto se buscaron vías que involucren la producción de factores inflamatorios ya que el fenotipo de secreción de senescencia tiene la característica de generar ambientes proinflamatorios.

De acuerdo con el trabajo de Weiss y cols. en 2005, el AHR parece activar un oncogén a través de la proteína p38 MAPK, aún no se tiene claro de qué forma

AHR activa p38 MAPK ya que AHR no activa ninguna de las cinasas que fosforilan p38 MAPK así como tampoco disminuye la tasa de desfosforilación de la misma proteína. Esto los permite teorizar que la comunicación entre AHR y p38 MAPK es a manera de “cross-talk” donde uno o más componentes de una vía de transducción de señales afectan a otra. Esta relación entre ambas proteínas es muy importante ya que p38 MAPK además de estar relacionada con inflamación, apoptosis, proliferación y diferenciación celular, el trabajo de Mombach y col (2015), determinó mediante una red booleana que p38 MAPK induce la senescencia en astrocitos (Fig. 10).

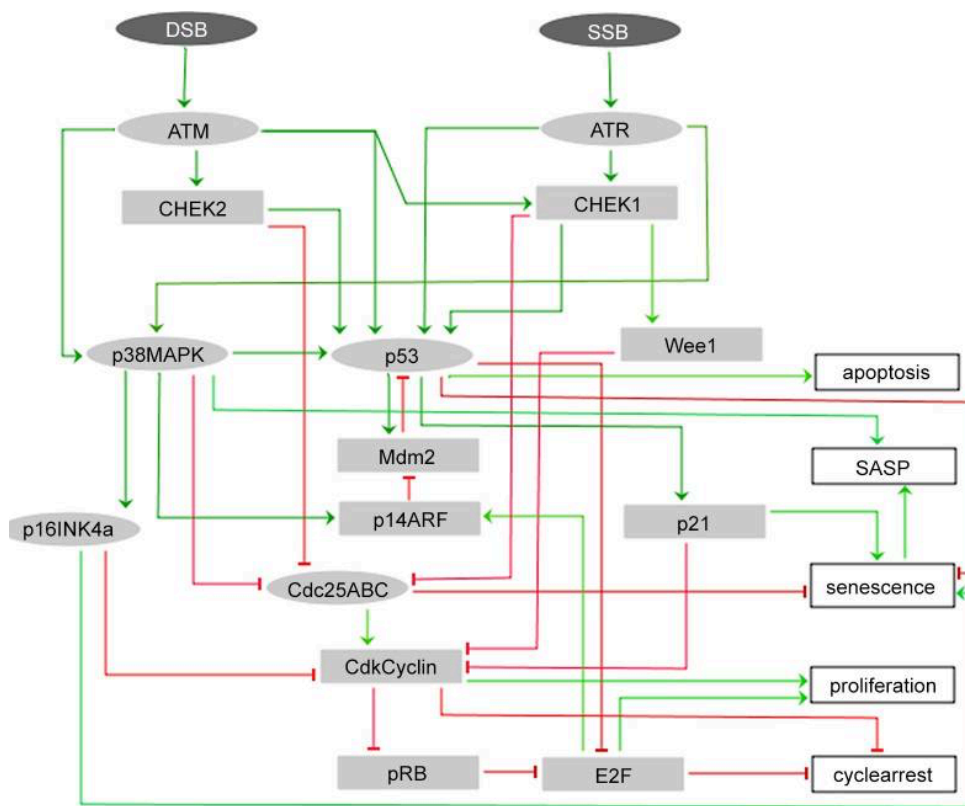


Figura 10. Topología de la red booleana. Los nodos rectangulares y elípticos representan nodos booleanos y de valores múltiples, respectivamente. Los nodos de entrada en color oscuro en la parte superior de la red denotan rupturas de DNA de cadena simple (SSB) y doble (DSB), respectivamente. Los nodos de salida en color blanco representan las posibles decisiones de destino de la célula y los nodos internos son los reguladores de las salidas. Tomado de Mombach et al., 2015.

En la figura 10, la red booleana de Mombach infiere un daño en las cadenas de DNA (estrés genotóxico) que genera una cascada de señalización. Las redes booleanas funcionan con variables discretas donde su valor está determinado por los estados de las demás variables vecinas. En estas redes las conexiones son azarosas pero las salidas (el resultado final) están determinadas por funciones lógicas.

En la red booleana observamos que p38 MAPK está regulado fuertemente por la proteína ATM (ataxia telangiectasia mutada) y ATR (proteína relacionada con ataxia-telangiectasia y Rad3) por estrés celular inducido (no sólo genotóxico también se ha comprobado con oxidante) lo que en resultados experimentales se ha observado que p38 MAPK va estar involucrado en la secreción de IL-6 en astrocitos (factor principal para SASP) (Salminen et. al 2011). En conjunto podemos hipotetizar que el AHR esté involucrado en la respuesta senescente ante el estrés proteotóxico a través de p38 MAPK mediante “cross-talk” en alguna señal de transducción y está a su vez desencadenar en el fenotipo de secreción asociado a senescencia.

Conclusiones

- En este trabajo se estandarizó el cultivo primario de astrocitos corticales de ratón neonato (P0) de la cepa C57BL/6.
- Se estableció el modelo de senescencia celular, así como la inducción del SASP en astrocitos corticales de ratón mediante el estrés proteotóxico del

inhibidor de proteasoma MG-132 con una concentración de 0.3 μ M durante 3 días y demostrado con pruebas de β -galactosidasa e inmunofluorescencias de GFAP e IL-6.

- Los datos de este trabajo muestran que en los astrocitos corticales de ratas senescentes por estrés proteotóxico, la localización celular de AHR es citosólica.
- Hay una posible participación de AHR en la vía no genómica debido a su mínima localización nuclear lo que explicaría el aumento de IL-6 y por ello el fenotipo de secreción senescente generando un ambiente proinflamatorio.

Referencias

1. AHR. human protein atlas.(2019) (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000106546-AHR/tissue/primary+data>)
2. Akahoshi, E., Yoshimura, S., & Ishihara-Sugano, M. (2006). Over-expression of AhR (aryl hydrocarbon receptor) induces neural differentiation of Neuro2a cells: neurotoxicology study. *Environmental Health*, 5(1), 24.
3. Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., ... & Khazaie, K. (2016). Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, 530(7589), 184.
4. Barouki, R., Coumoul, X., & Fernandez-Salguero, P. M. (2007). The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS letters*, 581(19), 3608-3615.
5. Benítez Ángeles, Miguel, sustentante Efecto de la xantona v sobre el receptor de hidrocarburos de arilo en células de Schwann in vitro / 2019

6. Berg, P., & Pongratz, I. (2002). Two parallel pathways mediate cytoplasmic localization of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 32310-32319.
7. Bitto, A., Sell, C., Crowe, E., Lorenzini, A., Malaguti, M., Hrelia, S., & Torres, C. (2010). Stress-induced senescence in human and rodent astrocytes. *Experimental cell research*, 316(17), 2961-2968.
8. Blagosklonny, M. V. (2012). Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging. *Aging (Albany NY)*, 4(3), 159.
9. Brown, A. M., & Ransom, B. R. (2007). Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, 55(12), 1263-1271.
10. Burda, J. E., & Sofroniew, M. V. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*, 81(2), 229-248
11. Campisi, J. (2001). From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture?. *Experimental gerontology*, 36(4-6), 607-618.
12. Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual review of physiology*, 75, 685-705.
13. Campisi, J., & di Fagagna, F. D. A. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(9), 729.
14. Carrard, G., Bulteau, A. L., Petropoulos, I., & Friguet, B. (2002). Impairment of proteasome structure and function in aging. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34(11), 1461-1474.
15. Childs, B. G., Gluscevic, M., Baker, D. J., Laberge, R. M., Marquess, D., Dananberg, J., & van Deursen, J. M. (2017). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(10), 718.
16. Cho, Y. C., Zheng, W., & Jefcoate, C. R. (2004). Disruption of cell-cell contact maximally but transiently activates AhR-mediated transcription in 10T1/2 fibroblasts. *Toxicology and applied pharmacology*, 199(3), 220-238.
17. Chondrogianni, N., Stratford, F. L., Trougakos, I. P., Friguet, B., Rivett, A. J., & Gonos, E. S. (2003). Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 28026-28037.
18. Ciechanover, A., Orian, A., & Schwartz, A. L. (2000). The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: Mode of action and clinical implications. *Journal of cellular biochemistry*, 77(S34), 40-51.
19. Colombo, E., & Farina, C. (2016). Astrocytes: key regulators of neuroinflammation. *Trends in immunology*, 37(9), 608-620.
20. CONCONI, M., PETROPOULOS, I., Istvan, E. M. O. D., TURLIN, E., BIVILLE, F., & FRIGUET, B. (1998). Protection from oxidative inactivation of the 20S proteasome by heat-shock protein 90. *Biochemical Journal*, 333(2), 407-415.

21. Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathological Mechanical Disease*, 5, 99-118.
22. Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., ... & Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology*, 6(12), e301.
23. Cordiglieri, C., & Farina, C. (2010). Astrocytes exert and control immune responses in the brain. *Current Immunology Reviews*, 6(3), 150-159.
24. Correia-Melo, C., Hewitt, G., & Passos, J. F. (2014). Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence?. *Longevity & healthspan*, 3(1), 1.
25. Cox, M. B., & Miller, C. A. (2004). Cooperation of heat shock protein 90 and p23 in aryl hydrocarbon receptor signaling. *Cell stress & chaperones*, 9(1), 4-20.
26. Davarinos, N. A., & Pollenz, R. S. (1999). Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *Journal of Biological Chemistry*, 274(40), 28708-28715.
27. Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., & Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature protocols*, 4(12), 1798.
28. Denison, M. S., & Nagy, S. R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 43(1), 309-334.
29. Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., ... & 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.
30. Diry, M., Tomkiewicz, C., Koehle, C., Coumoul, X., Bock, K. W., Barouki, R., & Transy, C. (2006). Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism. *Oncogene*, 25(40), 5570.
31. Farina, C., Aloisi, F., & Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in immunology*, 28(3), 138-145.
32. Ferrer, I. (2017). Diversity of astroglial responses across human neurodegenerative disorders and brain aging. *Brain Pathology*, 27(5), 645-674.
33. Filbrandt, C. R., Wu, Z., Zlokovic, B., Opanashuk, L., & Gasiewicz, T. A. (2004). Presence and functional activity of the aryl hydrocarbon receptor in isolated murine cerebral vascular endothelial cells and astrocytes. *Neurotoxicology*, 25(4), 605-616.
34. Filbrandt, C. R., Wu, Z., Zlokovic, B., Opanashuk, L., & Gasiewicz, T. A. (2004). Presence and functional activity of the aryl hydrocarbon receptor

- in isolated murine cerebral vascular endothelial cells and astrocytes. *Neurotoxicology*, 25(4), 605-616.
35. Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., & De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908(1), 244-254.
 36. González-Puertos, V. Y., Maciel-Barón, L. Á., Barajas-Gómez, B. A., López-Díaz Guerrero, N. E., & Königsberg, M. (2015). Participación del fenotipo secretor de las células senescentes en el desarrollo del cáncer, el envejecimiento y las enfermedades asociadas a la edad. *Gaceta Médica de México*, 151(4), 491-500.
 37. Gordon, G. R., Mulligan, S. J., & MacVicar, B. A. (2007). Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia*, 55(12), 1214-1221.
 38. Grune, T., Reinheckel, T., & Davies, K. J. (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *The FASEB Journal*, 11(7), 526-534.
 39. Haarmann-Stemann, T., Bothe, H., & Abel, J. (2009). Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Biochemical pharmacology*, 77(4), 508-520.
 40. Hahn, M. E., Karchner, S. I., Shapiro, M. A., & Perera, S. A. (1997). Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 13743-13748.
 41. Haigis, M. C., & Yankner, B. A. (2010). The aging stress response. *Molecular cell*, 40(2), 333-344.
 42. Halassa, M. M., Fellin, T., & Haydon, P. G. (2007). The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in molecular medicine*, 13(2), 54-63.
 43. Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 35(1), 307-340.
 44. Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 11, 298-300
 45. Hayashi, M., Saito, Y., & Kawashima, S. (1992). Calpain activation is essential for membrane fusion of erythrocytes in the presence of exogenous Ca²⁺. *Biochemical and biophysical research communications*, 182(2), 939-946.
 46. Henry, J. T., & Crosson, S. (2011). Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annual review of microbiology*, 65, 261-286.
 47. Ikuta, T., Kobayashi, Y., & Kawajiri, K. (2004). Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 19209-19216.
 48. Ikuta, T., Tachibana, T., Watanabe, J., Yoshida, M., Yoneda, Y., & Kawajiri, K. (2000). Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor. *The Journal of Biochemistry*, 127(3), 503-509.

49. ITO, A., TAKAHASHI, R., MIURA, C., & BABA, Y. (1975). Synthetic study of peptide aldehydes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 23(12), 3106-3113.
50. Jensen, E. C. (2013). Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using ImageJ. *The Anatomical Record*, 296(3), 378-381.
51. Jones, S. (2004). An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome biology*, 5(6), 226.
52. Kazlauskas, A., Poellinger, L., & Pongratz, I. (1999). Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 274(19), 13519-13524.
53. Kazlauskas, A., Poellinger, L., & Pongratz, I. (2000). The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(52), 41317-41324.
54. Kewley, R. J., Whitelaw, M. L., & Chapman-Smith, A. (2004). The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(2), 189-204.
55. Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. (2015). *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology E-Book*. Elsevier Health Sciences.
56. Kimelberg, H. K., & Nedergaard, M. (2010). Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics*, 7(4), 338-353.
57. Kimura, A., Naka, T., Nakahama, T., Chinen, I., Masuda, K., Nohara, K., ... & Kishimoto, T. (2009). Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *Journal of Experimental Medicine*, 206(9), 2027-2035.
58. Kirkwood, T. B., & Rose, M. R. (1991). Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 332(1262), 15-24.
59. Kuilman, T., & Peeper, D. S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature reviews cancer*, 9(2), 81-94.
60. Kumar, M. B., Ramadoss, P., Reen, R. K., Heuvel, J. P. V., & Perdew, G. H. (2001). The Q-rich subdomain of the human AhReceptor transactivation domain is required for dioxin-mediated transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 42302-42310.
61. Levy, M. Z., Allsopp, R. C., Futcher, A. B., Greider, C. W., & Harley, C. B. (1992). Telomere end-replication problem and cell aging. *Journal of molecular biology*, 225(4), 951-960.
62. Ma, Q., & Baldwin, K. T. (2000). 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced Degradation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) by the Ubiquitin-Proteasome Pathway ROLE OF THE TRANSCRIPTION ACTIVATION AND DNA BINDING OF AhR. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8432-8438.
63. Massari, M. E., & Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Molecular and cellular biology*, 20(2), 429-440.

64. Mejia-Garcia, A., Gonzalez-Barbosa, E., Martinez-Guzman, C., Torres-Ramos, M. A., Rodriguez, M. S., Guzman-Leon, S., & Elizondo, G. (2015). Activation of AHR mediates the ubiquitination and proteasome degradation of c-Fos through the induction of Ubc4 gene expression. *Toxicology*, *337*, 47-57.
65. Meyer, B. K., & Perdew, G. H. (1999). Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization. *Biochemistry*, *38*(28), 8907-8917.
66. Middeldorp, J & E.M. Hol. (2011). *GFAP in health and disease*. Progress in Neurobiology. Amsterdam. The Netherlands. Págs 421-443
67. Mombach, J. C., Vendrusculo, B., & Bugs, C. A. (2015). A model for p38MAPK-induced astrocyte senescence. *PloS one*, *10*(5).
68. Morimoto, R. I. (2011, January). The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in aging and disease. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 76, pp. 91-99). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
69. Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews Molecular cell biology*, *15*(7), 482-496.
70. Nebert, D. W., Roe, A. L., Dieter, M. Z., Solis, W. A., Yang, Y. I., & Dalton, T. P. (2000). Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochemical pharmacology*, *59*(1), 65-85.
71. Nichols, N. R., Day, J. R., Laping, N. J., Johnson, S. A., & Finch, C. E. (1993). GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiology of aging*, *14*(5), 421-429.
72. O'Callaghan, J. P., & Miller, D. B. (1991). The concentration of glial fibrillary acidic protein increases with age in the mouse and rat brain. *Neurobiology of aging*, *12*(2), 171-174.
73. Oberheim, N. A., Wang, X., Goldman, S., & Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends in neurosciences*, *29*(10), 547-553.
74. Olivieri, F., Lazzarini, R., Recchioni, R., Marcheselli, F., Rippo, M. R., Di Nuzzo, S., ... & Procopio, A. D. (2013). MiR-146a as marker of senescence-associated pro-inflammatory status in cells involved in vascular remodelling. *Age*, *35*(4), 1157-1172.
75. Pardo Andreu, G., & Delgado Hernández, R. (2003). Senescencia celular y envejecimiento. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, *22*(3), 204-212.
76. Pekny, M., & Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, *50*(4), 427-434.
77. Pekny, M., Pekna, M., Messing, A., Steinhäuser, C., Lee, J. M., Pappas, V., ... & Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta neuropathologica*, *131*(3), 323-345.

78. Petrusis, J. R., & Perdew, G. H. (2002). The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chemico-biological interactions*, 141(1-2), 25-40.
79. Pohjanvirta, R. (Ed.). (2012). *The AH receptor in Biology and Toxicology*. Wiley.
80. Powell, E. M., & Geller, H. M. (1999). Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. *Glia*, 26(1), 73-83.
81. Purcell, M., Kruger, A., & Tainsky, M. A. (2014). Gene expression profiling of replicative and induced senescence. *Cell Cycle*, 13(24), 3927-3937.
82. Ray, S., & Swanson, H. I. (2009). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by TCDD inhibits senescence: a tumor promoting event?. *Biochemical pharmacology*, 77(4), 681-688.
83. REINHECKEL, T., SITTE, N., ULLRICH, O., KUCKELKORN, U., DAVIES, K. J., & GRUNE, T. (1998). Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochemical Journal*, 335(3), 637-642.
84. Rodier, F. (2013). Detection of the senescence-associated secretory phenotype (SASP). In *Cell Senescence* (pp. 165-173). Humana Press, Totowa, NJ.
85. Rothhammer, V., Maccanfroni, I. D., Bunse, L., Takenaka, M. C., Kenison, J. E., Mayo, L., ... & Alvarez, J. I. (2016). Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nature medicine*, 22(6), 586.
86. Rowlands, J. C., McEwan, I. J., & Gustafsson, J. A. (1996). Trans-activation by the human aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator proteins: direct interactions with basal transcription factors. *Molecular pharmacology*, 50(3), 538-548.
87. Rzemieniec, J., Litwa, E., Wnuk, A., Lason, W., Krzeptowski, W., & Kajta, M. (2016). Selective aryl hydrocarbon receptor modulator 3, 3'-diindolylmethane impairs AhR and ARNT signaling and protects mouse neuronal cells against hypoxia. *Molecular neurobiology*, 53(8), 5591-5606.
88. Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., & Narita, M. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes & development*, 28(2), 99-114.
89. Salminen, A., Ojala, J., Kaarniranta, K., Haapasalo, A., Hiltunen, M., & Soininen, H. (2011). Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. *European Journal of Neuroscience*, 34(1), 3-11.
90. Santiago-Josefat, B., & Fernandez-Salguero, P. M. (2003). Proteasome inhibition induces nuclear translocation of the dioxin receptor through an Sp1 and protein kinase C-dependent pathway. *Journal of molecular biology*, 333(2), 249-260.
91. Santiago-Josefat, B., Pozo-Guisado, E., Mulero-Navarro, S., & Fernandez-Salguero, P. M. (2001). Proteasome inhibition induces nuclear translocation and transcriptional activation of the dioxin receptor in mouse

- embryo primary fibroblasts in the absence of xenobiotics. *Molecular and cellular biology*, 21(5), 1700-1709.
92. Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer*, 15(7), 397.
93. Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 7-35.
94. Sutter, T. R., & Greenlee, W. F. (1992). Classification of members of the Ah gene battery. *Chemosphere*, 25(1-2), 223-226.
95. Swanson, H. I. (2002). DNA binding and protein interactions of the AHR/ARNT heterodimer that facilitate gene activation. *Chemico-biological interactions*, 141(1-2), 63-76.
96. Tan, Z., Chang, X., Puga, A., & Xia, Y. (2002). Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function. *Biochemical pharmacology*, 64(5-6), 771-780.
97. Tan, Z., Chang, X., Puga, A., & Xia, Y. (2002). Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function. *Biochemical pharmacology*, 64(5-6), 771-780.
98. Tomkiewicz, C., Herry, L., Bui, L. C., Metayer, C., Bourdeloux, M., Barouki, R., & Coumoul, X. (2013). The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway. *Oncogene*, 32(14), 1811.
99. Verkhratsky, A., Marutle, A., Rodríguez-Arellano, J. J., & Nordberg, A. (2015). Glial asthenia and functional paralysis: a new perspective on neurodegeneration and Alzheimer's disease. *The Neuroscientist*, 21(5), 552-568.
100. Voskuhl, R. R., Peterson, R. S., Song, B., Ao, Y., Morales, L. B. J., Tiwari-Woodruff, S., & Sofroniew, M. V. (2009). Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *Journal of Neuroscience*, 29(37), 11511-11522
101. Weiss, C., Faust, D., Dürk, H., Kolluri, S. K., Pelzer, A., Schneider, S., ... & Göttlicher, M. (2005). TCDD induces c-jun expression via a novel Ah (dioxin) receptor-mediated p38-MAPK-dependent pathway. *Oncogene*, 24(31), 4975-4983.
102. Young, A. R., & Narita, M. (2009). SASP reflects senescence. *EMBO reports*, 10(3), 228-230.
103. Young, A. R., & Narita, M. (2009). SASP reflects senescence. *EMBO reports*, 10(3), 228-230.